

ШВЕДЧЕНКО ДМИТРИЙ ОЛЕГОВИЧ

**РАЗРАБОТКА АЛГОРИТМОВ МОРФОЛОГИЧЕСКОГО АНАЛИЗА
НАНОЧАСТИЦ В ЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ И УСТАНОВЛЕНИЕ
МЕХАНИЗМА ОБРАЗОВАНИЯ НАНОЧАСТИЦ В РАСТВОРАХ ПОЛИМЕРОВ.**

Специальность 01.04.18 –
«кристаллография, физика кристаллов»

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата физико-математических наук

Москва 2018

Работа выполнена в лаборатории электронографии Института кристаллографии им. А.В. Шубникова РАН Федерального государственного учреждения «Федеральный научно-исследовательский центр «Кристаллография и фотоника» Российской академии наук»

**Научный
руководитель:** **Суворова Елена Игоревна**, доктор физико-математических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории электронографии ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН

**Официальные
оппоненты:** **Боргардт Николай Иванович**, доктор физико-математических наук, профессор, начальник Научно-исследовательской лаборатории электронной микроскопии Национального исследовательского университета «Московский институт электронной техники»
Асланов Леонид Александрович, доктор химических наук, профессор, заведующий лабораторией структурной химии кафедры общей химии химического факультета Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова

**Ведущая
организация:** Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ»

Защита диссертации состоится « ___ » _____ 2018 г. в ___ ч. ___ мин. на заседании диссертационного совета Д 002.114.01 при ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН по адресу: 119333, г. Москва, Ленинский пр. 59, конференц-зал.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН <http://crys.ras.ru/>.

Автореферат разослан: « ___ » _____ 2018 г.

Ученый секретарь
Диссертационного совета Д 002.114.01
Кандидат физико-математических наук

Фролов К.В.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы

Использование наноразмерных ультрадисперсных частиц позволяет существенно изменить характеристики традиционных материалов. Возникновение магнитных, электрических, оптических, химических и биологических свойств, которые не проявляются у соответствующей объемной фазы, происходит при уменьшении размеров объекта до десятков и единиц нанометров, во-первых, по причине квантовых размерных эффектов, во-вторых, вследствие многократного увеличения относительной площади поверхности частиц. Таким образом, свойства наночастиц находятся в непосредственной связи с их размерами [1–3]. Поэтому актуальной задачей является развитие методов обнаружения, измерения размеров и контроля дисперсности наночастиц.

Статистический анализ размеров наночастиц позволяет решить фундаментальные проблемы, связанные с механизмом их образования, а также ряд вопросов, важных для оптимизации синтеза нанопродукции и разработки новых материалов, где в качестве компонентов присутствуют наночастицы, размеры которых могут являться критерием качества и эффективности как производства, так и свойств таких материалов. Монодисперсность является одним из основных требований, поскольку в этом случае обеспечивается контролируемый эффект, что особенно важно в биологической и медицинской областях.

Металлические наночастицы диаметром не более 10 нм являются наиболее био- и химически активными, что используется в фармакологии и медицине. Кроме того, одним из основных требований, предъявляемых к биоматериалам является их нетоксичность и безопасность применения. Поэтому синтез наночастиц для биоматериалов наиболее интенсивно развивается в рамках принципов зеленой химии с использованием биосовместимых и экологически чистых технологий с водорастворимыми полимерами [4–6], которые являются необходимыми компонентами химических реакций и играют роль стабилизаторов.

Одним из наиболее информативных методов анализа наночастиц (размеров, морфологии и структуры) является просвечивающая электронная микроскопия, позволяющая получать прямые изображения и проводить измерения вплоть до атомного уровня. Метод рентгеновского рассеяния обеспечивает высокую скорость установления дисперсий и позволяет исследовать размерные характеристики наночастиц непосредственно в растворах в промышленных масштабах. Комбинация этих двух методов позволяет ускорить исследования в биохимической и медицинской областях нанотехнологий.

Присутствие полимеров в растворах и сухих биоматериалах создает дополнительные трудности в идентификации наночастиц малых размеров, поскольку их размеры становятся сопоставимыми с размерами молекул полимеров, принимающих различные конфигурации и формы.

Исследование влияния различных инструментальных факторов и повышение требований к надежности получаемых данных постоянно стимулируют развитие методов их обработки. В настоящее время в наиболее известных программах в основу автоматического анализа размеров и дисперсий наночастиц положен принцип пороговой обработки изображений, который после предварительных процедур фильтрования от шума

дает неплохие результаты. Просвечивающая электронная микроскопия, обладающая возможностями формирования нескольких видов изображений, является прямым методом исследования морфологии и размеров наночастиц. Поэтому создание алгоритмов для измерения размеров нанообъектов на электронно-микроскопических изображениях является актуальной задачей для прогресса в области компьютерного зрения.

Цели и задачи работы

Цели работы:

разработать алгоритмы распознавания наночастиц и измерения их размеров на электронно-микроскопических изображениях для установления зависимости формы распределений наночастиц по размерам от структуры (состава) полимеров, восстанавливающих ионы металлов, и механизма образования наночастиц в полимерных водных растворах.

В работе решались следующие задачи:

- Установление особенностей формирования контраста наночастиц, расположенных на подложках и в тонких полимерных пленках, в просвечивающем электронном микроскопе;
- Разработка подхода распознавания наночастиц до 10 нм на основе пороговой обработки изображений;
- Создание алгоритма определения размеров наночастиц на основе аппроксимации моделированных изображений к экспериментальным изображениям, полученным в просвечивающем электронном микроскопе;
- Создание программы Анализатор Наночастиц (АнНа) на основе разработанных алгоритмов с графическим интерфейсом и сохранением результатов в виде массива данных;
- Тестирование программы АнНа и проведение сравнительного анализа результатов измерения наночастиц Ag и Se с результатами, полученными с помощью уже существующих программ;
- Исследование распределений наночастиц по размерам в растворах с помощью метода малоуглового рентгеновского рассеяния и проведение сравнительного анализа результатов с электронно-микроскопическими данными для размеров наночастиц в интервале от 1 нм до 100 нм;
- Установление зависимости размеров и распределений по размерам наночастиц серебра от состава физических смесей гомополимеров 2-деокси-2-метакриламида-Д-глюкозы (МАГ) и диметиламиноэтилметакрилата (ДМАЭМ) и сополимеров МАГ-ДМАЭМ с различными мольными соотношениями мономеров.

Научная новизна

- Теоретически продемонстрировано и экспериментально подтверждено, что немонотонная зависимость интенсивности прошедшего электронного пучка от толщины проявляется для кристаллических наночастиц размером до 10 нм, находящихся в положении, близком к брэгговскому положению, т.е. имеющих сильный дифракционный контраст.
- Установлено, что доля случайно ориентированных наночастиц серебра (золота, платины), обладающих масс-толщинным контрастом (не дифрагирующих) снижается до нуля для частиц диаметром несколько нм, в то время как число частиц с дифракционным контрастом, формирующимся в многолучевых условиях, увеличивается до 100%.

- Показано, что аппроксимация полиномиальной модели к реальным изображениям наночастиц позволяет провести измерения размеров, причем требуемая степень полинома увеличивается с ростом вклада дифракционного контраста.

