

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
«КРИСТАЛЛОГРАФИЯ И ФОТОНИКА»
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»

На правах рукописи

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

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата физико-математических наук

Научный руководитель:
доктор физико-математических наук, ведущий научный сотрудник
Суворова Елена Игоревна

Москва 2018

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	13
1.1. Основные методы получения наночастиц	13
1.2. Экспериментальные методы исследования морфологии наночастиц	18
1.3. Анализ размеров и распределений по размерам наночастиц на изображениях	35
<i>1.3.1. Типы контраста в просвечивающей электронной микроскопии</i> ...	35
<i>1.3.2. Методы обработки изображений наночастиц в ПЭМ</i>	39
ГЛАВА 2. РАЗРАБОТКА АЛГОРИТМОВ ДЛЯ МОРФОЛОГИЧЕСКОГО АНАЛИЗА НАНОЧАСТИЦ НА ЭЛЕКТРОННО-МИКРОСКОПИЧЕСКИХ ИЗОБРАЖЕНИЯХ	52
2.1. Особенности формирования контраста наночастиц на (С)ПЭМ изображениях.....	52
2.2. Пороговая обработка изображений для распознавания наночастиц размером до 10 нм.....	58
2.3. Определение размеров наночастиц: аппроксимация полиномиальной модели к изображениям.....	63
2.4. Архитектура компьютерной программы «Анализатор Наночастиц» (АнНа).....	73
2.5. Тестирование программы АнНа и оценка точности измерений.....	78
2.6. Сравнительный анализ результатов измерений, проведенных с помощью программы АнНа и другими методами.....	91
2.7. Выводы к главе 2.....	97
ГЛАВА 3. РАЗРАБОТКА МОДЕЛИ ОБРАЗОВАНИЯ И СТАБИЛИЗАЦИИ НАНОЧАСТИЦ ИЗ ИОНОВ СЕРЕБРА, ВОССТАНОВЛЕННЫХ С ПОМОЩЬЮ ПОЛИМЕРОВ	99
3.1. Гомолимеры МАГ и ДМАЭМ и сополимеры МАГ-ДМАЕМ - восстановители и стабилизаторы наночастиц серебра в растворах.....	99

3.2. Влияние структуры полимеров на размер наночастиц.....	103
3.3. Механизм восстановления и образования наночастиц.....	109
3.4. Выводы к главе 3.....	120
ГЛАВА 4. СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ РАЗМЕРОВ НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА И СЕЛЕНА И ИХ РАСПРЕДЕЛЕНИЙ ПО ДАННЫМ ПРОСВЕЧИВАЮЩЕЙ ЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ И МАЛОУГЛОВОГО РЕНТГЕНОВСКОГО РАССЕЯНИЯ.....	122
4.1. Морфологический анализ наночастиц серебра.....	123
4.2. Морфологический анализ наночастиц селена.....	127
4.3. Применение комбинации методов ПЭМ и МУРР для всестороннего исследования наночастиц в растворе.....	130
4.4. Выводы к главе 4.....	132
ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ.....	133
БЛАГОДАРНОСТИ.....	136
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	137

ВВЕДЕНИЕ

Композиты на основе полимеров с наночастицами металлов и неметаллов обладают важными кумулятивными свойствами, берущими начало в природе как неорганических компонент, так и полимеров. Свойства наночастиц находятся в непосредственной связи с их размерами [1–3], им присущи квантовые размерные эффекты, большая удельная площадь поверхности, высокая адсорбционная способность, химическая и биологическая активность, в то время как полимерные матрицы в композите обеспечивают растворимость композита, устойчивость наночастиц к агломерации и осаждению, а также обладают биологической активностью. Основными потребителями наночастиц являются био- и медицинские отрасли, индустрия катализаторов, электронных и оптических материалов. В то же время живым организмам все сильнее угрожает загрязнение окружающей среды наночастицами мелкодисперсной сажи, тяжелых металлов и их солей. Соблюдение баланса между реакционной способностью и безопасностью использования наночастиц малых размеров в настоящее время оказалось жизненно важной проблемой, решение которой в первую очередь обеспечивается надежным детектированием частиц и определением их характеристик с использованием современных исследовательских методов.

Статистический анализ размеров наночастиц приобретает возрастающую роль, так как в настоящее время основными требованиями при производстве наночастиц и композитов с их участием является размер частиц менее 10 нм в диаметре и монодисперсность. Это обеспечивает заметный контролируемый эффект, критически важный в био- и медицинской областях, тогда как полидисперсные системы не обладают необходимой селективностью. Информация о размерах наночастиц и их распределениях необходима для фундаментальных исследований механизма образования наночастиц в различных системах, так как она обеспечивает

возможность установления механизма формирования частиц и оценки степени влияния среды на их морфологические характеристики.

Определение размеров наночастиц необходимо как с точки зрения решения фундаментальных задач, так и с точки зрения разработки всевозможных приложений, так как размеры наночастиц являются критерием качества и эффективности их производства.

Наночастицы всегда были привлекательными объектами исследования в электронной микроскопии, обладающей неоспоримым преимуществом визуализации наночастиц, что позволяет измерять их размеры в прямом пространстве. Однако статистический анализ размеров нанометровых частиц осложняется необходимостью обработки значительного числа изображений и зачастую их низким контрастом на подложке.

Комбинация методов аналитической просвечивающей электронной микроскопии и рентгеновской дифрактометрии, с одной стороны, позволяют получить информацию о структуре и размерах наносистем вплоть до атомного уровня, а с другой стороны, обеспечивают возможность относительно быстрого исследования в промышленном масштабе усредненных параметров (размера, объема) частиц непосредственно в растворах.

Научный интерес к наночастицам серебра определяется их высокой реакционной способностью, которая используется для производства антимикробных препаратов на фоне повышающейся резистентности бактерий к антибиотикам. Композиты, включающие в свой состав нанодисперсное серебро, выступают как антигипоксические, адаптогенные и иммуностимулирующие агенты. Как правило, для восстановления ионов серебра используются токсичные восстановители, такие как гидрат гидразина или борогидрид натрия. Однако в настоящее время есть возможность синтезировать наночастицы серебра в рамках принципов зеленой химии, используя биосовместимые и экологически безвредные технологии, в частности, водорастворимые полимеры. Размеры наночастиц серебра,

образующихся в полимерных растворах, в значительной степени зависят от структуры и состава полимеров и, в конечном счете, являются индикатором для определения последовательности этапов формирования частиц из атомов и кластеров. В то же время наличие в образцах больших малоэффективных частиц приводит, во-первых, к перерасходу дорогого сырья, во-вторых, к росту риска побочных эффектов, вызванных отложением частиц металла в тканях. Поэтому задача диагностики наночастиц оказывается актуальной не только с точки зрения контроля их свойств, но и с точки зрения безопасности препарата и его экономической рентабельности. Установление надежной взаимосвязи между условиями получения наночастиц и их морфологическими характеристиками позволит синтезировать материалы с заданными свойствами.

Актуальность темы исследования.

Актуальными и важными задачами являются развитие методов обнаружения и диагностики наночастиц и их статистический анализ, что в конечном итоге позволяет определить наиболее эффективный путь синтеза наночастиц для их последующего применения.

Исследование влияния различных инструментальных факторов и повышение требований к надежности получаемых данных постоянно стимулируют развитие методов их обработки. Универсальных автоматических методов распознавания изображений, сравнимых по эффективности с восприятием графических образов человеческим глазом, не разработано [1,2]. Детектирование нанометровых частиц (особенно до 10 нм) на подложках или внедренных в полимерные матрицы и дифференцирование от различных неоднородностей осложняются наличием сильного шума на изображениях. Поэтому создание алгоритмов для распознавания наноразмерных объектов на электронно-микроскопических изображениях является одной из центральных задач в области искусственного интеллекта вообще и компьютерного зрения в частности.

Цель 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 были поставлены 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-метакриламидо-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, связывающая 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 работы

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 Института кристаллографии им. А.В. Шубникова <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.

Основные положения, выносимые на защиту

- 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 диссертанта

- 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 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.

Результаты работы докладывались и обсуждались на следующих конференциях:

- Междисциплинарный научный форум “Moscow Science Week”. Москва, 2014.
- XII Курчатовская молодежная научная школа. Москва, 2014.
- Методы компьютерной диагностики в биологии и медицине. Саратов, 2014.
- XXV Российская конференция по электронной микроскопии. Черноголовка, 2014.
- VIII Московский Международный Конгресс «Биотехнология: состояние и перспективы развития». Москва, 2015.
- Вторая молодежная научно-техническая конференция с международным участием «Инновации в материаловедении». Москва, 2015.
- 12-th Multinational Congress on Microscopy. Эгер, Венгрия, 2015.
- VI Всероссийская молодежная конференция по фундаментальным и инновационным вопросам современной физики. Москва, 2015.
- 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.
- The 16-th European Microscopy Congress. Лион, Франция, 2016.
- Microscopy Conference. Лозанна, Швейцария, 2017.

Основные результаты работы отражены в следующих публикациях:

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.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Основные методы получения наночастиц.

Естественные и рукотворные наночастицы встречаются в большом количестве во всех областях биосферы [3]. Природные и побочные антропогенные – не находят применения в промышленности и, как правило, наносят вред окружающей среде. В то же время развитие методов синтеза наночастиц с заданными характеристиками и разработка различных вариантов их практического применения являются одной из характерных черт развития науки и технологий за последние десятилетия: синтезированные наночастицы активно используются в приложениях катализа, энергетики, оптики, электроники и медицины.

Методы получения наночастиц можно разделить на несколько больших групп. К первой группе относятся методы, основанные на быстрой конденсации паров в условиях, препятствующих агрегации и росту образующихся частиц. Ко второй группе относятся методы, при которых наночастицы получают путем измельчения исходного материала. В рамках третьей группы синтез наночастиц производится в пространственно-ограниченных системах – нанореакторах: синтез наночастиц в адсорбционных слоях, обратных мицеллах, в пленках Лэнгмюра–Блоджетт. Подобные методы позволяют синтезировать наночастицы с очень узким распределением, т.к. размер образующихся частиц не может превосходить размер соответствующего нанореактора.

Методы промышленного и лабораторного производства наночастиц также можно условно разделить на методы типа «снизу-вверх» и «сверху-вниз». Синтез «снизу-вверх» подразумевает формирование наночастиц из отдельных атомов и молекул. В рамках синтеза «сверху-вниз» нанометровые частицы получают в процессе измельчения более крупных объектов. В качестве примера методов «снизу-вверх» можно привести лазерное испарение, золь-гель метод [4], гидротермальный синтез, химическое осаждение из газовой фазы, синтез в нанореакторах [5]; методов типа

«сверху-вниз» – механический помол [6,7] и измельчение ультразвуком [8].

Основные методы получения наночастиц представлены в таблице 1.

Таблица 1. Основные методы получения наночастиц.

Метод	ф/х	↑/↓	Особенности	Ссылки
сверхкрипических растворах и синтез в Гидротермальный синтез	ф-х	↑	В основе метода – высокая растворимость неорганических веществ в нагретом растворителе. Метод позволяет получать наночастицы всевозможного состава во всем нанодиапазоне. Распределения по размерам широкие. Затруднен контроль размера и формы наночастиц.	[9–12]
метод Золь-гель	х	↑	Размеры синтезируемых частиц покрывают весь нанодиапазон. Наночастицы с высокой химической однородностью, метод легко реализуется в лабораторных условиях.	[13–16]
фазы Конденсация из газовой	ф	↑	Конденсация наночастиц из насыщенных паров на подложку температурой от комнатной до 500°C. Метод позволяет синтезировать частицы во всем нанодиапазоне. Преимуществами являются высокая скорость получения частиц и экономичность.	[17–20]

Механический помол	φ ↓	<p>Наиболее производительный способ получения больших количеств нанокристаллических порошков. Могут быть получены наночастицы размером от 5 нм, однако уменьшение размера частиц сопряжено со значительным увеличением длительности помола. Вещества с высокой температурой плавления позволяют получить меньший размер наночастиц. Риск сплавления частиц.</p>	[6,7]
Радиационно-химический синтез в растворе	φ-x ↑	<p>Катионы восстанавливаются сольватированными электронами, генерируемыми ионизирующим излучением. Реакция производится в бескислородной среде – в вакууме или атмосфере инертного газа. Наночастицы от 5 нм, выход 10^6–10^8 частиц на каждые 100 эВ поглощенной энергии излучения.</p>	[21–23]
Синтез в нанореакторах	x ↑	<p>Синтез наночастиц производится в пространственно-ограниченных коллоидных системах – нанореакторах, в качестве которых могут использоваться обратные мицеллы, жидкие кристаллы, абсорбционные слои, пленки Лэнгмюра-Блоджетт, микроэмульсии и биомолекулы (белки, ДНК, РНК). Метод отличается высокой степенью монодисперсности синтезируемых частиц. Размеры частиц во всем нанодиапазоне.</p>	[24–27]

Измельчение ультразвуком	Ф	↓	Измельчение частиц происходит вследствие ультразвуковой кавитации. Ультразвуковые устройства предельно просты в установке и эксплуатации. Наночастицы от 2 нм. Уменьшение размера наночастиц для пластичных материалов затруднено ввиду их способности релаксировать внутренние напряжения, избегая разрушения.	[28–30]
Фотохимическое восстановление в растворе	Ф-х	↑	Катионы восстанавливаются фотоэлектронами, образующимися под действием электромагнитного излучения лазера, ртутных и ксеноновых ламп. Наночастицы от 10 нм, выход и морфологические характеристики наночастиц зависят от времени облучения	[31–35]
Химический синтез в растворах	х	↑	Наиболее широко распространены: обеспечивают возможность быстрого приготовления коллоидов наночастиц в больших объемах. Синтезируются частицы во всем нанодиапазоне. Распределения по размерам и форма частиц могут меняться с изменением рН, температуры, давления.	[36–43]
Химическое осаждение из газовой фазы	Ф-х	↑	Процесс, при котором наночастицы формируются на нагретой подложке в результате химической реакции из газовой фазы. Химическая реакция требует энергии активации для протекания, которая доставляется термическим нагревом, плазмой, лазерным или УФ-излучением.	[44–47]

Электровзрыв	ф ↓	Наночастицы образуются в результате конденсации паров металла, образовавшихся при испарении проволоки диаметром до 1 мм вследствие прохождения импульса тока длительностью 10^{-5} – 10^{-7} с 10^4 – 10^6 А/мм ² . Метод позволяет синтезировать наночастицы от 10 нм, при этом средний размер частиц монотонно убывает с ростом плотности тока и сокращением длительности импульса.	[48–50]
Электрохимический синтез в растворе	ф-х ↑	Получение наночастиц металлов путем электроосаждения из растворов или расплавов в процессе электролиза. Наночастицы от 10 нм. Высокая химическая чистота и большой выход наночастиц. Метод требует дорогостоящего оборудования и специализированного помещения.	[51–53]

ф – физический метод, х – химический метод, ф-х – физико-химический, ↑ – метод снизу вверх, ↓ – метод сверху вниз.

Осаждение из коллоидных растворов является одной из наиболее востребованных нанотехнологий для получения большого разнообразия наночастиц в результате проведения химических реакций в водных и органических средах. Осаждение из коллоидных растворов используют для получения полупроводниковых наночастиц (сульфидов, селенидов, теллуридов), оксидов (например, оксид титана или оксиды железа), фосфатов (гидроксиапатит) металлов и неметаллов.

Важной задачей метода получения наночастиц из коллоидных растворов является предотвращение их коалесценции и агломерирования. Для

стабилизации коллоидных растворов могут использоваться природные вещества (желатин, агар-агар, крахмал), синтетические полимеры, различные поверхностно-активные вещества, иногда роль стабилизатора выполняет восстановитель [54–58].

Наночастицы металлов, как правило, получают в результате окислительно-восстановительных реакций, и в качестве восстановителей используются органические и неорганические восстановители. Наиболее часто применяемыми восстановителями являются гидразин (N_2H_4), борогидрид натрия ($NaBH_4$), цитраты (соли лимонной кислоты $Me_n((C_6H_5O_7)_m)$), глюкоза, аскорбиновая кислота, гидрохинон, формальдегид и др.

В настоящее время актуальной задачей нанотехнологий является следование принципам зеленой химии, и двенадцать принципов которой становятся классическим руководством при разработке новых экологически безвредных методов синтеза наночастиц.

Побочные эффекты воздействия самих наночастиц по-прежнему остаются предметом многочисленных исследований. В этой связи отсутствие токсичных реагентов в синтезе поможет более точно оценить эффект наночастиц в живых организмах. В качестве восстановителей и стабилизаторов рассматриваются витамины, сахара, экстракты растений и различные полимеры. При этом синтез наночастиц серебра является приоритетным ввиду своей сравнительной простоты и антимикробных свойств серебра.

1.2. Экспериментальные методы исследования морфологии наночастиц.

Современное развитие нанотехнологий, сопровождаемое уменьшением размеров производимых объектов, требует развития существующих и разработки новых методов диагностики наноструктур, позволяющих получать наиболее полную информацию об их структуре, свойствах и морфологии.

Просвечивающая и сканирующая электронная микроскопия, зондовая микроскопия являются прямыми методами, позволяющими визуализировать наночастицы и непосредственно измерять их размеры на изображениях. Дифракционные и спектрометрические методы (динамическое рассеяние света, порошковая дифрактометрия, акустическая спектроскопия, аналитическое центрифугирование, системы анализа дифференциальной электрической подвижности, малоугловое рентгеновское и нейтронное рассеяние) дают возможность оценить средний размер частиц в образцах и получить интегральную информацию об ансамблях наночастиц, основываясь на теоретической связи измеряемой физической величины с размерами наночастиц [59–61].

Каждый из этих методов имеет свои преимущества и ограничения, в первую очередь – ограничения интервала размеров частиц, на котором могут быть получены распределения частиц.

Исследование морфологических характеристик может осложняться многими обстоятельствами [62]. Для непрямых методов характерны 1) различная чувствительность не к истинным размерам наночастиц, а к эффективным (коррелирующим с истинными) размерам наночастиц; 2) алгоритмы, извлекающие из регистрируемого сигнала информацию о морфологических характеристиках наночастиц, допускают неоднозначный результат и могут требовать предварительных гипотез о форме и структуре частиц; 3) в основу алгоритмов могут быть положены несовершенные физические модели; 4) точность результатов снижается при слишком низкой или высокой для конкретного метода концентрации наночастиц, также точность снижается при достижении частицами наноразмерного уровня, являющегося физическим пределом для многих методов; 5) агрегация частиц может существенно исказить результат. В случае применения прямых методов, электронной и атомно-силовой микроскопии, существует риск исследовать непредставительную выборку наночастиц.

Результаты исследования морфологических характеристик одного и того же образца с помощью разных методов могут значительно отличаться [61,63], так как каждый метод основывается на соответствующем ему физическом явлении, а данные о размерных параметрах образца извлекаются с помощью уникального для каждого метода алгоритма. Для получения взаимодополняющей информации применяются несколько методов.

Ниже подробнее обсуждаются наиболее известные методы морфологического анализа наночастиц, их физические основы, преимущества и ограничения.

Просвечивающая и сканирующая электронная микроскопия. Просвечивающая и сканирующая электронная микроскопия (ПЭМ, СЭМ) позволяют исследовать морфологию, химический и фазовый состав частиц, их структуру в полидисперсных многофазных системах. Интервал размеров исследуемых наночастиц составляет от нескольких сотен нм (СЭМ) до субнанометровых кластеров (ПЭМ).

Изображения в просвечивающем электронном микроскопе формируются магнитными линзами с помощью тонкого пучка релятивистских электронов с энергиями от 60 кэВ до 1 МэВ (и выше в специальных случаях), прошедших через тонкий образец [64]. Длина волны де Бройля электронов составляет значение порядка 10^{-2} Å, что делает возможным определение кристаллической структуры. Электронная микроскопия является эффективным прямым локальным методом анализа наночастиц.

Сканирующая электронная микроскопия позволяет получать изображения-проекции трехмерной поверхности образцов благодаря большой глубине фокуса в отличие от оптической микроскопии. Топографический контраст объектов в СЭМ исследуется в режиме генерации вторичных электронов и используется для исследования структуры поверхности. Исследование в режиме обратно рассеянных электронов позволяет получить фазовый (химический) контраст и сделать оценки о

распределении различных фаз на поверхности образца. С учетом глубины залегания участки образца с высоким атомным номером будут более яркими.

Сканирующая зондовая микроскопия. Сканирующая зондовая микроскопия позволяет восстанавливать форму поверхности образцов и исследовать ее локальные характеристики. В зависимости от конструкции зонда выделяются три типа сканирующих зондовых микроскопов: туннельный, ближнепольный оптический и атомно-силовой.

В сканирующем туннельном микроскопе исследуют проводящие поверхности с помощью металлической иглы, располагающейся на расстоянии нескольких ангстрем от образца. При создании между проводящей поверхностью и иглой разности потенциалов порядка 10 мВ, возникает слабый туннельный ток силой до 10^3 пА. Изменения высоты исследуемой поверхности измеряются путем регистрации изменений туннельного тока.

В основе ближнепольной оптической микроскопии лежит рассеяние излучения оптического диапазона на исследуемой поверхности. Рассеянное излучение регистрируется на расстояниях, не превышающих длину волны излучения. В качестве зонда используется апертура диаметром несколько нанометров, в которую проникает оптическое излучение на расстояние порядка ее диаметра.

В атомно-силовой микроскопии получают информацию о форме поверхности образца в процессе сканирования его поверхности острием кантилевера и регистрации его изгиба. Изменения высоты поверхности образца приводят к изменению силы Ван-дер-Ваальса, действующей на острие зонда [65]. Атомно-силовой микроскоп, в отличие от сканирующего туннельного микроскопа, позволяет получать изображения как проводящих, так и непроводящих поверхностей, и результаты могут быть получены не только в вакууме, но также на воздухе и в жидкости.

Однако регистрируемая поверхность представляет собой не истинную поверхность образца, а свертку истинной поверхности и формы острия

кантилевера, имеющего радиус кривизны около 1–90 нм. Поэтому для точного измерения латеральных размеров наночастиц потребуется производить обратную свертку зарегистрированной поверхности и формы острия кантилевера. Последняя, хотя и определяется экспериментально сканированием тестовых структур с известным рельефом [66], может меняться в процессе эксплуатации микроскопа. Результаты измерений размеров наночастиц в атомно-силовой микроскопии могут быть искажены наличием на подложке шероховатостей, характерные размеры которых сравнимы с размерами наночастиц, неправильным определением формы острия кантилевера, а также агрегацией наночастиц [67].

К недостаткам сканирующей зондовой микроскопии также можно отнести то, что она не позволяет сканировать поверхности с перепадом высот более нескольких микрон, а область сканирования ограничена площадью порядка 10^4 микрон² [68–70].

Малоугловое рентгеновское и нейтронное рассеяние. Малоугловое рентгеновское рассеяние (МУРР) – упругое рассеяние плоской электромагнитной волны рентгеновского диапазона. Эксперименты по малоугловому рентгеновскому рассеянию проводятся на лабораторных рентгеновских дифрактометрах и на экспериментальных станциях источников синхротронного рентгеновского излучения. В лабораторном дифрактометре используется характеристическое рентгеновское излучение, создаваемое электронами с энергией порядка 10–100 кЭв в результате их торможения при попадании в анод. Как правило, используется K_α -линия, а излучение других частот задерживается монохроматорами. На синхротронах рентгеновское излучение создается электронами, двигающимися в кольцевых ускорителях, при прохождении знакопеременного магнитного поля, где траектория электронов искривляется, что вызывает рентгеновское излучение. Синхротрон обеспечивает бóльшую яркость пучка по сравнению с лабораторными источниками.

МУРР – непрямой метод: в результате эксперимента регистрируется только угловое распределение интенсивности рассеянного излучения. Чтобы извлечь информацию о размерах наночастиц требуется изначально знать, либо задаться гипотезой относительно их формы и структуры. Анализ результатов предполагает аппроксимацию модельного профиля, который вычисляется на основе построенной теории рассеяния рентгеновского излучения [71–73] на телах различной формы, размеров и структуры, к экспериментально полученному профилю рассеяния. Метод позволяет исследовать наночастицы размером от 1 нм до нескольких микрон [72].

Достоинством малоуглового рентгеновского рассеяния является то, что образец может быть исследован в своем естественном состоянии, т.к. метод не требует высушивания. Для МУРР не характерны артефакты, обусловленные некорректностью отбора проб, т.к. образец исследуется целиком [74].

Трудности в распознавании маленьких частиц в интервале размеров от 1 до 5 нм в гетерогенных растворах полимеров по профилям рассеяния МУРР заключаются в том, что вид распределения по размерам сильно зависит от формы профиля рассеяния при векторах рассеяния больше, чем $0.5\text{--}1\text{ нм}^{-1}$. Однако на форму профиля в данном интервале также оказывает значительное влияние рассеяние на флуктуациях плотности. Результаты морфологического анализа наночастиц могут искажаться из-за углового и частотного разброса рентгеновского пучка, что должно быть скорректировано. Частицы различной формы, размеров и состава могут давать схожие кривые рассеяния, а морфологические характеристики частиц оказываются часто в зависимости от гипотезы об их форме и структуре для одного и того же профиля [75].