- Предложен механизм формирования наночастиц, связывающий модовый диаметр в распределениях наночастиц серебра с числом восстанавливающих центров (кислорода и азота) в мономерах МАГ и ДМАЭМ в зависимости от их мольной доли в макромолекуле полимера.

- Сделаны заключения о причинах различий в значениях модовых диаметров объемных распределений по размерам частиц серебра и селена, полученных методами просвечивающей электронной микроскопии и малоуглового рентгеновского рассеяния.

Практическая значимость

Разработанные алгоритмы распознавания и измерения наночастиц положены в основу программы Анализатор Наночастиц (АнНа), позволяющей проводить автоматизированный статистический анализ размеров сферических, эллипсоидальных и стержнеобразных наночастиц. В предложенном подходе, основанном на моделировании изображения и аппроксимации модели к реальным изображениям частиц, учтены недостатки пороговой обработки изображений (глобальной и локальной), когда агломерированные молекулы полимеров и флуктуации плотности в поддерживающей углеродной пленке принимаются за наночастицы. Тестирование показало, что программа АнНа позволяет корректно распознать все наночастицы размером в несколько нм на (С)ПЭМ-изображениях с сильным фоном, измерить размеры, а также значительно повысить скорость обработки электронно-микроскопических изображений наночастиц и сократить время проведения исследований по сравнению с другими известными программами. Программа находится в открытом доступе и размещена на сайте ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН <https://www.crys.ras.ru/struktura-instituta/nauchnye-podrazdeleniya/otdel-elektronnoj-kristallografii/laboratoriya-elektronografii>.

Результаты по исследованию влияния структуры полимеров на размеры и распределения по размерам наночастиц серебра могут быть положены в основу оптимизации условий синтеза наночастиц, установления баланса между полезными свойствами наночастиц серебра, риском побочных эффектов от больших малоактивных частиц и стоимостью конечных продуктов.

Проведенное сравнение результатов по распределению размеров наночастиц, выполненное методами электронной микроскопии с автоматическим анализом и малоуглового рентгеновского рассеяния, дало возможность оценить возможные причины расхождений результатов для аналогичных систем, выявить преимущества использования комбинации этих методов.

На защиту выносятся следующие основные результаты и положения:

- Зависимость интенсивности прошедшего электронного пучка от толщины кристаллической частицы диаметром до 10 нм в окрестности брэгговского положения, немонотонность зависимости для частиц с сильным дифракционным контрастом;

- Полиномиальная модель распределения уровней серого в зависимости от толщины наночастицы на С(ПЭМ) изображениях и алгоритм для измерения диаметров наночастиц, основанный на аппроксимации полиномиальной модели к реальным изображениям;

- Компьютерная программа для распознавания и измерения наночастиц на изображениях Анализатор Наночастиц (АнНа) и результаты тестирования АнНа;

- Модель формирования и стабилизации частиц серебра в водных растворах гомо- и сополимеров МАГ и ДМАЭМ на основе экспериментальных данных о размерах и распределениях по размерам;

- Результаты сравнительного анализа объемных распределений наночастиц серебра и селена, полученных с помощью ПЭМ и МУРР.

Личный вклад автора

- Создание алгоритмов для распознавания изображений наночастиц и измерения размеров наночастиц, их реализация в программе Анализатор Наночастиц (АнНа).

- Определение влияния разной структуры полимеров на размер образующихся наночастиц и создание модели образования наночастиц в растворе полимеров.

- Проведение измерений размеров наночастиц серебра и селена на их (С)ПЭМ-изображениях и анализ кривых малоуглового рентгеновского рассеяния с построением объемных распределений наночастиц и статистический анализ измерений.

- Синтез наночастиц и приготовление части образцов.

Апробация результатов работы

По материалам диссертации опубликовано 4 печатные работы в рецензируемых международных журналах, входящих в список ВАК, и 11 тезисов в материалах международных и национальных конференций.

Материалы, вошедшие в диссертационную работу, докладывались на молодежном конкурсе научных работ ИК РАН в 2014 году.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа состоит из Введения, четырех глав, Заключения и выводов, Благодарностей и списка литературы из 160 наименований. Общий объем диссертации – 151 страница, включая 45 рисунков и 13 таблиц.

Основное содержание работы

Во **введении** содержится обоснование актуальности темы диссертационной работы, сформулированы основные цели и направления исследования, научная новизна и практическая значимость результатов работы, перечислены положения, выносимые на защиту.

В **первой главе** приведены литературные сведения по теме диссертации. Анализ литературы позволяет обосновать актуальность диссертационной работы и сформулировать задачи, решение которых производилось в ходе исследования.

В первом разделе **первой главы** дан обзор основных методов получения наночастиц в водных растворах и обоснована актуальность и необходимость применения методов синтеза в рамках принципов зеленой химии с использованием малотоксичных биосовместимых полимеров, в частности – 2-деокси-2-метакриламидо-*D*-глюкозы (МАГ) и диметиламиноэтилметакрилата (ДМАЭМ) и их сополимеров.

Во втором разделе **первой главы** представлены основные методы дисперсного анализа наночастиц. Для каждого метода указаны получаемые размерные параметры и основные источники погрешностей. Продемонстрировано преимущество электронной микроскопии как аналитического метода, способного селективно давать прямые изображения наночастиц. Подчеркнуто, что статистический анализ размеров наночастиц по их

микрофотографиям сопряжен с большими временными затратами, что обосновывает необходимость развития средств автоматической обработки микрофотографий.

В третьем разделе **первой главы** приведен обзор алгоритмов для анализа изображений, которые могут быть применены для автоматизации процесса статистического анализа наночастиц в электронной микроскопии. В данном разделе также представлены основные теоретические сведения о процессе формирования контраста как аморфных, так и кристаллических наночастиц при различных режимах работы электронного микроскопа, необходимые для разработки методов анализа микрофотографий. Литературный обзор по методам обработки изображений демонстрирует отсутствие надежных средств для анализа изображений наночастиц размерами несколько нанометров, что указывает на необходимость разработки специализированного программного обеспечения.

В первой части **второй главы** обсуждаются особенности формирования контраста наночастиц на (С)ПЭМ-изображениях. Обосновывается, что статистический анализ размеров будет затруднителен при использовании ВРЭМ-изображений наночастиц с фазовым контрастом: ВРЭМ-микроскопия позволяет с высокой точностью установить границы наночастиц, однако количество изображений наночастиц на одном ВРЭМ-снимке невелико, что существенно замедляет сбор надежной статистики. Поэтому для статистического анализа предлагается ограничиться использованием (С)ПЭМ-изображений с амплитудным контрастом.

Подчеркивается, что среди различных типов амплитудного контраста – дифракционного, масс-толщинного и Z-контраста – только в случае дифракционного контраста зависимость $g(t)$ уровня серого g на микрофотографии от толщины кристалла t может иметь немонотонный характер. Продемонстрировано, что данная немонотонность может возникать даже для частиц размером до 10 нм. Действительно, в околобрегговском положении в рамках двухлучевого приближения интенсивность дифрагированного I_k и прошедшего I_0 пучков электронов имеет гармоническую зависимость от толщины кристалла t [7]:

$$I_k(t) = I_{\text{пад}} \left(\frac{\sin(\pi t s_{\text{эфф}})}{s_{\text{эфф}} \xi_k} \right)^2 \quad (1)$$

$$I_0(t) = I_{\text{пад}} - I_k(t)$$

где $I_{\text{пад}}$ – интенсивность падающего пучка, t – толщина кристалла,

$$s_{\text{эфф}} = \sqrt{s^2 + \frac{1}{\xi_k^2}} \quad (2)$$

– эффективная ошибка возбуждения, s – ошибка возбуждения, ξ_k – экстинкционная длина, соответствующая отражению k . Если кристалл находится в точном брегговском положении ($s = 0$), аргумент синуса в (1) (с учетом (2)) приобретает вид: $\pi t s_{\text{эфф}} = \frac{\pi t}{\xi_k}$.