Малоугловое рассеяние нейтронов (МУРН) – упругое рассеяние нейтронов на малые углы, в рамках которого также можно исследовать морфологические характеристики частиц до 1 нм до 1 мкм. МУРН открывает дополнительные экспериментальные возможности, так как позволяет

различать изотопы, а рассеяние нейтронов может быть обусловлено взаимодействием магнитных моментов нейтрона и неспаренных электронов. Дополнительным источником ошибок может выступать наличие некогерентного рассеяния нейтронов [76].

Рентгеновская (порошковая) дифрактометрия. Шеррер показал, что дифракционные линии наноразмерных порошков оказываются шире, чем дифракционные линии тех же порошков с частицами более 100 нм. Шеррер предложил формулу, связывающую ширину дифракционных линий с размерами частиц [77]): $\beta = \frac{K\lambda}{D\cos\theta}$, где β – уширение дифракционного максимума (рад), D – размер области когерентного рассеяния (нм), λ – длина волны излучения (нм), θ – положение дифракционного максимума, K – константа Шеррера. В рамках метода порошковой дифрактометрии размер наночастиц определяется по уширению дифракционного пика [78,79].

В рамках метода Шеррера делаются допущения, что все частицы имеют одинаковый размер и форму, кристаллическая решетка частиц не деформирована, рентгеновское излучение монохроматическое, лучи параллельны. Отклонения от этих допущений являются основными источниками погрешностей. В частности, если размер и форма частиц различны, будут определены средние размеры частиц.

Интервал размеров частиц, которые могут быть измерены в рамках метода порошковой дифрактометрии – от 1 до 100 нм. По причине неизбежных отклонений реальных условий эксперимента от допущений теории получаемые экспериментально размеры частиц могут отличаться от истинных размеров в 1,5–2 раза в большую или меньшую сторону [80].

Динамическое рассеяние света. В основе данного метода лежит анализ флуктуаций интенсивности лазерного излучения рассеянного наночастицами в растворе. Коллоидные частицы в растворе совершают броуновское движение. Рассеянное на таких частицах излучение будет флуктуировать со временем, неся информацию о коэффициентах диффузии наночастиц. Для

флуктуаций интенсивности вычисляется корреляционная функция по виду которой можно определить характерное время корреляции. Последнее обратно пропорционально коэффициенту диффузии рассеивающей частицы. В рамках модели Стокса-Эйнштейна, использующей в качестве параметров температуру коллоида, вязкость и показатель преломления растворителя, коэффициент диффузии связан с диаметром сферической частицы [81–83].

Данный метод позволяет измерять частицы диаметром от 1 нм до нескольких микрон [81] с массовой концентрацией от 0.01 до 40 масс.%. Однако при концентрациях частиц свыше 5 масс.% возникают существенные ограничения, вызванные многократным рассеянием и влиянием взаимодействий между частицами и коллективных процессов на коэффициент диффузии [83].

В качестве достоинств можно выделить то, что измерения весьма быстрые – от нескольких секунд до минут, в качестве растворителя может быть использована любая непоглощающая, относительно чистая и не слишком вязкая жидкость, велик интервал допустимых размеров частиц. Метод динамического светорассеяния является абсолютным, т.е. не требует калибровки спектрометра на образцы наночастиц с известным распределением по размерам [84].

К недостаткам метода динамического рассеяния света можно отнести то, что в качестве истинного размера частицы принимается некоторый эффективный размер, в данном случае – гидродинамический диаметр. Получение информации о форме частиц затруднено [83]. Ошибки измерения могут возникать, если вязкость, температура и показатель преломления среды определены некорректно, имеется заметный вклад поглощения частицами и/или средой и заметный вклад взаимодействия между частицами, имеет место агломерация частиц [85,86].

Акустическая спектроскопия. Метод акустической спектроскопии основан на определении спектра поглощения ультразвуковой волны частотой от 1 до 100 МГц при распространении в жидком коллоиде. Ультразвуковая

волна создается пьезоэлектрическими преобразователями, на которые подается ток определенной частоты. Проходящую через образец механическую волну регистрирует другой пьезоэлектрический преобразователь, который обратно преобразует механические колебания в переменный ток. Сравнение амплитуд токов позволяет установить коэффициент затухания.

При прохождении звуковой волны в коллоиде возникают области повышенного и пониженного давления, вследствие чего возникают токи жидкости. Если плотность наночастиц не совпадает с плотностью растворителя, частицы будут двигаться относительно жидкости. Вязкое трение частиц о жидкость влечет за собой диссипацию механической энергии звуковой волны [87]. Регистрация спектра поглощения ультразвука позволяет восстановить распределение частиц по размерам, т.к. коэффициент затухания зависит от диаметра частицы [88].

Метод позволяет получать распределения по размерам для частиц диаметром от нескольких нанометров до нескольких миллиметров с массовой долей от 0.5 до 80 масс.%.

Значительным преимуществом акустической спектроскопии перед такими методами, как динамическое рассеяние света и анализ траекторий наночастиц, является возможность исследования непрозрачных образцов [89]. Акустическая спектроскопия основывается на хорошо развитой теории рассеяния (в т.ч. многократного), что позволяет исследовать практически все виды коллоидов [88,89].

Недостатком метода является то, что для выполнения исследований требуется знание таких величин как плотность материала и массовая доля наночастиц, плотность, вязкость и диэлектрическая проницаемость растворителя и коэффициент поглощения ультразвука среды без частиц [87]. Погрешности в определении данных величин являются причинами погрешностей результатов.

Анализ дифференциальной электрической подвижности. Системы анализа дифференциальной электрической подвижности позволяют получать распределения по размерам взвешенных в воздухе наночастиц от 5 нм до 1 мкм [90,91]. Однако сообщается о качественном улучшении точности детектирования частиц вплоть до 1 нм [92]. Анализ распределения частиц по размерам производится следующим образом [93]. После забора пробы воздуха частицы заряжаются при столкновении с ионами газов воздуха в устройстве зарядки частиц. Свободные заряды создаются с помощью радиоактивных изотопов. Взвесь частиц приобретает заряд с известным распределением [94]. Заряженные наночастицы направляются в классификатор дифференциальной электрической подвижности, состоящего из внутреннего и внешнего электродов с напряжением между ними от 20 В до 10 кВ. Движение заряженных частиц оказывается различным в зависимости от их диаметра, поэтому они достигают электрод в различных точках, где через щель отбираются частицы в узком диапазоне значений электрической подвижности. Отобранные частицы отправляются в детектор частиц, где определяется их концентрация. Определение концентрации производится либо оптическими методами при контакте частиц с перенасыщенным паром спирта, который конденсируется на них; либо электрометрически – измеряется ток, который создается заряженными частицами. Изменение напряжения в классификаторе дифференциальной электрической подвижности позволяет получить распределение частиц по размерам.

Ошибки в построении распределений могут возникать по следующим причинам. Могут иметь место потери наночастиц вследствие диффузии. Так как зависимость электрической подвижности от размеров строго выражается для сферических частиц, могут возникать ошибки в том случае, если форма частиц существенно отличается от сферической – нанотрубки, волокна. Построение распределения занимает на практике несколько минут, поэтому результаты могут искажаться, если в ходе анализа меняется вид истинного

распределения частиц по размерам. Неправильный учет воздушного потока может приводить к ошибкам в определении концентрации частиц. Также результат может искажаться скачками напряжения в классификаторе электрической подвижности [90,91].

Применение кондуктометрического счетчика Коултера.

Кондуктометрический счетчик Коултера основан на измерении импульса электрического тока, возникающего, когда частица проходит через отверстие в непроводящей перегородке [95–97]. Изначально прибор был разработан для автоматизации определения концентрации эритроцитов, которое до этого выполнялось оператором, подсчитывавшим их количество в стандартной камере [97]. Для корректной работы проводимость частицы должна отличаться от проводимости электролита. Анализируемая проба растворяется в электролите с достаточно малой концентрацией, при которой вероятность попадания в отверстие более одной частицы пренебрежимо мала. Импульс напряжения обусловлен увеличением сопротивления между электродами в момент, когда частица проходит сквозь отверстие. Амплитуда импульса напряжения, возникающего при проходе частицей отверстия, пропорциональна объему частицы. Анализ частотного распределения амплитуд импульса напряжения позволяет получить объемное распределение частиц по размерам.

Кондуктометрический счетчик Коултера позволяет получать распределения частиц по размерам в интервале от 1 до 15 мкм [95]. Ошибки могут возникать, если течение электролита через отверстие перегородки оказывается турбулентным и одна и та же частица проходит через отверстие несколько раз. Систематический сдвиг регистрируемых размеров частиц в большую сторону может происходить, если несколько частиц проходят через отверстие одновременно [98,99]. Также причиной ошибок и препятствием для снижения нижней границы размеров измеряемых частиц является термический шум в электрической цепи [97].

Анализ траекторий наночастиц. Анализ траекторий наночастиц – новый метод исследования распределений по размерам наночастиц в жидкостях [100,101]. Данный метод основан на связи среднеквадратического перемещения частицы с ее размерами, формой, вязкостью жидкости и температурой. Установка представляет собой камеру, над которой установлен оптический микроскоп, оборудованный CCD-камерой. Камера заполняется раствором с концентрацией от 10^5 до 10^{10} частиц на мл и сквозь камеру направляется излучение лазера с сечением пучка около 50 мкм. Даже если наночастицы имеют слишком маленький размер для обнаружения их в оптический микроскоп, из-за броуновского движения они могут быть обнаружены при облучении лазером [102]. Движение маленьких частиц оказывается быстрее и дальше, поэтому по регистрируемому через фиксированные интервалы времени перемещению наночастицы можно установить ее размер [101].

Данный метод позволяет получать распределения частиц по размерам в интервале от нескольких десятков до приблизительно 500 нм [101]. Верхний предел обусловлен исчезновением броуновского движения при увеличении размеров частицы. Нижний предел диктуется способностью частицы рассеивать достаточное количество света, чтобы быть детектированной. Например, для наночастиц золота или серебра распределения могут быть построены вплоть до 10 нм, тогда как для органических частиц нижний предел оказывается больше [103].

Анализ траекторий наночастиц позволяет получать распределения по размерам как для монодисперсных, так и для полидисперсных систем любого состава с хорошим разрешением пиков [104] с единственным ограничением: коэффициенты преломления вещества наночастиц и растворителя должны существенно отличаться. Однако следует отметить, что при уменьшении диаметра частиц ниже 20 нм надежность результатов снижается, особенно если коэффициент отражения материала наночастиц низок [61,105,106]. При увеличении размера частиц до 600 нм, во-первых, рассеивание света

частицами становится слишком интенсивным, что приводит к засветке камеры и некорректному распознаванию, во-вторых, броуновское движение становится медленным, возрастает погрешность определения среднеквадратичного перемещения частицы и, как следствие, ее размеров. При недостаточно высоких концентрациях распределение по размерам зарегистрированных частиц может существенно отличаться от распределения, соответствующего образцу в целом [101]. Метод не позволяет получить какой-либо информации о форме частиц и интерпретация результатов становится затруднительной в случае их агрегации [105].

Аналитическое ультрацентрифугирование. Аналитическое ультрацентрифугирование позволяет исследовать термодинамические и гидродинамические свойства макромолекул и наночастиц в растворах или взвесьях [107–109] в широком диапазоне растворителей и концентраций, получать информацию о коэффициентах седиментации частиц, их распределении по размерам и молярной массе на интервале размеров от 1 нм до 1 мкм [110].

Под действием центробежных сил концентрация коллоида меняется согласно уравнению Ламма, описывающему скорость изменения концентрации коллоида в зависимости от расстояния до центра центрифуги под воздействием двух противоположно направленных процессов: седиментации, стремящейся переместить все частицы в одну сторону экспериментальной камеры, и диффузии, выравнивающей концентрацию в объеме. В качестве параметров в уравнении присутствуют константа диффузии, коэффициент седиментации и угловая скорость вращения [108]. Если последняя имеет постоянное известное значение, по поглощению света раствором можно установить зависимость концентрации от времени и расстояния до центра вращения, что позволяет получить распределение частиц по коэффициенту седиментации. Распределение по коэффициенту диффузии может быть перестроено в распределение частиц по размерам [110].