Порядок величины $\frac{\pi t_{\text{max}}}{\xi_k}$ определяет, проявится ли немонотонность функции $I_k(t)$. Если $\frac{\pi t_{\text{max}}}{\xi_k} \ll 1$, то функцию $I_k(t)$ можно считать линейной на всей области изменения толщины от $t = 0$ до $t = t_{\text{max}}$. Однако, если аргумент $\frac{\pi t_{\text{max}}}{\xi_k}$ превышает $\pi/2$, функция $I_k(t)$ будет проявлять немонотонность. Для различных кристаллов значения экстинкционной длины

могут отличаться по порядку величины. В частности, для серебра минимальное значение ξ_k будет для отражения 111: $\xi_{111} = 28.40$ нм (200 кэВ), при этом для сферической частицы ($t_{max} = d$) $\frac{\pi d}{\xi_{111}} = 1.1$ при $d = 10$ нм, т.е. приближение $\frac{\pi t_{max}}{\xi_k} \ll 1$ в формуле (1) не выполняется. При отклонении частицы от точного брегговского положения ($s > 0$) аргумент синуса $\pi d s_{\text{эфф}}$ будет лишь увеличиваться вследствие роста ошибки возбуждения s , что приведет к тому, что по мере увеличения толщины t от 0 до d интенсивность дифрагированного пучка, достигнув максимального значения, будет уменьшаться. Таким образом, даже для частиц размером 10 нм в диаметре будет проявляться немонотонность зависимости $I(t)$, а значит и $g(t)$, т.к. g и I связаны между собой линейной передаточной функцией CCD-камеры.

За рамками двухлучевого приближения (т.е. с учетом слабых отражений) аналогичные зависимости не могут быть выражены аналитически. Данная задача может быть решена численно, в частности, в программе JEMS [8]. На **рис. 1** приведены полученные в JEMS зависимости относительной интенсивности от толщины наночастицы серебра в оси зоны [110] для прошедшего и дифрагированных пучков. Из **рис. 1** видно, что немонотонность может наблюдаться даже для частиц серебра диаметром 5 нм, что согласуется с приведенными выше численными оценками.

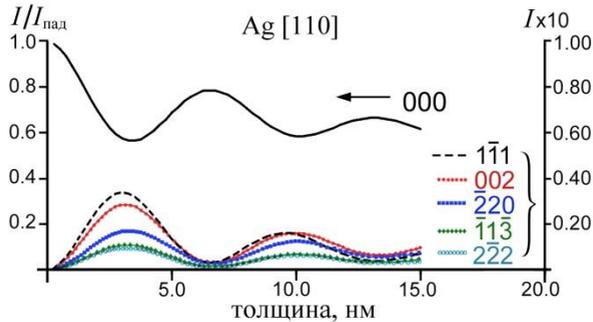


Рис. 1. Моделированные с помощью JEMS зависимости интенсивностей прошедшего и дифрагированных пучков от толщины наночастицы серебра в оси зоны [110].

С помощью численного моделирования показано, что большинство наночастиц диаметром 10 нм будут обладать дифракционным контрастом, которому свойственна немонотонность зависимости $g(t)$ уровня серого g от толщины частицы t . Относительные доли частиц с различным типом контраста в зависимости от их диаметра были определены методом Монте-Карло. Написанной программой генерировалось $n = 10^6$ пар случайных значений полярного $0 \leq \theta \leq \pi$ и азимутального $0 \leq \varphi \leq 2\pi$ углов, определяющих направление падающего пучка электронов относительно частицы заданного диаметра. Расстояние от узла обратной решетки до сферы Эвальда, при превышении которого выполнялось условие $I_k \ll I_0$, вычислялось из требования достижения интенсивностью соответствующего дифрагированного пучка по мере поворота частицы от точного брегговского положения первого нуля. Программа фиксировала количество таких направлений (m и p), при которых достаточно близко ($I_k \approx I_0$) к сфере Эвальда располагался только один узел обратной решетки (m) и более одного узла (p). Отношение

t/n задавало, таким образом, относительную долю частиц с дифракционным контрастом в двухлучевых условиях, p/n – в многолучевых условиях, $(n - p - t)/n$ задавало относительную долю частиц с масс-толщинным контрастом. Полученные зависимости относительной доли частиц с различным контрастом от их диаметра приведены на **рис. 2**. Из графика видно, что среди частиц диаметром 10 нм более 20% обладают сильным дифракционным контрастом, формирующимся в двухлучевых условиях, около 75% частиц обладают дифракционным контрастом, формирующимся в многолучевых условиях, масс-толщинным контрастом обладают менее 5% частиц. Таким образом, продемонстрировано, что учет дифракционного контраста является необходимым требованием при разработке алгоритмов измерения размеров наночастиц по их изображениям.

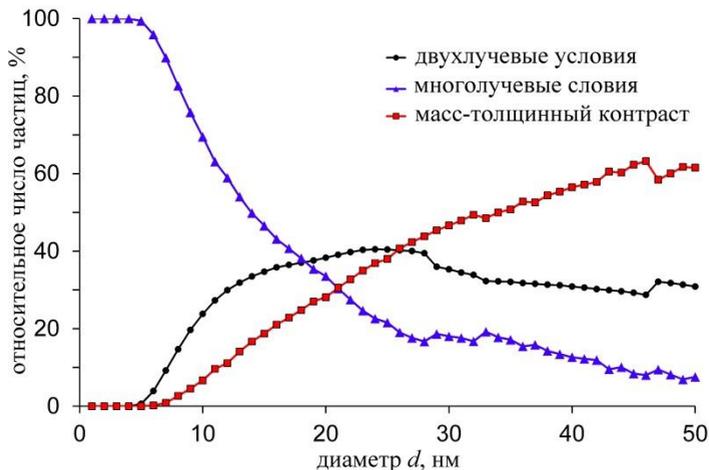


Рис. 2. Зависимость относительного числа Ag частиц с контрастом, формирующимся в условиях двухлучевой (●) и многолучевой дифракции (▲) и частиц с масс-толщинным контрастом (■) от диаметра частицы.

Во второй части **главы 2** описана процедура распознавания изображений наночастиц с помощью пороговой обработки в разработанной программе АнНа. Для распознавания изображений наночастиц был использован метод глобальной пороговой обработки, при котором пользователь устанавливает порог вручную и оценивает корректность распознавания. Данный выбор был продиктован тем, что процесс распознавания оказывается свободным от вмешательства каких-либо алгоритмов, со всегда присущими им недостатками [9,10].