Достоинством данного метода является то, что биологически активные наночастицы могут изучаться в своем естественном растворителе. Метод не разрушает образец, который может быть исследован повторно или непосредственно использован в биомедицинских целях. На материал наночастиц накладывається лишь два требования: во-первых, коэффициенты преломления материала и растворителя должны различаться, во-вторых, наночастицы должны иметь выраженную положительную или отрицательную плавучесть в растворителе [108].

Недостатком метода является то, что определение концентрации по поглощению света может быть долгим, вследствие чего радиальное распределение концентрации устанавливается с достаточно грубым шагом (приблизительно в 30 мкм). Как результат, погрешность при определении распределений по размерам повышается [108]. Результаты могут быть некорректными, если частицы имеют широкое распределение. В этом случае малые концентрации больших частиц оказываются незарегистрированными. Центробежная сила может приводить к агрегации частиц. Стабилизаторы на поверхности частиц могут приводить к их сильному электростатическому отталкиванию, которое не учитывается в уравнении Ламма, что в итоге также искажает результат. Для построения распределений частиц по размерам требуется значение средней плотности их материала, которое не всегда удается установить для гибридных частиц или для многокомпонентной дисперсии с частицами разных плотностей [110]. Еще одна причина искажения результатов возникает при наличии зависящего от размеров рассеяния света на частицах, которое описывается теорией Ми [111]. Поправки на рассеяние Ми могут приводить к артефактам в области малых размеров частиц.

Особенности каждого из вышеизложенных методов и интервал, на котором могут быть получены распределения наночастиц по размерам, изложены в таблице 2.

Таблица 2. Экспериментальные методы исследования морфологии наночастиц.

Метод	Интервал размеров наночастиц	Особенности
Акустическая спектроскопия	Весь нанодиапазон	Определяется распределение по размерам объема наночастиц. Быстрое получение результатов. Возможность исследовать непрозрачные образцы. Возможность исследования гетерогенных образцов.
Анализ дифференциальной электрической подвижности	От 5 нм	Определяется распределение по размерам объема наночастиц. Точность результатов в значительной степени определяется правильностью определения формы частиц. Быстрое получение результатов.
Анализ траекторий наночастиц	От нескольких десятков нанометров до 0.5 мкм	Определяется распределение числа частиц по размерам. Точность результатов зависит от концентрации наночастиц.
Аналитическое ультрацентрифугирование	Весь нанодиапазон	Определяется распределение наночастиц по коэффициенту диффузии. Исследуются коллоиды в широком интервале концентраций. Некорректные результаты в случае широкого распределения наночастиц. Возможность изучения биологически активных коллоидов в естественном растворителе

Динамическое рассеяние света	Весь нанодиапазон	Определяется средний гидродинамический диаметр. Диапазон измерений сужается при повышении концентраций наночастиц. Быстрое получение результатов. Морфологический анализ полидисперсных образцов затруднителен.
Счетчик Кохлтера	1–15 мкм	Определяется распределение числа частиц по размерам.
Магнетронное рентгеновское и нейтронное рассеяние	Весь нанодиапазон	Определяется распределение по размерам объема наночастиц. Высокая скорость получения результатов и простота приготовления образцов. Изучение формы и структуры частиц требует привлечение сторонних методов. Данные о наночастицах <10 нм могут быть получены только при их высокой концентрации.
Порошковая дифрактометрия	Весь нанодиапазон	Определяется средний диаметр наночастиц. Быстрое получение результатов с относительной ошибкой до 100%.
Просвечивающая и сканирующая электронная микроскопия	Весь нанодиапазон	Визуализация каждой частицы. Возможность определения размеров, формы, кристаллической структуры и состава наночастиц. Требуется времязатратная обработка изображений для надежной статистики измерений.

<p style="text-align: center;">Сканирующая зондовая микроскопия</p>	<p style="text-align: center;">От нескольких нанометров</p>	<p>Визуализация каждой частицы. Сбор репрезентативной статистики измерений затруднителен ввиду малой площади сканирования.</p>
---	---	--

Приведенный выше анализ литературы демонстрирует, что для задач анализа параметров дисперсности стабилизированных полимерами наночастиц, которые были синтезированы в рамках принципов зеленой химии и предназначены для биомедицинского применения, электронная микроскопия обладает рядом существенных преимуществ. С одной стороны, могут быть получены индивидуальные изображения наночастиц в широком интервале размеров, что позволяет устанавливать распределения по размерам с высоким разрешением; с другой стороны, изображения могут быть получены быстро и нет ограничений на их площадь. Рентгеновский микроанализ наночастиц, который может быть выполнен в рамках электронной микроскопии, позволяет получить информацию об их составе, уточнив оценку биомедицинской эффективности образца, сделанную на основании распределений частиц по размерам.

Малоугловое рентгеновское рассеяние может использоваться как дополнительная методика для быстрой диагностики морфологии наночастиц, синтезированных теми же методами, что наночастицы, предварительно исследованные в рамках электронной микроскопии.

1.3. Анализ размеров и распределений по размерам наночастиц на изображениях.

1.3.1. Типы контраста в просвечивающей электронной микроскопии.

Контраст можно определить как относительную разницу в интенсивности прошедшего излучения между двумя соседними областями: $C = \frac{I_2 - I_1}{I_1}$. Его возникновение на электронно-микроскопических изображениях обусловлено рассеянием на образце падающей волны электронов. При прохождении через образец может изменяться ее амплитуда и/или фаза. Как изменения амплитуды, так и изменения фазы приводят к возникновению контраста. На практике тот или иной вклад в контраст всегда вносят и изменения амплитуды и изменения фазы. Однако условия получения изображения могут быть такими, что преобладать будет лишь один фактор. Контраст, обусловленный изменениями амплитуды, называется амплитудным контрастом, изменениями фазы – фазовым. Амплитудный контраст бывает масс-толщинным и дифракционным.

Масс-толщинный контраст в просвечивающей электронной микроскопии. Масс-толщинный контраст возникает вследствие некогерентного упругого рассеяния электронов – рассеяния Резерфорда. Большая часть электронов, претерпевающих резерфордовское рассеяние, не отклоняется от первоначального направления более, чем на 5° . В основном масс-толщинным контрастом обладают некристаллические наночастицы.

Апертура объективной линзы и ускоряющее напряжение влияют на масс-толщинный контраст наночастиц. С увеличением апертуры доля рассеянных электронов, формирующих изображение, увеличивается, и при повышении общей яркости снимка контраст между фоном и изображением наночастиц снизится. При увеличении апертуры изображение будет формироваться большей частью рассеянных электронов, и при повышении общей яркости снимка контраст между фоном и изображениями наночастиц

снизится. При понижении ускоряющего напряжения увеличиваются углы рассеяния электронов. В этом случае при снижении общей яркости контраст наночастиц будет возрастать [64].

Темнопольные изображения в СПЭМ формируются электронами, попадающими на кольцевой детектор. Таким образом, тогда как в ПЭМ в построении изображения участвует лишь малая часть рассеянных электронов, темнопольные СПЭМ изображения формируются большей частью рассеянных электронов. Темнопольные изображения наночастиц в СПЭМ оказываются четче, так как при их формировании не используются магнитные линзы. Такие изображения обладают меньшим разрешением, однако СПЭМ способна обеспечить сильный контраст нанометровых частиц на углеродной подложке или в полимерной пленке, если частицы имеют большее значение Z по сравнению с подложкой или пленкой.

Дифракционный контраст в ПЭМ и СПЭМ. Дифракционный контраст – амплитудный контраст, обусловленный упругим когерентным рассеянием в определенные углы – углы Брэгга.

При получении изображений с дифракционным контрастом в СПЭМ прошедший пучок регистрируется светопольным детектором, дифрагированный – круговым темнопольным детектором. Однако вклад дифракционного контраста в случае темнопольной СПЭМ значительно ниже, чем в ПЭМ.

Малые размеры кристаллических наночастиц приводят к увеличению узлов обратной решетки до областей определенного размера и формы [112]. При случайной ориентации наночастиц сфера Эвальда с высокой вероятностью пересекает узлы их обратной решетки. Поэтому кристаллические наночастицы на светопольных (С)ПЭМ-изображениях имеют в основном дифракционный контраст, формирующийся в многолучевых условиях [113].

В рамках двухлучевого приближения выражения для интенсивности прошедшего и дифрагированного пучков могут быть получены

аналитически. Согласно расчету, основанному на методе зон Френеля, интенсивности прошедшего I_0 и дифрагированного I_k пучков могут быть выражены как [114]:

$$I_0(t) = I_{\text{пад}} \left(1 - \left(\frac{\sin(\pi t s_{\text{эфф}})}{s_{\text{эфф}} \xi_k} \right)^2 \right) \quad (1.1)$$

$$I_k(t) = I_{\text{пад}} \left(\frac{\sin(\pi t s_{\text{эфф}})}{s_{\text{эфф}} \xi_k} \right)^2 \quad (1.2)$$

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

$$s_{\text{эфф}} = \sqrt{s^2 + \frac{1}{\xi_k^2}} \quad (1.3)$$

– эффективная ошибка возбуждения, s – ошибка возбуждения, ξ_k – экстинкционная длина, соответствующая рефлексу k . Формулы (1.1) и (1.2) показывают, что, в отличие от случая некогерентного рассеяния, в случае дифракции зависимость интенсивности волны электронов от толщины образца носит гармонический, т.е. немонотонный характер.

Химический (Z-контраст) контраст в сканирующей просвечивающей электронной микроскопии. Z-контраст – масс-толщинный контраст, получаемый в условиях, когда регистрируемое рассеяние электронов происходит на отдельных атомах или колонках атомов [115,116]. Свое название Z-контраст получил по высокоразрешающей методике обнаружения атомов платины на кристаллической подложке, в рамках которой регистрировались электроны, рассеянные на большие углы, что позволяло получать изображения без нежелательного фона, представляющего собой дифракционный контраст от кристаллической матрицы оксида алюминия [64]. Одной из ключевых задач развития электронной микроскопии была возможность визуализации отдельных атомов [117].

Изображения с Z-контрастом формируются при сканировании образца пучком высокоэнергетических электронов. Когерентно упруго большая часть электронов рассеивается на углы не более 3° . Небольшая доля электронов,

претерпевших резерфордовское рассеяние на углы более 5° , регистрируется кольцевым детектором [115,118]. Квантовомеханическое описание процесса формирования изображения с Z -контрастом продемонстрировало, что динамические эффекты дифракции значительно снижаются [119,120]. Для углов $> 5^\circ$ дифракционные эффекты исключены, интенсивность некогерентного рассеяния Резерфорда относительно мала и пропорциональна Z^2 .

Изображения с Z -контрастом могут быть интерпретированы непосредственно, без предварительно заданной модели структуры изображаемого объекта. Они позволяют обнаружить, возможно, непредвиденные атомные структуры на границах зерен, дефектах или границах раздела материалов, обеспечивая понимание их свойств и позволяя предсказывать эти свойства [115]. Сообщается, что регистрация электронов, рассеянных на большие углы, также делает возможным анализ характеристических потерь электронов [121] и позволяет определять состав материалов [122].

Фазовый контраст в ПЭМ высокого разрешения. Фазовый контраст возникает на изображении, если оно было сформировано двумя и более пучками, прошедшими через апертуру объективной линзы или попали на электронный детектор. Несмотря на то, что обычно фазовый контраст рассматривается как характеристика просвечивающей электронной микроскопии высокого разрешения (ВРЭМ), изменения фазы электронной волны в некоторой степени сказываются на контрасте на любых ПЭМ изображениях с относительно небольшими увеличениями [64].

Фазовый контраст зависит от толщины образца, его ориентации, изменений фокусного расстояния объективной линзы, астигматизма. Высокая чувствительность позволяет использовать фазовый контраст для исследования атомной структуры тонких образцов. Необходимым условием для этого является достаточное разрешение микроскопа, позволяющее регистрировать изменения контраста на атомных размерах. Чем больше

используется пучков, тем выше разрешение изображения. Упорядоченная атомная структура на изображении представляет собой полосы с гармонически изменяющимся контрастом. Периодичность полос зависит не только от атомной структуры образца, но и от его ориентации и толщины. Положение полосы на изображении не соответствует точному положению атомной плоскости в кристалле, таким образом, фазовый контраст дает лишь информацию о межплоскостном расстоянии и ориентации образца.

Фазовый контраст пропорционален первой степени диаметра [113], тогда как при малых размерах кристаллической наночастицы дифракционный контраст пропорционален квадрату диаметра частицы ($\sin(\pi t s_{\text{эфф}}) \approx \pi t s_{\text{эфф}}$ в формулах (1.1) и (1.2)). Поэтому изменения фазы электронной волны могут сказаться на контрасте кристаллических наночастиц достаточно малых размеров (менее 1.5 нм) сильнее, чем дифракция [123]. Основная причина фазового контраста наночастиц – изменение фазы электронной волны при прохождении через кристаллическую структуру толщины t на $\pi t / \xi_0$. Таким образом, изменения фазы порядка радиана будут происходить при изменениях толщины частицы на несколько нанометров. Вследствие дефокусировки и сферических aberrаций объективной линзы изменения фазы электронной волны могут приводить к появлению интерференционных полос Френеля на границах наночастиц [124], что может усложнять процедуру анализа изображений.

1.3.2. Методы обработки изображений наночастиц в ПЭМ.

Все методы измерения размеров частиц за исключением микроскопии имеют дело с материальными образцами. В оптической и электронной микроскопии анализируются изображения, полученные от образцов. Аналитическая электронная микроскопия позволяет установить природу наночастиц и измерить размеры частиц, находящихся в смеси с частицами другой фазы и/или другого химического состава.

Для установления распределений частиц по размерам необходимо собрать данные о размерах большого числа частиц (обычно не менее 200 частиц). Данные измерения можно делать вручную или использовать автоматические алгоритмы. Измерения вручную на изображениях невозможно заменить автоматическими в сложных случаях, например для сильно агломерированных частиц, на снимках с частицами, контраст которых практически не отличается от контраста фона. Очевидно, что ручной подсчет требует больших временных затрат и предъявляет высокие требования к вниманию оператора. Измерениям вручную могут быть свойственны не только случайные, но и систематические ошибки, вызванные желанием оператора получить ожидаемый результат. Поэтому разработаны и постоянно совершенствуются программные комплексы, позволяющие автоматизировать процесс морфометрии (Digital Micrograph, Gatan; ImageJ; FIJI).

Бинаризация. Это самая распространенная методика из области компьютерного зрения и распознавания изображений. Бинаризация полутонового изображения заключается в разграничении путем установления порогового уровня серого всех пикселей изображения на пиксели, принадлежащие объекту, и пиксели, принадлежащие фону. Пиксель, чей уровень серого оказывается ниже установленного порога, объявляется пикселем объекта (изображения наночастицы), его уровень серого устанавливается равным 0 (черный); пиксель, чей уровень серого оказывается выше установленного порога, объявляется фоновым, и его уровень серого устанавливается равным 1 (белый).

Принципиально бинаризацию можно разделить на глобальную и локальную. Глобальная бинаризация – самый простой метод, при котором пороговое значение уровня серого устанавливается для всего изображения. Данный метод оказывается хорошо применимым, если все частицы достаточно сильно отличаются от однородной подложки. Основная проблема данного метода состоит в том, что критерием является только уровень серого

того или иного пикселя, при этом совершенно игнорируется их взаимное расположение. Таким образом, можно включить в область интересующего объекта пиксели, которые ему не принадлежат, и неоправданно пренебречь пикселями в пределах изображения объекта, что особенно вероятно около границ изображений наночастиц. Подобные искажения становятся лишь сильнее с усилением шумов на снимке. В связи с этим возникает необходимость варьировать уровень порога, иногда недооценивая или переоценивая размер наночастиц. В большинстве практических случаев сложно найти уникальный уровень порога для всего изображения, и лишь некоторая доля частиц корректно обнаруживается на бинаризованном изображении. Особенно плохо данный метод применим в случае неравномерного фона на электронно-микроскопическом снимке. Возможна ситуация, когда в темной области снимка пиксели, соответствующие фону, будут иметь уровень серого ниже, чем пиксели, соответствующие изображениям наночастиц, в светлой области снимка.

Локальная бинаризация предполагает разбиение снимка на фрагменты с последующей установкой уникального порогового уровня серого для каждого фрагмента. На практике оказывается, что большему числу фрагментов соответствует большее число обнаруженных наночастиц и более корректное определение их границ [125] (см. рис. 1). Однако, даже если число фрагментов столь велико, что поперечные размеры фрагмента сопоставимы со средним размером наночастиц, очень маленькие и очень большие частицы по-прежнему остаются необнаруженными, а выделяющиеся группы пикселей, представляющие собой шум, могут быть распознаны как изображения частиц [125]. Таким образом, данный метод может давать неточные результаты, если выполняется в полностью автоматическом режиме. Полуавтоматическая реализация метода, когда автоматически определяются положение и размеры большинства наночастиц, а прочие измеряются оператором, дает более корректные результаты.

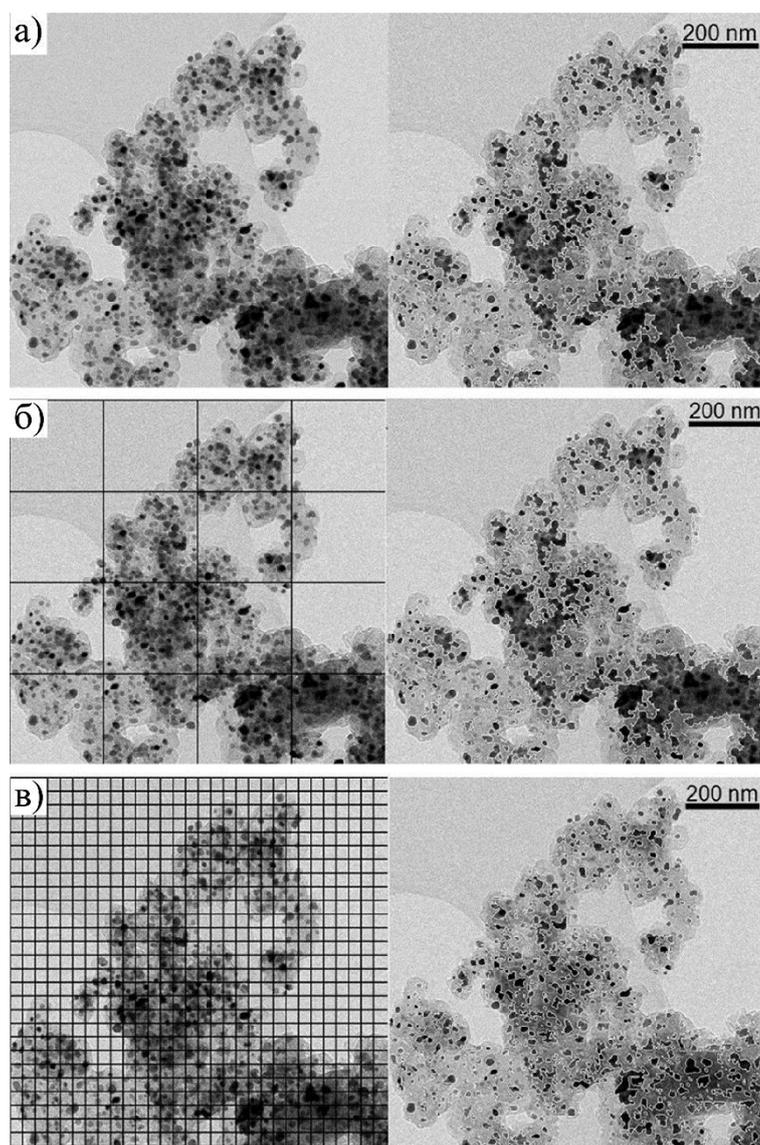


Рис. 1. Локальная бинаризация изображения [125]. (а) – оригинальное изображение и распознанные объекты при глобальной бинаризации, (б) – распознанные изображения при локальной бинаризации, размер сегмента значительно больше размера наночастицы, (в) – распознанные изображения при локальной бинаризации, размер сегмента сопоставим с размером наночастицы.

Как правило, пороговое значение уровня серого, как в случае глобальной, так и в случае локальной бинаризации, устанавливается вручную. Однако положение порога может быть вычислено с помощью ряда алгоритмов, анализирующих распределение пикселей по уровням серого $p(g)$. Ниже дано описание основных алгоритмов.

Известное распределение. Если точно известно, что искомый объект занимает определенную площадь снимка α , то уровень порога можно просто установить, потребовав, чтобы доля пикселей с уровнем серого ниже порогового значения T составляла α :

$$\int_0^T p(g)dg = \alpha$$

Решение данного интегрального уравнения позволит получить требуемое пороговое значение.

Нахождение локального минимума. Популярным и крайне простым способом установления порогового уровня серого является способ нахождения двух локальных максимумов распределения и локального минимума между ними. Уровень порога устанавливается на уровне локального минимума. Однако в случае обработки электронно-микроскопических снимков наночастиц задача осложняется двумя проблемами. Во-первых, вследствие сильных шумов, в распределении будут встречаться множество локальных максимумов и локальных минимумов. Во-вторых, если изображение недостаточно контрастное или общая площадь изображений частиц составляет малую долю от площади рисунка, в распределении вовсе не будет двух различимых максимумов и минимумов.

Кластеризация. Микрофотографию наночастиц можно рассматривать как две группы пикселей – пиксели фона и пиксели изображений наночастиц. Каждая группа имеет свое среднее значение и ширину распределения. Установка порога осложняется, как правило, тем, что эти интервалы перекрываются. Задача данного метода – минимизация ошибки идентификации фоновых пикселей, как пикселей объекта, и наоборот. Предполагается, что пороговое значение серого разделяет две группы между собой. Таким образом, задача алгоритма заключается в минимизации числа пикселей одной группы, попадающих в область другой группы. Необходимо

выбрать такой уровень порога T , чтобы выполнялись следующие условия (для светлопольного изображения):

$$\forall g \geq T: |g - \mu_{\text{фон}}(T)| < |g - \mu_{\text{НЧ}}(T)|$$

$$\forall g < T: |g - \mu_{\text{фон}}(T)| > |g - \mu_{\text{НЧ}}(T)|$$

Где g – значение уровня серого какого-либо пикселя снимка, $\mu_{\text{фон}}(T)$ – среднее значение уровня серого фона, $\mu_{\text{НЧ}}(T)$ – среднее значение уровня серого изображений наночастиц. Пороговое значение вычисляется итерациями. За начальное значение $\mu_{\text{фон}}^0(T)$ выбирается среднее арифметическое уровней серого четырех угловых пикселей (подразумевается, что они принадлежат фону), $\mu_{\text{НЧ}}^0(T)$ – среднее значение всех остальных пикселей. Уровень порога T^1 выбирается посередине между вычисленными средними значениями. Полученный уровень порога позволяет разделить пиксели на две новые группы и вычислить новые средние значения $\mu_{\text{фон}}^1(T)$ и $\mu_{\text{НЧ}}^1(T)$, а также новый уровень порога T^2 как середину между этими средними. Этот процесс повторяется, пока T^i не сойдется к некоторому предельному значению T^∞ , которое и используется для бинаризации снимка.

Использование данного метода может приводить к ошибкам, если две группы пикселей обладают существенно различающимися по ширине распределениями. Например, такое возможно, если на снимке присутствует большое количество наночастиц с сильным контрастом и диаметром в несколько пикселей, а освещенность фона сильно меняется по площади снимка. Также такое возможно, если бóльшую часть снимка занимают изображения наночастиц с диаметром в несколько десятков пикселей, имеющих сильные вариации уровня серого от центра к краям, а фон снимка, напротив, равномерен по всей площади.

Метод Отсу. При сдвиге порогового уровня дисперсия уровней серого выше и ниже порога будет изменяться в противоположных направлениях. Задача данного метода – получить минимальную комбинированную

дисперсию, которая определяется как сумма дисперсий уровней серого выше и ниже текущего порогового значения, взятых с весами, пропорциональными количеству пикселей в каждом типе:

$$\sigma_{\text{комб}}^2(T) = n_{\text{НЧ}}(T)\sigma_{\text{НЧ}}^2(T) + n_{\text{фон}}(T)\sigma_{\text{фон}}^2(T)$$

где

$$n_{\text{НЧ}}(T) = \int_0^T p(g)dg$$

$$n_{\text{фон}}(T) = \int_T^0 p(g)dg$$

$\sigma_{\text{НЧ}}^2(T)$ и $\sigma_{\text{фон}}^2(T)$ – дисперсия уровней серого соответственно ниже и выше порогового значения. Отсу показал [126], что, если вычесть заданную таким образом комбинированную дисперсию из дисперсии полного распределения, мы получим следующее выражение:

$$\sigma_{\text{межклассовая}}^2(T) = n_{\text{фон}}(T)n_{\text{НЧ}}(T)[\mu_{\text{фон}}(T) - \mu_{\text{НЧ}}(T)]^2$$

Данное выражение Отсу определил как межклассовую дисперсию. Пороговое значение уровня серого, минимизирующего комбинированную дисперсию, также максимизирует межклассовую дисперсию [126]. Задача, таким образом, сводится к нахождению максимума функции $\sigma_{\text{межклассовая}}^2(T)$ на интервале $[0;1]$. Значение T , отвечающее максимуму $\sigma_{\text{межклассовая}}^2$, составит искомое пороговое значение.