С помощью пороговой обработки в программе производится выделение тех областей (С)ПЭМ-снимка, где изображения частиц присутствуют доподлинно. Пороговая обработка сопровождается операциями «размытия» и «чистки пыли»: первая позволяет подавлять незначительные шумы на изображении, вторая – игнорировать малые группы пикселей шума, распознаваемые как частицы. Для работы с микрофотографиями, имеющими неравномерный фон, вместо использования времязатратной локальной пороговой

обработки (сегментации [11]) программа AnNa была оснащена предложенным в [12] алгоритмом выравнивания фона. Результат вычитания фона показан на **рис. 3**.

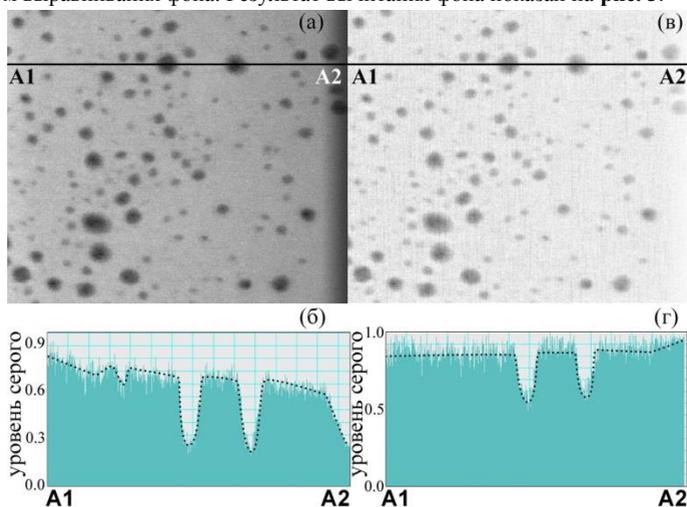


Рис. 3. Светлопольное СПЭМ-изображение с неравномерным фоном в виде темной вертикальной области в правой стороне микрофотографии (а), соответствующий профиль уровня серого вдоль линии А1–А2 (б), это же изображение после вычитания фона с использованием шара радиусом 50 пикселей в программе AnNa (в), соответствующий профиль уровня серого вдоль линии А1–А2 (г).

В третьей части **главы 2** обосновывается эффективность метода измерения размеров наночастиц путем аппроксимации моделированного изображения $g_{\text{модель}}(x, y)$ к реальному изображению частицы на микрофотографии, диаметр частицы в рамках модели по окончании аппроксимации предполагается равным истинному диаметру наночастицы. Преимущества использования метода аппроксимации модели следующие:

- малая чувствительность к шумам, так как для измерений используются значения уровней серого каждого пикселя изображения наночастицы и ее окрестности;
- алгоритм учитывает не только абсолютные значения уровня серого, но также использует информацию, содержащуюся в вариациях уровня серого от пикселя к пикселю;
- аппроксимация модели к реальному изображению частицы не накладывает условия кратности результата значению длины, приходящейся на один пиксель.

В рамках модели $g_{\text{модель}}(x, y)$ сделано приближение, что уровень серого g на изображении зависит только от толщины частицы t в соответствующей точке. Непосредственно в качестве зависимости $g(t)$ предполагается использовать степенной ряд $g(t) = g_0 + g_1 t(x, y) + g_2 t^2(x, y) + g_3 t^3(x, y) + \dots$, так как использование каких-либо сложных функций в модели может существенно замедлить общее время обработки снимка, при этом любая реальная зависимость может быть аппроксимирована полиномом с достаточно высокой старшей степенью. Форм фактор – функция $t(x, y)$ – определяет

модельную форму частицы. В частности, в сферическом приближении $t(x, y)$ выражается как

$$t(x, y) = \begin{cases} \sqrt{\left(\frac{d}{2}\right)^2 - (x - x_c)^2 - (y - y_c)^2}, & \text{если } (x - x_c)^2 + (y - y_c)^2 < \left(\frac{d}{2}\right)^2 \\ 0, & \text{если } (x - x_c)^2 + (y - y_c)^2 > \left(\frac{d}{2}\right)^2 \end{cases}$$

В стержневом – как

$$t(x, y) = \begin{cases} \sqrt{\left(\frac{d}{2}\right)^2 - (-(x - x_c)\sin\alpha + (y - y_c)\cos\alpha)^2}, & \text{если } (x, y) \in \Omega \\ 0, & \text{если } (x, y) \notin \Omega \end{cases}$$

$$\Omega \in \begin{cases} -(x - x_c)\sin\alpha + (y - y_c)\cos\alpha < d/2 \\ -(x - x_c)\sin\alpha + (y - y_c)\cos\alpha > -d/2 \\ (x - x_c)\cos\alpha + (y - y_c)\sin\alpha < L/2 \\ (x - x_c)\cos\alpha + (y - y_c)\sin\alpha > -L/2 \end{cases}$$

Неопределенные коэффициенты g_i , координаты центра (x_c, y_c) , модельный диаметр d и модельная длина L частицы вычисляются в процессе аппроксимации. Для получения распределений наночастиц по размерам представляют интерес размерные параметры d и L частицы в рамках модели, которые принимаются за истинные размерные параметры наночастицы.

Аппроксимацией полиномов с различной старшей степенью к зависимости (1) и зависимостям на **рис. 1** на интервале t от 0 до 10 нм было показано, что полиному со старшей степенью 4 соответствует близкий к единице коэффициент детерминации как в случае двухлучевой, так и в случае многолучевой дифракции. Поскольку зависимость $g(t)$ связана с зависимостью $I(t)$ через линейную передаточную функцию CCD-камеры, соответствие полиномиальной функции реальной зависимости $I(t)$ обеспечивает соответствие полиномиальной функции с той же старшей степенью зависимости $g(t)$ на экспериментальном изображении. Таким образом, для частиц до 10 нм имеет смысл использовать полиномиальную модель со старшей степенью от 2 (для учета возможной немонотонности) до 4.

В четвертой части **главы 2** дано описание пользовательского интерфейса программы АнНа и продемонстрированы ее основные функции. На **рис. 4** представлен пользовательский интерфейс программы, а **рис. 5** демонстрирует распознавание изображений наночастиц на ПЭМ-микротографии.

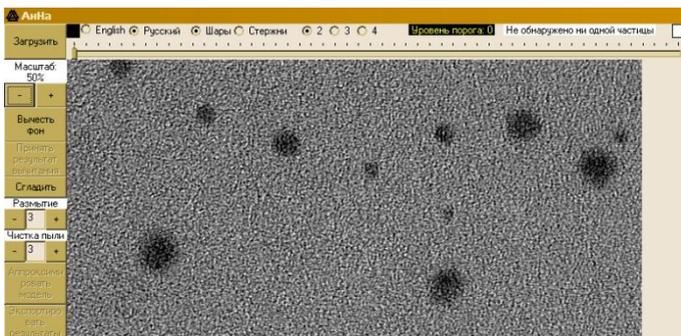


Рис. 4. Пользовательский интерфейс программы АнНа.

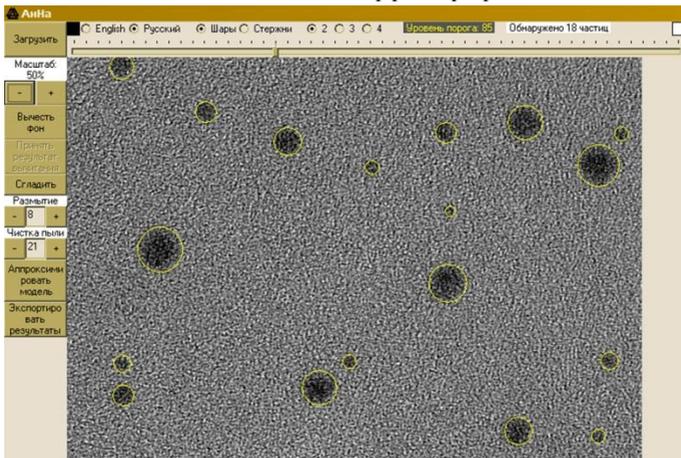


Рис. 5. Пример корректного распознавания изображений наночастиц.

На рис. 6 продемонстрировано, как в программе АнНа удается распознать изображения наночастиц после выравнивания фона на примере СПЭМ-снимка с регистрацией высокоугловых электронов.

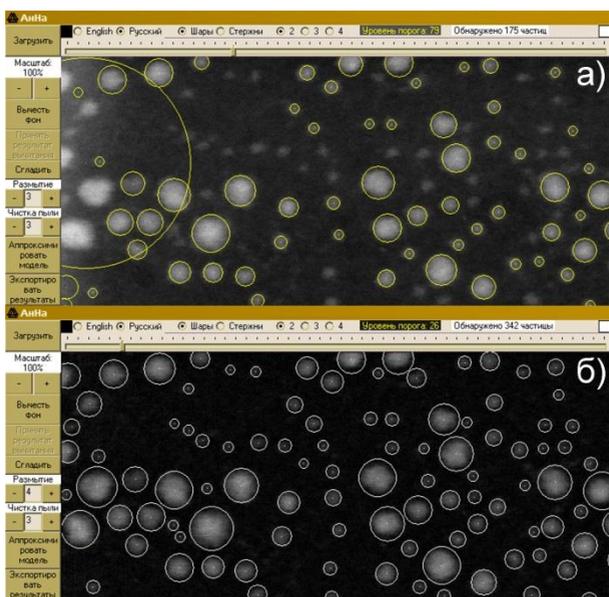


Рис. 6. Пример корректного распознавания изображений наночастиц после выравнивания фона. Оригинальная СПЭМ-микрофотография с регистрацией высокоугловых электронов с неравномерным фоном, на которой частицы определяются некорректно (а), микрофотография после процедуры вычитания фона с корректно распознанными изображениями наночастиц (б).

В пятой части **второй главы** приведены результаты оценок точности измерений программы АнНа. Обработка моделированных ПЭМ-микрофотографий наночастиц заданного размера сферической формы (**рис. 7**), в форме эллипсоидов вращения (**рис. 8**), сферической формы на аморфной углеродной подложке (**рис. 9**) и цилиндрической формы (**рис. 10**), полученных в программе JEMS, показала, что относительная ошибка измерений не превышает 10% и снижается с увеличением размера наночастицы и старшей степени полиномиальной модели.

В шестой части **второй главы** приведены результаты сравнительного анализа полученных с помощью измерений вручную, программы АнНа и доступных программ Pebbles и ImageJ распределений наночастиц серебра, синтезированных в водных растворах полимеров. Сравнительный анализ продемонстрировал, что распределения, полученные с помощью программы АнНа, согласуются с распределениями, полученными измерениями вручную. Однако при использовании программы АнНа надежная статистика была получена в течение нескольких минут.

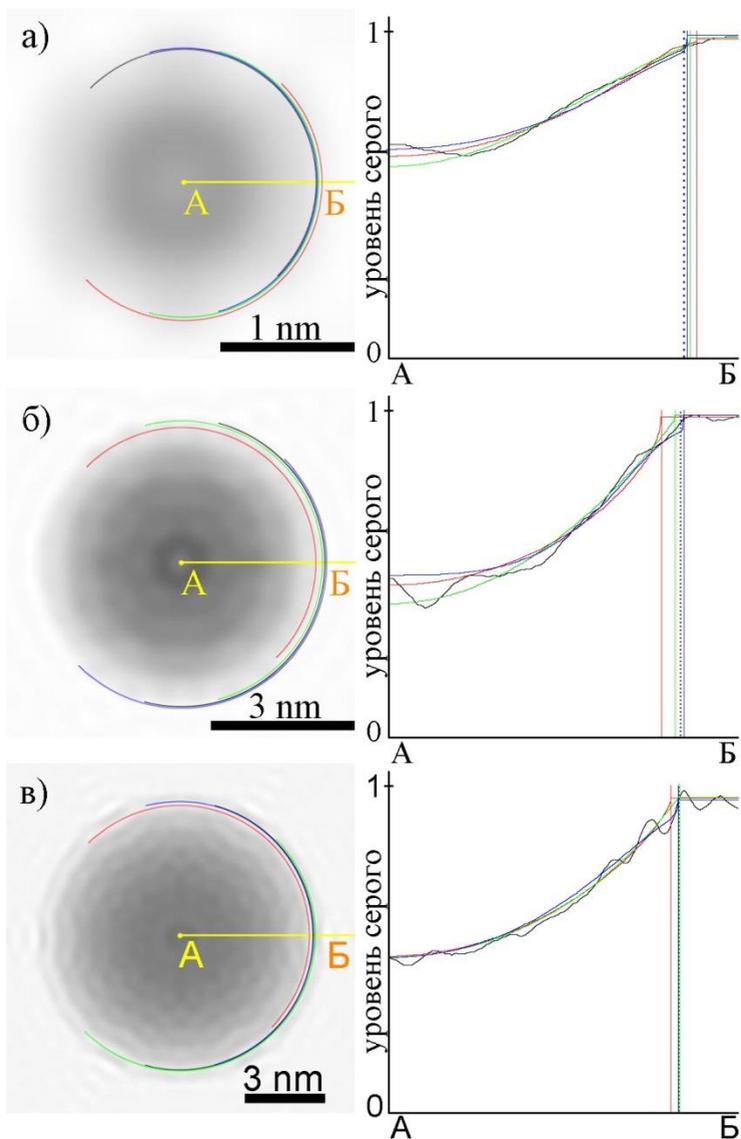


Рис. 7. Моделированные ПЭМ-изображения сферических наночастиц серебра в ориентации $[111]$ диаметром 2 (а), 4 (б), 6 (в), 8 (г) и 10 (д) и соответствующие радиальные распределения уровня серого изображения (—) и аппроксимированных полиномиальных моделей со старшей степенью 2 (---), 3 (---), 4 (---), истинные границы наночастиц и границы в рамках моделей аналогичными цветами показаны дугами на микрофотографиях и вертикальными линиями на распределениях.

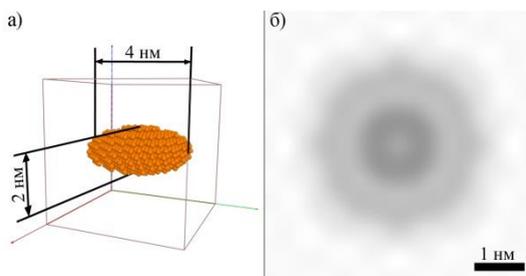


Рис. 8. 3D-изображение эллиптической наночастицы серебра диаметром 4 нм (а) и соответствующее моделированное ПЭМ-изображение (б), полученные в JEMS.