Моделирование смеси. Другой путь вычислить пороговое значение уровня серого – задаться гипотезой, что уровни серого пикселей, соответствующих фону и изображению, распределены нормально. Распределения в пределах каждой группы имеют среднее значение уровня серого $\mu_{\text{фон}}$ и $\mu_{\text{НЧ}}$ и дисперсию $\sigma_{\text{фон}}$ и $\sigma_{\text{НЧ}}$. Теоретическая функция плотности распределения числа пикселей по уровням серого ищется в виде:

$$p_{\text{теор}}(g) = n_{\text{фон}}e^{-(g-\mu_{\text{фон}})^2/2\sigma_{\text{фон}}^2} + n_{\text{НЧ}}e^{-(g-\mu_{\text{НЧ}})^2/2\sigma_{\text{НЧ}}^2}$$

Цель данного метода – отыскать параметры двух предполагаемых нормальных распределений. $p_{\text{теор}}(g)$ имеет шесть неизвестных параметров: $n_{\text{фон}}$, $n_{\text{НЧ}}$, $\mu_{\text{фон}}$, $\mu_{\text{НЧ}}$, $\sigma_{\text{фон}}$ и $\sigma_{\text{НЧ}}$. Данные параметры определяются путем аппроксимации $p_{\text{теор}}(g)$ к реальному распределению пикселей по уровням серого. Точность аппроксимации может быть оценена по методу наименьших квадратов вычислением величины $F = \int_0^1 (p(g) - p_{\text{теор}}(g))^2 dg$. В итоге задача сводится к минимизации функции $F(n_{\text{фон}}, n_{\text{НЧ}}, \mu_{\text{фон}}, \mu_{\text{НЧ}}, \sigma_{\text{фон}}, \sigma_{\text{НЧ}})$, аргументами которой выступают шесть величин. Минимизация может быть осуществлена различными численными методами. Нахождение точки минимума приведет к нахождению параметров распределений.

Уровень порога вычисляется так, чтобы минимизировать в рамках модели вероятность ошибки идентификации фоновых пикселей, как пикселей, принадлежащих изображениям наночастиц, и наоборот:

$$E(T) = n_{\text{фон}} \int_0^T e^{-(g-\mu_{\text{фон}})^2/2\sigma_{\text{фон}}^2} dg + n_{\text{НЧ}} \int_T^1 e^{-(g-\mu_{\text{НЧ}})^2/2\sigma_{\text{НЧ}}^2} dg$$

Таким образом, остается найти минимум функции $E(T)$ на интервале $[0;1]$.

Несмотря на то, что бинаризация, как глобальная, так и локальная, очень проста в реализации, ряд причин вынуждают разрабатывать другие, не основанные на анализе абсолютных значений уровня серого пикселей, методики. Методы бинаризации не способны обрабатывать изображения с высоким уровнем шума, принимать во внимание взаимное расположение пикселей, игнорируют информацию, содержащуюся в вариациях уровня серого от пикселя к пикселю, и всегда результат измерения размеров наночастицы оказывается кратным величине длины, приходящейся на один пиксель.

Метод корреляционного поиска. В работе [127] был разработан метод распознавания местоположений наночастиц на основе вычисления

корреляции между образцом искомого изображения наночастицы и фрагментом электронно-микроскопического снимка такого же размера.

В данном методе обнаружения изображений наночастиц перебираются все фрагменты электронно-микроскопического снимка, имеющие равные с образцом изображения линейные размеры, и для каждого фрагмента вычисляется корреляция с образцом (рис. 4). Если изображение наночастицы присутствует на текущем фрагменте, корреляция оказывается высокой.

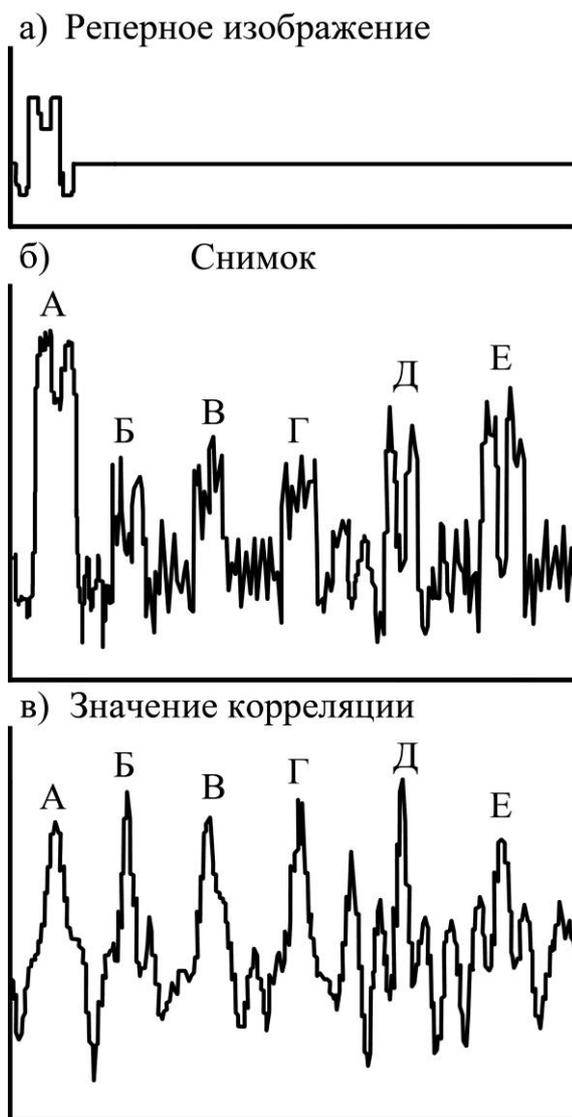


Рис. 2. Одномерная схема метода корреляционного поиска изображений наночастиц. Образец изображения (а), электронно-микроскопический снимок наночастиц (б), значение корреляции для соответствующих фрагментов снимка (в), А, Б, В, Г, Д, Е – распознанные изображения [127].

Данный метод оказывается весьма устойчивым при работе с изображениями, имеющими сильный шум, поскольку учитывает уровень серого каждого пикселя текущего фрагмента. Однако обнаружение частиц возможно, только если они имеют приблизительно одинаковый размер. Данная методика не позволяет получать широкие распределения частиц по размерам. Существенным недостатком методики является необходимость выбора образца изображения, которое выбирает пользователь, вообще говоря, произвольным выбором.

Аппроксимация эллиптической модели. В работе [128] разработали и реализовали алгоритм аппроксимации эллиптической модели границ изображения частицы к реальному изображению на снимке. Данный алгоритм аппроксимирует эллипс к изображению наночастицы так, чтобы разность средних уровней серого внутри эллипса и в некоторой окрестности вблизи него была максимальной (см. рис. 3). Окрестность эллипса выбирается с учетом поверхностной плотности изображений наночастиц на снимке.

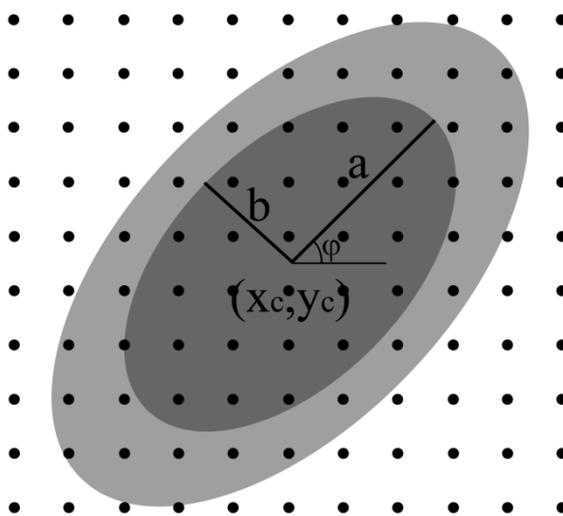


Рис. 3. Аппроксимация эллипса из работы [128]. ■ – эллиптическая граница изображения наночастицы, a , b – большая и малая полуоси эллипса, x_c , y_c – координаты центра эллипса, φ – угол поворота эллипса, ■ – граница вокруг эллипса, ● – пиксели.

В работе [128] отсутствует обоснование, почему выбранный критерий аппроксимации будет давать наиболее точное положение границы изображения наночастицы с физической точки зрения.

Аппроксимация модели распределения уровня серого к изображению наночастицы на снимке. В работе [129] предлагалось измерять размеры наночастиц путем аппроксимации смоделированного распределения уровня серого как линейной или квадратичной функции толщины частицы к экспериментальным изображениям наночастиц. Свои идеи авторы воплотили в бесплатной программе Pebbles. Преимуществом данной методики является то, что для измерения диаметра наночастицы используются значения уровней серого каждого пикселя ее изображения и окрестности. Данное обстоятельство делает алгоритм малочувствительным к шумам. Кроме того, алгоритм учитывает не только абсолютные значения уровня серого, но также использует информацию, содержащуюся в вариациях уровня серого от пикселя к пикселю.

Авторы [129] приводят подробную теоретическую справку относительно угловых характеристик рассеяния электронов при различных процессах взаимодействия с атомами наночастицы. Однако из данной справки не следует обоснования выбора модели в качестве средства для измерения размеров. В программе Pebbles отсутствует какой-либо алгоритм для распознавания изображений наночастиц: на изображение накладывается сеть точек (гипотетических центров изображений наночастиц), и программа последовательно выполняет аппроксимацию в окрестности каждого центра (см. рис. 4). Если изображение частицы отсутствует в данной области снимка, аппроксимация заканчивается безрезультатно. Такой неоптимальный алгоритм распознавания многократно увеличивает время обработки одного снимка.

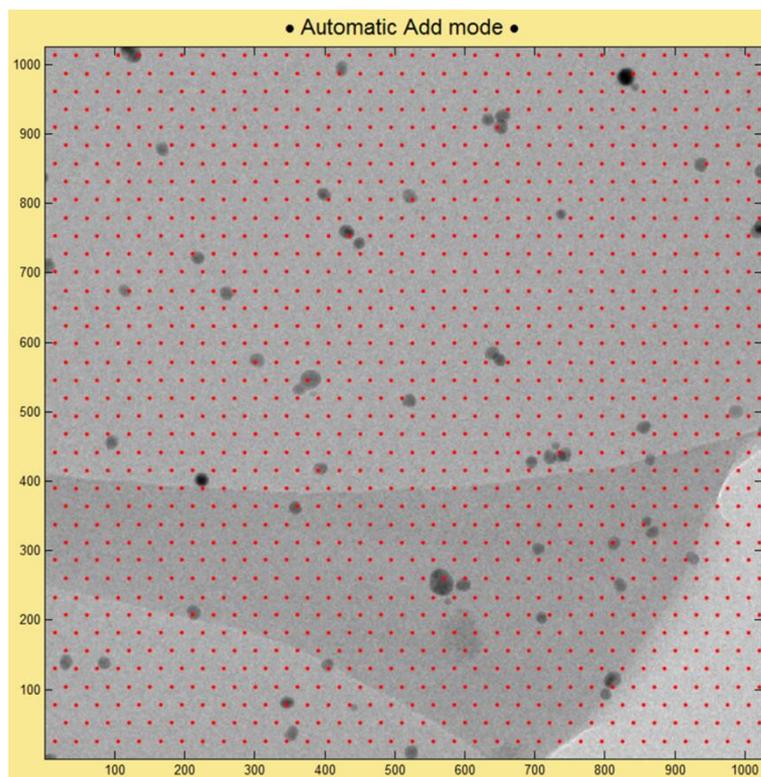


Рис. 4. Сеть гипотетических центров, наложенная на электронно-микроскопический снимок в программе *Pebbles* [129].

Преобразование Хафа. Для распознавания изображений сферических наночастиц может использоваться преобразование Хафа [130], которое переносит задачу нахождения какой-либо аналитической кривой на изображении в задачу нахождения точки с максимальным количеством пересекающихся в ней поверхностей, соответствующих точкам границы объектов, в пространстве параметров этой аналитической кривой. Данный метод требует предварительной бинаризации снимка и обнаружения границ изображений частиц.