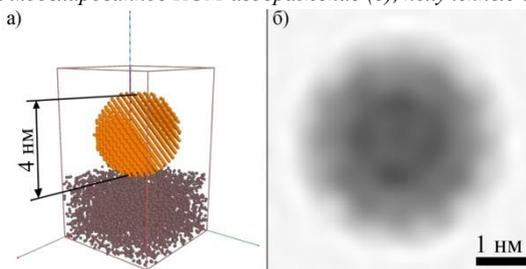


Рис. 9. 3D-изображение сферической наночастицы серебра на углеродной подложке диаметром 4 нм (а) и соответствующее моделированное ПЭМ-изображение (б), полученные в JEMS.

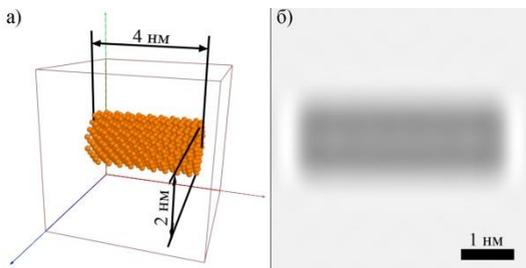


Рис. 10. 3D-изображение цилиндрической наночастицы серебра длиной 4 нм (а) и соответствующее моделированное ПЭМ-изображение (б), полученные в JEMS.

В главе 3 описаны результаты проведенного с помощью программы AnNa статистического анализа наночастиц серебра, синтезированных с использованием гомополимеров МАГ и ДМАЭМ, а также их сополимеров; описана предложенная модель роста наночастицы, учитывающая количество восстанавливающих центров в мономерах МАГ и ДМАЭМ.

Анализ литературы [13–15] позволяет сделать вывод, что мономер ДМАЭМ может восстановить один ион Ag^+ , тогда как мономер МАГ – до четырех ионов Ag^+ . Молекулярная масса мономера ДМАЭМ составляет 157 Да, МАГ – 247 Да. С учетом этих значений и значений молекулярных масс полимерных цепей были вычислены среднее число $\langle i \rangle$ ионов Ag^+ (число восстанавливающих центров), которое может восстановить

мономер в полимере с известным мольным соотношением [МАГ]:[ДМАЭМ], и длины полимерных цепей (табл. 1).

Для всех образцов с помощью программы AnNa было получено более 1000 измерений диаметров наночастиц. С использованием набранной статистики построены как распределения по размерам числа частиц, так и распределения по размерам полного объема серебра. Были определены модовые и средние диаметры распределений, дисперсии распределений, объемные доли наночастиц менее 10 нм и объемные доли больших наночастиц с хвостов распределений (табл. 2).

Таблица 1. Молекулярная масса, среднее число восстанавливающих центров в мономере $\langle i \rangle$ и длины использованных полимеров в зависимости от мольной доли ДМАЭМ.

Мольная доля ДМАЭМ α , %	Молекулярная масса, кДа	$\langle i \rangle$	Длина полимера, нм
100.0%	22.0	1.00	21
75.0%	46.0	1.75	38
70.7%	37.0	1.88	30
47.0%	19.0	2.59	14
18.0%	77.0	3.46	50
0.0%	73.0	4.00	44

Таблица 2. Параметры распределений и объемные доли частиц до 10 нм и частиц с хвостов распределений.

Полимер	Мольная доля ДМАЭМ α , %	Модовый диаметр, нм	Средний диаметр, нм	Дисперсия, нм	Объемная доля частиц с диаметром менее 10 нм, %	Объемная доля частиц с хвоста распределений, %
ДМАЭМ	100.0	4	2.34	0.89	100	0
МАГ-ДМАЭМ	75.0	8	8.62	2.48	42	1
МАГ-ДМАЭМ	70.7	8	7.04	3.33	48	33
МАГ-ДМАЭМ	47.0	14	13.27	3.68	2	29
МАГ-ДМАЭМ	18.0	бимод.	7.57	4.88	8	4*
		6 и 16				
МАГ	0.0	4	5.99	5.81	6	94

*объемная доля справа от второго пика

Самые маленькие наночастицы с узким распределением были получены при использовании гомополимера ДМАЭМ. Все наблюдаемые в данном образце частицы не превышают 10 нм в диаметре. При использовании гомополимера МАГ также были получены наночастицы серебра с малым модовым диаметром, однако распределение

оказалось широким, имелось большое количество наночастиц >10 нм. Оказалось, что сополимеризация ДМАЭМ и МАГ приводит к увеличению как диаметров наночастиц, так и ширины распределений частиц по размерам, в распределениях полного объема серебра появляются выраженные хвосты.

Была предложена модель роста наночастицы, учитывающая количество восстанавливающих центров в каждом мономере, которая позволяет связать величину модового диаметра наночастицы и мольное соотношение мономеров [МАГ]:[ДМАЭМ] в молекуле используемого полимера.

В рамках модели предполагается, что наиболее вероятным является механизм, при котором стабилизация наночастицы осуществляется теми же молекулами полимера, что участвовали в восстановлении атомов, образовавших данную наночастицу.

С учетом того, что длина С-С связи между мономерами составляет 0.15 нм, показано, что данному механизму соответствует зависимость:

$$d_{\text{модовый}} = 4.6 \times (4 - 3\alpha) \text{ [нм]} \quad (3)$$

На **рис. 11** изображены графики экспериментальной и теоретической зависимости модового диаметра наночастицы серебра от мольной доли ДМАЭМ α в полимере-восстановителе (также построены теоретические кривые в предположении, что МАГ имеет 1, 2 или 3 восстанавливающих центра). Как видно из графика, наилучшее согласование между теорией и экспериментом наблюдается для $i_{\text{МАГ}} = 4$.

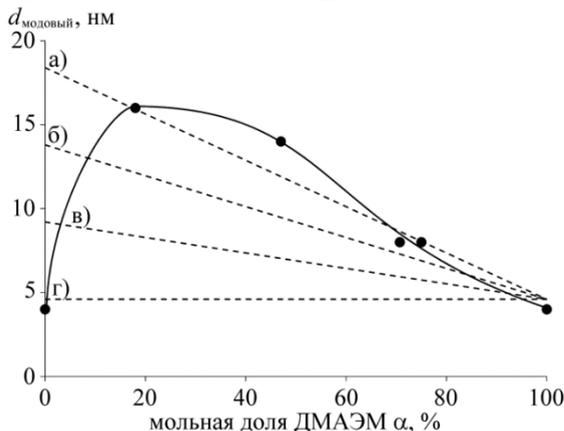


Рис. 11. Экспериментальная (—●—) и теоретические (---) зависимости модового диаметра от мольной доли ДМАЭМ в полимере-восстановителе для числа восстанавливающих центров в мономере МАГ $i_{\text{МАГ}} = 4$ (а), $i_{\text{МАГ}} = 3$ (б), $i_{\text{МАГ}} = 2$ (в) и $i_{\text{МАГ}} = 1$ (г).

Однако наилучшим образом экспериментальные значения согласуются с теоретическими в области $0 < \alpha < 100\%$ (рис. 11), т.е. для случая сополимеров в качестве восстановителей. В работах [4–6] отмечалось, что аминогруппы полимеров способны координировать ионы металлов, создавая благоприятное для их восстановления микроокружение, и предполагалось, что более высокие скорости реакции в случае сополимеров обусловлены не только совместным восстановлением ионов Ag^+ звеньями МАГ и ДМАЭМ, но и оптимальными условиями протекания процесса восстановления,

обеспеченными распределением звеньев по цепи сополимера. Таким образом, гомогенность состава полимера можно считать границей применимости предложенной модели, т.к. в данном случае присутствует только один тип мономеров.

Проверка взаимной роли мономеров в процессе восстановления ионов серебра была произведена путем статистического анализа наночастиц, синтезированных с использованием физических смесей гомополимеров МАГ и ДМАЭМ с общими мольными соотношениями, близкими к мольным соотношениям в использованных сополимерах (табл. 2). Результаты продемонстрировали, что типичного для сополимеров увеличения модового диаметра в распределении наночастиц при использовании физических смесей гомополимеров не происходит. Распределения по размерам наночастиц, полученных с использованием смеси гомополимеров, представляют собой суперпозицию распределений по размерам наночастиц, синтезированных с помощью поли-ДМАЭМ и поли-МАГ. Полученный результат позволяет, во-первых, предположить, что при наличии полимеров двух типов формирование наночастиц происходит независимо при участии каждого гомополимера, во-вторых, подтверждает наличие взаимного влияния мономеров МАГ и ДМАЭМ на процесс формирования наночастицы, если данные мономеры находятся в одной полимерной цепи.

В четвертой главе описаны результаты статистического анализа наночастиц серебра и селена, проведенного в рамках просвечивающей электронной микроскопии и малоуглового рентгеновского рассеяния, указаны причины ошибок в статистическом анализе размеров частиц для обоих методов как для моно-, так и для полидисперстных систем.

В табл. 3 приведены полученные с помощью обеих методик значения модовых диаметров распределений объема наночастиц серебра.

Таблица 3. Модовые диаметры полученных в рамках ПЭМ и МУРР объемных распределений наночастиц серебра.

Мольная доля ДМАЭМ α , %	Модовый диаметр объемного распределения, нм	
	(С)ПЭМ	МУРР
12.0	17±2	12±2
44.5	13±2	17±2
100.0	3±2	7±2

Значения модовых диаметров объемных распределений, а также дисперсии распределений наночастиц селена представлены в табл. 4.

Таблица 4. Модовые диаметры полученных в рамках (С)ПЭМ и МУРР объемных распределений наночастиц селена.

Полимер-восстановитель	Модовый диаметр объемного распределения, нм	
	(С)ПЭМ	МУРР
ПВП	53±2	20±3
ПАМС	65±2	29±4

Для сравнительного анализа результатов в рамках ПЭМ и МУРР были исследованы морфологические характеристики наночастиц серебра, синтезированных с помощью сополимеров МАГ-ДМАЭМ с мольными соотношениями $[МАГ]:[ДМАЭМ] = 88.0\%:12.0\%$ и $55.5\%:44.5\%$ и гомополимера ДМАЭМ, а также наночастицы селена, синтезированные с

использованием поли-2-акриламидо-2-метил-1-пропан сульфокислоты (ПАМС) и поливинилпирролидона (ПВП).

Большие значения модовых диаметров мономодальных объемных распределений наночастиц Ag в рамках МУРР могут быть объяснены образованием полимерной оболочки на поверхности наночастиц. В рамках метода МУРР результирующий диаметр наночастицы – это внешний диаметр полимерной оболочки, покрывающей наночастицу. В случае наночастиц Ag, синтезированных с использованием МАГ-ДМАЭМ с мольной долей ДМАЭМ 18.0%, в рамках ПЭМ было установлено бимодальное объемное распределение, в рамках МУРР – мономодальное с пиком на уровне середины между пиками бимодального распределения. Данное расхождение результатов может быть объяснено тем, что первый пик не был зарегистрирован в рамках МУРР ввиду недостаточной концентрации нанометровых частиц. Однако наличие подсистемы из нанометровых частиц все же привело к усреднению вкладов в рассеяние полидисперсной системой, что дало в результате единственный пик объемного распределения, располагающегося между пиками полученного с помощью ПЭМ объемного распределения.

Расхождение результатов для наночастиц Se может быть объяснено их механическими свойствами. Поскольку на микрофотографиях наночастиц селена наблюдались частицы, деформирующиеся при соприкосновении, можно предположить, что при высыхании капли водного раствора коллоида на углеродной подложке частицы деформировались под действием сил поверхностного натяжения, приняли форму эллипсоидов вращения и увеличив свои размеры в латеральных направлениях. Так как в рамках ПЭМ размеры наночастиц измеряются как размеры их проекций, деформация привела к искажению результатов в большую сторону. Рассеяние рентгеновского излучения происходит на частицах в растворе, поэтому данный эффект не проявлялся в случае МУРР-эксперимента.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ

1. Для наночастиц наблюдается как монотонная, так и немонотонная зависимость интенсивности прошедшего электронного пучка от толщины частиц. Установлен немонотонный характер зависимости интенсивности прошедшего пучка от толщины наночастиц до 10 нм в случае дифракционного контраста. Численные расчеты продемонстрировали, что среди наночастиц серебра диаметром 10 нм дифракционным контрастом будут обладать 95% частиц (25% в двухлучевых условиях, 70% в многолучевых условиях), масс толщинным контрастом будут обладать лишь 5% частиц.
2. Показано, что значение старшей степени полиномиальной модели для аппроксимации к реальным изображениям наночастиц должно находиться в интервале от 2 до 4. Изображения частиц, имеющих дифракционный контраст, требуют применения более высокой степени.
3. Разработаны алгоритмы распознавания изображений и измерения размеров наночастиц в (С)ПЭМ. Предложенные алгоритмы реализованы в программе Анализатор Наночастиц (АнНа), создан графический интерфейс программы, реализован вывод результатов измерений в текстовый файл. Проведены верификация программы и сравнительный анализ результатов, полученных с помощью программы АнНа и других известных программ, позволяющих выполнять статистический анализ размеров наночастиц.

4. Анализ результатов морфологического исследования наночастиц серебра и селена, проведенного в рамках методов малоуглового рентгеновского рассеяния и просвечивающей электронной микроскопии, продемонстрировал, что расхождения результатов могут носить систематический характер в зависимости от структуры наночастиц. Для каждого метода указаны их преимущества и ограничения для данных образцов.
5. Установлено взаимное влияние мономеров МАГ и ДМАЭМ на процесс формирования наночастиц, синтезированных с использованием физических смесей гомополимеров МАГ и ДМАЭМ и их сополимеров.
6. На основе проведенных с использованием программы АнНа измерений размеров наночастиц серебра, сформированных в растворах гомополимеров МАГ и ДМАЭМ и их сополимеров с различными мольными соотношениями, предложен механизм образования наночастиц.

ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи

1. **Shvedchenko D.O.**, Nekrasova T.N., Nazarova O.V., Buffat P.A., Suvorova E.I. Mechanism of formation of silver nanoparticles in MAG–DMAEMA copolymer aqueous solutions // J. Nanopart. Res. 2015. Vol. 17. P. 275.
2. **Shvedchenko D.O.**, Volkov V.V., Suvorova E.I. Sizes and size distributions of nanoparticles: Causes of differences in results obtained by transmission electron microscopy and small angle X-ray scattering // Nanosystems: Phys. Chem. Math. 2017. Vol. 8, № 4. P. 1–11.
3. **Shvedchenko D.O.**, Suvorova E.I. Combination of thresholding and fitting methods for measuring nanoparticle sizes and size distributions in (S)TEM // Microsc. Res. Tech. 2017. Vol. 80, № 10. P. 1113–1122.
4. **Шведченко Д.О.**, Суворова Е.И. Новый метод автоматического статистического анализа стабилизированных полимерами наночастиц металлов на электронно-микроскопических изображениях // Кристаллография. 2017. Том 62, № 5. С. 836–843.

Тезисы докладов

1. **Шведченко Д.О.**, Суворова Е.В. Влияние структуры сополимеров на распределение наночастиц серебра по размерам // Междисциплинарный научный форум “MoscowScienceWeek”. Москва, 2014.
2. **Шведченко Д.О.**, Суворова Е.В. Морфологический анализ наночастиц серебра малых размеров (до 5 нм) в электронной микроскопии // XII Курчатовская молодежная научная школа. Москва, 2014.
3. **Шведченко Д.О.**, Суворова Е.В. Автоматизированные измерения диаметров наночастиц серебра в электронной микроскопии // Методы компьютерной диагностики в биологии и медицине. Саратов, 2014. Сборник тезисов докладов. С. 233–235.
4. **Шведченко Д.О.**, Суворова Е.В. Измерения размеров синтезированных в процессе окислительно-восстановительных реакций наночастиц Ag в просвечивающей и сканирующей просвечивающей электронной микроскопии // XXV Российская конференция по электронной микроскопии. Черноголовка, 2014. Сборник тезисов докладов. С. 160–161.
5. **Шведченко Д.О.**, Суворова Е.В. Статистический анализ наночастиц серебра // VIII Московский Международный Конгресс «Биотехнология: состояние и перспективы развития». Москва, 2015. Сборник тезисов докладов. С. 228–229.
6. **Шведченко Д.О.**, Суворова Е.В. Механизм роста наночастиц серебра в присутствии сополимеров на основе винилсахарида МАГ и метакрилата ДМАЭМ // Вторая молодежная научно-техническая конференция с международным участием «Инновации в материаловедении». Москва, 2015. Сборник тезисов докладов. С. 260–262.
7. **Dmitry O. Shvedchenko**, Elena I. Suvorova, TEM-STEM study of the mechanism of Ag nanoparticles formation in copolymer aqueous solutions // 12-th Multinational Congress on Microscopy. Эгер, Венгрия, 2015. Bookofabstracts. P. 573–574.
8. **Шведченко Д.О.**, Суворова Е.И. Методы аппроксимации как средство автоматизированного измерения диаметров наночастиц серебра по ПЭМ/СПЭМ-изображениям // VI Всероссийская молодежная конференция по фундаментальным и

- инновационным вопросам современной физики. Москва, 2015. Сборник тезисов докладов. С. 112.
9. **Шведченко Д.О.**, Суворова Е.И. Программа Automatic Nanoparticle Numetartor (ANN) для измерения диаметров наночастиц в ПЭМ/СПЭМ // XXVI Российская конференция по электронной микроскопии и в рамках Конференции 4-я Школа молодых ученых «Современные методы электронной и зондовой микроскопии в исследованиях наноструктур и наноматериалов». Зеленоград, 2016. Сборник тезисов докладов. С. 326–327.
 10. **Dmitry Shvedchenko**, Elena Suvorova Recognition and measurements of nanoparticles in TEM/STEM images by fitting the model grayscale distribution to the real one: new approach for automated statistical analysis // The 16-th European Microscopy Congress. Лион, Франция, 2016. DOI: 10.1002/9783527808465.EMC2016.6120
 11. E. Suvorova, **D. Shvedchenko** A simple way to count and measure polymer stabilized nanoparticles in (S)TEM images // Microscopy Conference. Лозанна, Швейцария, 2017. Book of abstracts. P. 346–347.

СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sheng W. et al. Size Influence on the Oxygen Reduction Reaction Activity and Instability of Supported Pt Nanoparticles // *J. Electrochem. Soc.* 2012. Vol. 159, № 2. P. B96.
2. Jiang L. et al. Size-Dependent Activity of Palladium Nanoparticles for Oxygen Electroreduction in Alkaline Solutions // *J. Electrochem. Soc.* 2009. Vol. 156, № 5. P. B643.
3. Kang S.H., Sung Y.-E., Smyrl W.H. The Effectiveness of Sputtered PtCo Catalysts on TiO₂ Nanotube Arrays for the Oxygen Reduction Reaction // *J. Electrochem. Soc.* 2008. Vol. 155, № 11. P. B1128.
4. Sun H. et al. Synthesis and characterization of novel four-arm star PDMAEMA-stabilized colloidal silver nanoparticles // *Colloid Polym. Sci.* 2010. Vol. 288, № 18. P. 1713–1722.
5. Sun H. et al. Star-PDMAEMA- β -CD-Stabilized Colloidal Gold Nanoparticles: Synthesis, Characterization and pH-Controlled Assembly // *J. Macromol. Sci. Part A.* 2011. Vol. 48, № 4. P. 291–298.
6. Nekrasova T.N. et al. Silver nanocomposites based on (Co)polymers of 2-deoxy-2-methacrylamido-D-glucose, N-vinylamides, and aminoacrylates // *Dokl. Chem.* 2012. Vol. 446, № 2. P. 212–214.
7. Хирш П., Хови А., Николсон Р. Электронная микроскопия тонких кристаллов. Москва: Мир, 1968.
8. Stadelmann P. JEMS [Electronic resource] // Stadelmann, P. (2017). Java Electron Microscopy Software (JEMS), demo-(student) version. Available at. URL: <http://www.jems-saas.ch>.
9. Fleuret F. et al. Comparing machines and humans on a visual categorization test // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2011. Vol. 108, № 43. P. 17621–17625.
10. Ullman S. et al. Atoms of recognition in human and computer vision // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2016. Vol. 113, № 10. P. 2744–2749.
11. Cervera Gontard L., Ozkaya D., Dunin-Borkowski R.E. A simple algorithm for measuring particle size distributions on an uneven background from TEM images // *Ultramicroscopy.* Elsevier, 2011. Vol. 111, № 2. P. 101–106.
12. Sternberg S.R. *Biomedical Image Processing // Computer* (Long. Beach. Calif). 1983. Vol. 16, № 1. P. 22–34.
13. Korzhikov V.A. et al. Water-soluble aldehyde-bearing polymers of 2-deoxy-2-methacrylamido-D-glucose for bone tissue engineering // *J. Appl. Polym. Sci.* 2008. Vol. 108, № 4. P. 2386–2397.
14. Darroudi M. et al. Effect of accelerator in green synthesis of silver nanoparticles // *Int. J. Mol. Sci.* 2010. Vol. 11, № 10. P. 3898–3905.
15. Vassilyev Y.B., Khazova O.A., Nikolaeva N.N. Kinetics and mechanism of glucose electrooxidation on different electrode-catalysts. Part II. Effect of the nature of the electrode and the electrooxidation mechanism // *J. Electroanal. Chem.* 1985. Vol. 196, № 1. P. 127–144.