Через каждый пиксель (x_i, y_j) границы можно провести произвольную окружность, задаваемую уравнением $(x_i - a)^2 + (y_j - b)^2 = R^2$, где a, b, R – координаты центра и радиус этой окружности. Тогда в пространстве (a, b, R) каждому пикселю (x_i, y_j) будет соответствовать конус $(x_i - a)^2 + (y_j - b)^2 - R^2 = 0$, однозначно определяемый этой точкой. Окружность, представляющая собой границу изображения сферической наночастицы,

проходит через все граничные пиксели. Поэтому этой окружности соответствует точка в пространстве (a, b, R) , располагающаяся на поверхности всех конусов, задаваемых граничными пикселями. Обнаружение этой точки определит окружность-границу изображения.

На практике границы изображения не представляют собой идеальные окружности, координаты центра и радиус окружностей при реализации принимают дискретные значения a_p, b_q, R_r , и алгоритм обнаруживает тройку величин (p, q, r) , соответствующих некоторому объему в пространстве (a, b, R) , через который проходят не все, а лишь наибольшее количество конических поверхностей [131].

Данный метод оказывается весьма чувствительным к шумам на изображении, а получение окончательного результата требует выполнения большого числа вложенных циклов, что серьезно занимает машинное время. Небольшие частицы, которым соответствуют окружности малых радиусов, могут остаться нераспознанными [131]. Результат обнаружения окружностей методом преобразования Хафа зависит от выбранных алгоритмов, предварительно выполняющих подавление шума на изображении, его бинаризации и обнаружения границ бинаризованных объектов.

На основе обзора методов и подходов можно сделать заключение, что основными сложностями статистического анализа размеров наночастиц являются: 1) их распознавание на изображениях с высоким уровнем шума, когда флуктуации плотности или неоднородности в подложке или полимерной матрице могут быть ошибочно приняты за частицы; 2) измерение размеров частиц, как правило, осуществляется на основе пороговой обработки изображений, что не может быть выполнено корректно при использовании глобальной бинаризации при наличии сильного шума или требует применения локальной бинаризации (сегментации), которая лишь незначительно быстрее, чем обработка изображений вручную.

ГЛАВА 2. РАЗРАБОТКА АЛГОРИТМОВ ДЛЯ МОРФОЛОГИЧЕСКОГО АНАЛИЗА НАНОЧАСТИЦ НА ЭЛЕКТРОННО-МИКРОСКОПИЧЕСКИХ ИЗОБРАЖЕНИЯХ.

В настоящей работе проводилась обработка изображений, полученных в аналитическом просвечивающем электронном микроскопе FEI Tecnai Osiris с X-FEG электронной пушкой на автоэлектронной эмиссии. Ускоряющее напряжение катода составляло 200 кВ, диаметр диафрагмы первой конденсорной линзы составлял 2000 мкм, второй – 70 мкм, диафрагмы объективной линзы – 10, 20 и 30 мкм. Светлопольные и темнопольные изображения были получены с помощью цифровой камеры 4k x 2.6k Gatan Orius в режимах просвечивающей и сканирующей просвечивающей электронной микроскопии.

Образцы для просвечивающей, сканирующей просвечивающей и высокоразрешающей просвечивающей электронной микроскопии представляли собой высушенные коллоиды наночастиц серебра с полимерами на аморфной углеродной пленке толщиной 15–20 нм, осажденной на медную сетку.

2.1. Особенности формирования контраста наночастиц на (С)ПЭМ-изображениях.

Как амплитудный, так и фазовый контраст подходят для визуализации наночастиц. ВРЭМ-снимки с фазовым контрастом дают высокое разрешение маленьких нанометровых частиц, однако количество частиц на таких снимках, как правило, невелико. Для надежной статистики для каждого образца потребуется получить большое количество ВРЭМ-изображений. Таким образом, ВРЭМ-микроскопия не удовлетворяет важному требованию статистического анализа: сделать как можно больше измерений за наименьшее время. ПЭМ- и СПЭМ-микроскопия, получающая снимки наночастиц со средним увеличением, обеспечивает достаточное для точных измерений и надежной статистики число пикселей на изображении частицы диаметром 1–2 нм.

Если наночастица аморфна или располагается вне брэгговского положения, то интенсивность прошедшего пучка $I_0(t)$ будет спадать монотонно с ростом толщины частицы t как в случае масс-толщинного контраста в ПЭМ, так и в случае Z-контраста в СПЭМ. Данный спад с хорошей точностью может быть аппроксимирован экспоненциальной функцией. Передаточная функция CCD-камеры, связывающая уровень серого g в некоторой точке электронно-микроскопического снимка с интенсивностью волны электронов I в соответствующей точке на нижней поверхности образца, также имеет монотонный характер.

Только присутствие дифракционного контраста может сделать зависимость интенсивности прошедшего пучка электронов от длины его пути в объеме наночастицы немонотонной (см. 1.3.1. дифракционный контраст в ПЭМ и СПЭМ). Можно продемонстрировать, что в двухлучевом приближении данная немонотонность для прошедшего (а значит и дифрагированного) пучка проявляется уже в случае частиц диаметром 10 нм.

Если кристаллическая наночастица находится в брэгговском положении ($s = 0$), аргумент синуса в (1.1) и (1.2) приобретает вид: $\pi t s_{\text{эфф}} = \frac{\pi t}{\xi_k}$. Центру проекции частицы соответствует максимальная, равная диаметру, толщина $t_{\text{max}} = d$, снижающаяся до нуля к границам проекции. Поэтому значение $\frac{\pi d}{\xi_k}$ определяет, проявится ли для этой частицы немонотонность функции $I_k(t)$. Если $\frac{\pi d}{\xi_k} \ll 1$, то функцию $I_k(t)$ можно считать линейной на всей области изменения толщины от $t = 0$ до $t = d$. Однако синус имеет экстремум при аргументе, равном $\pi/2 \cong 1.57$. Если $\frac{\pi d}{\xi_k}$ превышает $\pi/2$, функция $I_0(t)$ будет проявлять немонотонность. Для различных кристаллов экстинкционная длина ξ_k может различаться на несколько порядков. Для серебра минимальное значение ξ_k будет для отражения 111: $\xi_{111} = 28.40$ нм (200 кэВ) [114], при этом $\frac{\pi d}{\xi_{111}} = 1.1$ для $d = 10$ нм. Данное значение уже превышает

единицу, т.е. приближение $\frac{\pi d}{\xi_k} \ll 1$ в формулах (1.1) и (1.2) не выполняется. При отклонении частицы от точного береговского положения ($s > 0$) аргумент синуса $\pi ds_{эфф}$ будет лишь увеличивать свое значение вследствие роста ошибки возбуждения s . Для платины $\xi_{111} = 18.64$ нм, и $\frac{\pi d}{\xi_{111}} = 1.7 > \pi/2$ для $d = 10$ нм, т.е. проявление немонотонности $I_{111}(t)$ будет наблюдаться для платиновых частиц даже в точном береговском положении.

$I_k(t)$ становится равной нулю при $\pi ds_{эфф} = \pi$ ($s = \sqrt{\frac{1}{d^2} - \frac{1}{\xi_k^2}}$, если $d < 10$ нм, для произвольных d условие будет иметь вид $\pi ds_{эфф} = N\pi$, где N – минимально возможное натуральное число). Несмотря на то, что при дальнейшем росте ошибки возбуждения интенсивность дифрагированного пучка вновь будет увеличиваться, она будет в минимум 8–9 раз меньше интенсивности падающего пучка, т.е. для частицы нарушатся условия двухлучевого рассеяния: интенсивность дифрагированного и прошедшего пучков должны быть сопоставимы. В этом случае изменения толщины наночастицы уже не будут вносить заметных изменений в интенсивность прошедшего пучка и, следовательно, в ее контраст. Таким образом, уравнения (1.1) и (1.2) описывают зависимость интенсивности прошедшего и дифрагированного пучков от толщины наночастицы до тех пор, пока $\pi ds_{эфф} < \pi$ или $ds_{эфф} < 1$.

Зависимости интенсивности прошедшего и дифрагированных пучков от толщины наночастицы за рамками двухлучевого приближения (т.е. с учетом слабых отражений) не могут быть выражены аналитически. Данная задача решается численным моделированием на основе динамической многолучевой теории рассеяния [114]. Моделирование, в частности, может быть выполнено в программе JEMS [132]. На рис. 5 приведены полученные моделированием в JEMS зависимости интенсивности от толщины наночастицы серебра для прошедшего (рис. 5а–ж) и дифрагированных пучков (рис. 5ж).

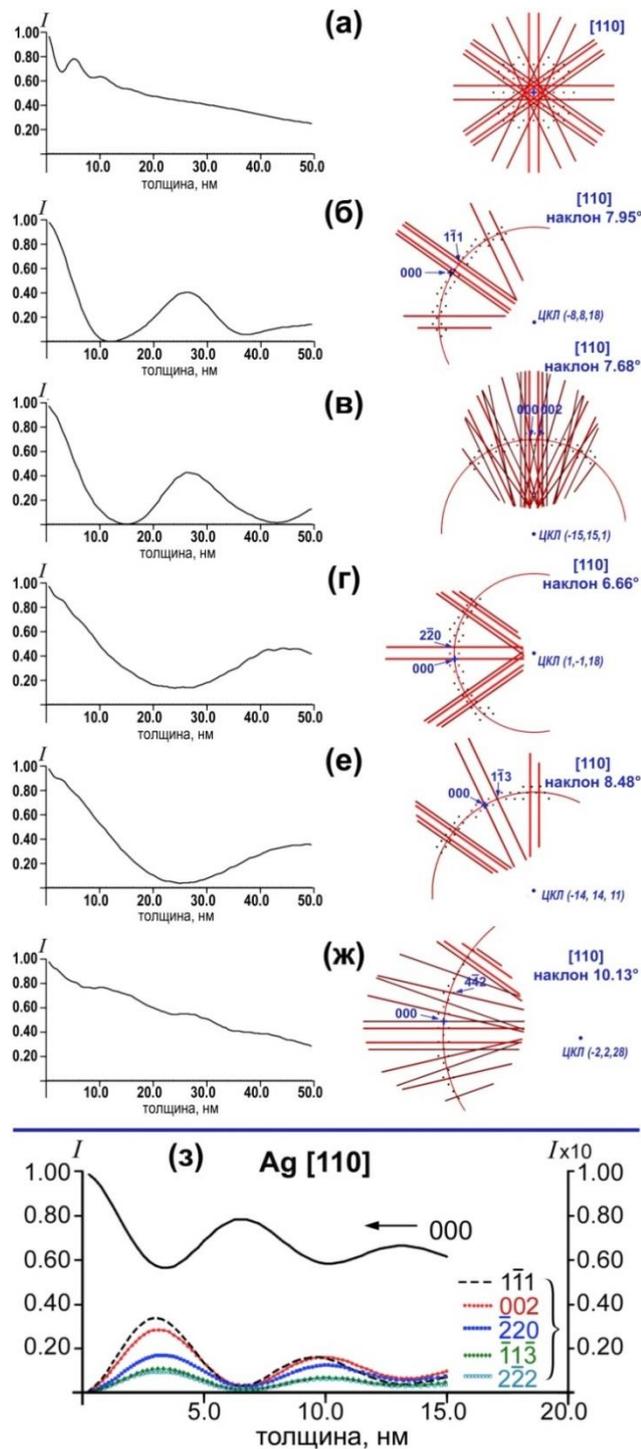


Рис. 5. Моделированные с помощью JEMS зависимости интенсивностей от толщины наночастицы серебра для прошедшего пучка в точной ориентации $[110]$ (а), для брэгговского положения с соответствующим отражением 1-11 (б), 002 (в), 2-20 (г), 1-13 (д) и 4-42 (е), справа показаны соответствующие картины дифракции, взятые вдоль точной оси зоны $[110]$. Моделированные зависимости прошедшего и дифрагированных пучков для точной ориентации $[110]$ (ж).

Как видно из рисунка 5а, немонотонность зависимости прошедшего пучка от толщины может наблюдаться для частиц серебра диаметром 10 нм, располагающихся в оси зоны [110], что было предсказано приведенными выше численными оценками.

Для кристалла серебра с помощью метода Монте-Карло были получены оценки относительной доли наночастиц с контрастом, образованным в условиях двухлучевой дифракции, многолучевой дифракции и частиц с масс-толщинным контрастом в зависимости от их диаметра. Написанным для этих целей алгоритмом генерировалось $n = 1000000$ пар случайных значений полярного $0 \leq \theta \leq \pi$ и азимутального $0 \leq \varphi \leq 2\pi$ углов, задающих направление падающего пучка электронов относительно частицы. Программа фиксировала количество направлений, при которых к сфере Эвальда располагался близко только один узел (m) и более одного узла (p). Отношение m/n задает, таким образом, относительную долю частиц с дифракционным контрастом в двухлучевых условиях, p/n – в многолучевых условиях, относительная доля частиц с масс-толщинным контрастом составляет $(n - p - m)/n$.

Критическое расстояние от узла обратной решетки до сферы Эвальда, при превышении которого интенсивность соответствующего дифрагированного луча считалась пренебрежимо малой, вычислялось из условия достижения интенсивностью дифрагированного пучка первого нуля (см. (2)) по мере поворота частицы от точного брэгговского положения:

$$\pi d \sqrt{s_k^{\text{критич.}2} + \frac{1}{\xi_k^2}} = \pi N, \text{ или } s_k^{\text{критич.}} = \sqrt{\left(\frac{N}{d}\right)^2 - \left(\frac{1}{\xi_k}\right)^2}, \text{ где } N - \text{минимально}$$

возможное натуральное число (подкоренное выражение минимально, что соответствует первому корню, но еще положительно). Как было указано выше, при удалении узла обратной решетки от сферы Эвальда условия двухлучевого приближения будут нарушены по достижении $I_k(t)$ первого.

Условие, что некоторый узел обратной решетки $[[hkl]]$ удален от сферы Эвальда, задаваемой полярным θ и азимутальным φ углами, не далее, чем на $s_k^{\text{критич.}}$, описывается следующей системой неравенств:

$$\begin{cases} (h/a - R\sin\theta\cos\varphi)^2 + (k/a - R\sin\theta\sin\varphi)^2 + (l/a - R\cos\theta)^2 \leq (R + s_k^{\text{критич.}})^2 \\ (h/a - R\sin\theta\cos\varphi)^2 + (k/a - R\sin\theta\sin\varphi)^2 + (l/a - R\cos\theta)^2 \geq (R - s_k^{\text{критич.}})^2 \end{cases}$$

где a – параметр решетки в прямом пространстве, $R = 1/\lambda_{200 \text{ кэВ}}$ – радиус сферы Эвальда.

Результат моделирования – зависимости относительной доли частиц с различным контрастом – приведены на рис. 6. Из графика видно, что среди частиц диаметром 10 нм более 20% обладают дифракционным контрастом, формирующимся в двухлучевых условиях, около 75% частиц обладают дифракционным контрастом, формирующимся в многолучевых условиях, масс-толщинным контрастом обладают менее 5% частиц.

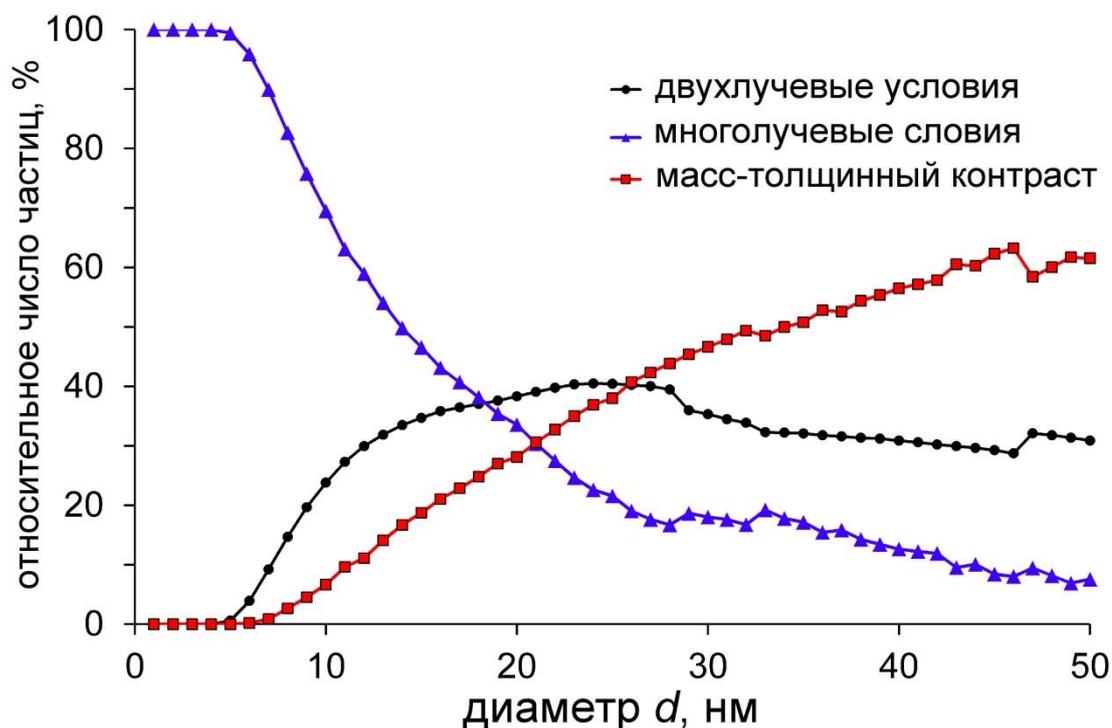


Рис. 6. Зависимость относительного числа Ag частиц с контрастом, формирующимся в условиях двухлучевой (●) и многолучевой дифракции (▲) и частиц с масс-толщинным контрастом (■) от диаметра частицы.

Рис. 6. демонстрирует, что учет дифракционного контраста является необходимым требованием при разработке алгоритмов измерения размеров наночастиц по их электронно-микроскопическим изображениям, поскольку подавляющее большинство кристаллических наночастиц будут иметь именно дифракционный контраст.

2.2. Пороговая обработка изображений для распознавания наночастиц размером до 10 нм.

В процессе разработки автоматических алгоритмов распознавания наночастиц в данной работе выявлены следующие факторы, которые необходимо учитывать при анализе стабилизированных полимерами наночастиц на (С)ПЭМ-изображениях:

- трудность установления границ частицы из-за низкого контраста, сравнимого с контрастом подложки;
- большая и неравномерная толщина полимерной пленки (матрицы);
- флуктуации плотности полимерной матрицы и особенности формирования электронно-микроскопического изображения аморфной подложки;
- разная высота расположения частицы в матрице, например полимерной пленке, толщина которой превосходит диаметр частиц;
- сложный контраст и наличие дифракционных эффектов на изображениях частиц или подложки;
- агломерирование частиц с перекрытием границ.

Программа АнНа все указанные выше проблемы, включая измерение размеров объектов с частичным перекрытием границ.

В разработанной программе АнНа для распознавания изображений наночастиц был использован метод глобальной пороговой обработки, при которой порог устанавливается пользователем вручную. С помощью данного метода программа выделяет те области микрофотографии Ω , где изображения частиц присутствуют доподлинно.

Подавление шума в процессе предварительной обработки осуществляется с помощью операции размытия: пиксели изображения группируются в одинаковые квадраты, размер которых в пикселях (уровень размытия) задается пользователем, затем уровень серого в пределах каждого квадрата усредняется. Другими словами, операция размытия – это намеренное снижение разрешения изображения. Увеличение уровня размытия позволяет сгладить любые шумы, однако, если уровень превышает характерный диаметр частиц на снимке, близкорасположенные частицы могут быть распознаны как один объект. Поэтому программа АнНа была снабжена функцией «чистки пыли»: пользователь может задать пороговый линейный размер, после чего программа будет игнорировать объекты с линейными размерами меньше порогового. Это позволяет не устанавливать слишком высокий уровень размытия изображения, приводящий к слиянию частиц, а относительно маленькие группы пикселей фона, распознанные как частицы, игнорировать. Популярная процедура сглаживания, заключающаяся в том, что каждому пикселю ставится в соответствие среднее значение уровней серого восьми соседних пикселей, также была включена в программу АнНа. Если шумы на микрофотографии слабы, использование сглаживания может существенно упростить процесс распознавания частиц.

На практике с помощью бинаризации распознавание изображения наночастицы осуществляется корректно, если максимальная разница между средним уровнем серого фона и на изображении частицы оказывается не менее 5σ , где σ – дисперсия значений уровня серого пикселей фона.

Для работы с микрофотографиями, имеющими неравномерный фон, вместо использования локальной пороговой обработки (сегментации [125]), которой свойственно времязатратное деление изображения на участки и установление порога для каждого из них, программа АнНа была оснащена предложенным в [133] алгоритмом «катящегося шара» для вычитания фона. Данный алгоритм можно описать следующим образом. Введя для снимка третью ось и отложив вдоль нее уровень серого каждого пикселя, получим

поверхность, на которой изображениям частиц будут соответствовать ямки (в случае светлопольного изображения). При качении по такой поверхности шара с радиусом достаточно большим, чтобы шар не проваливался в ямки, его центр опишет еще одну поверхность, на форму которой окажут влияние только общие вариации уровня серого, но не изображения наночастиц. Графическая интерпретация данного алгоритма приведена на рис. 7.

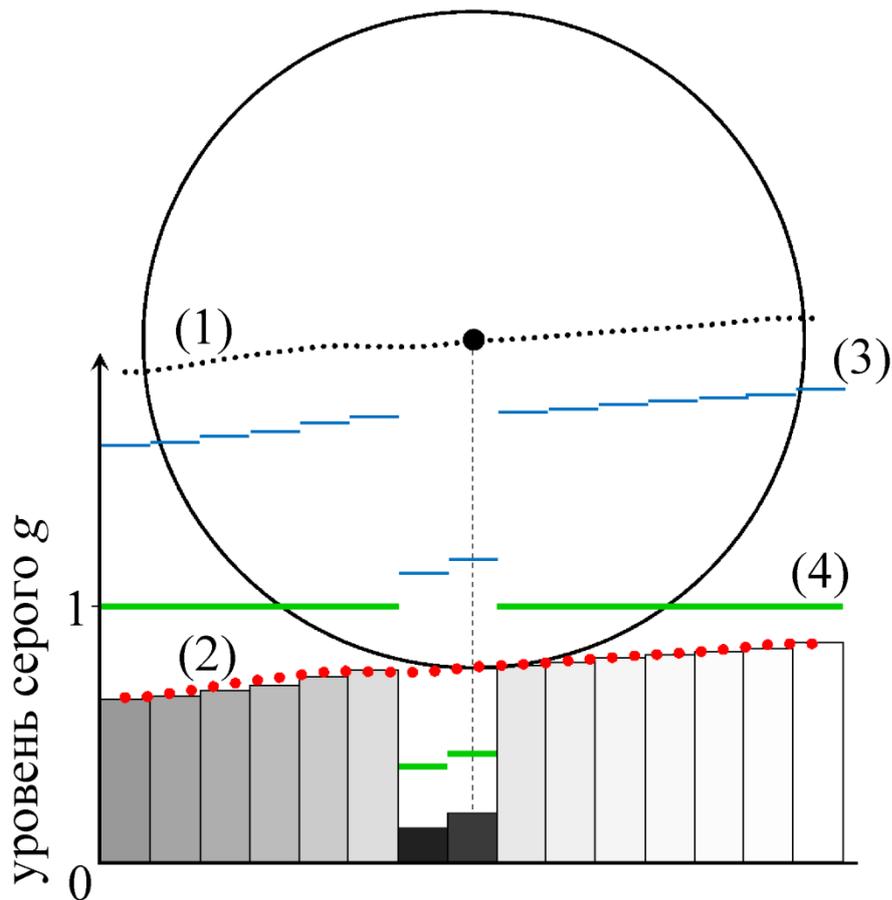


Рис. 7. Схема вычитания фона методом катящегося шара: гистограмма – поверхность, задаваемая оригинальным распределением уровня серого $g_{\text{исходн}}(x,y)$, 1 – поверхность $C(x,y)$, описываемая центром шара, 2 – поверхность $(C(x,y) - R)$, задаваемая точкой касания шара поверхности $g_{\text{исходн}}(x,y)$, 3 – $(g_{\text{исходн}}(x,y) + 1)$, 4 – новое распределение уровня серого с равномерным фоном $g_{\text{равн}}(x,y) = (g_{\text{исходн}}(x,y) + 1) - (C(x,y) - R)$.

Заданную центром шара поверхность можно использовать для получения нового изображения с равномерным фоном: $g_{\text{равн}}(x, y) = (g_{\text{исходн}}(x, y) + 1) - (C(x, y) - R)$, где $C(x, y)$ – поверхность, описываемая центром шара, R – радиус шара.

Результат вычитания фона программой АнНа показан на рис. 8. Светлопольное СПЭМ-изображение с наночастицами имеет неравномерное распределение фона с вертикальной темной полосой в правой части микрофотографии (рис. 8а), на что указывает профиль распределения интенсивности (рис. 8б). После вычитания фона на изображении (рис. 8в) профиль распределения интенсивности выравнивается (рис. 8г).

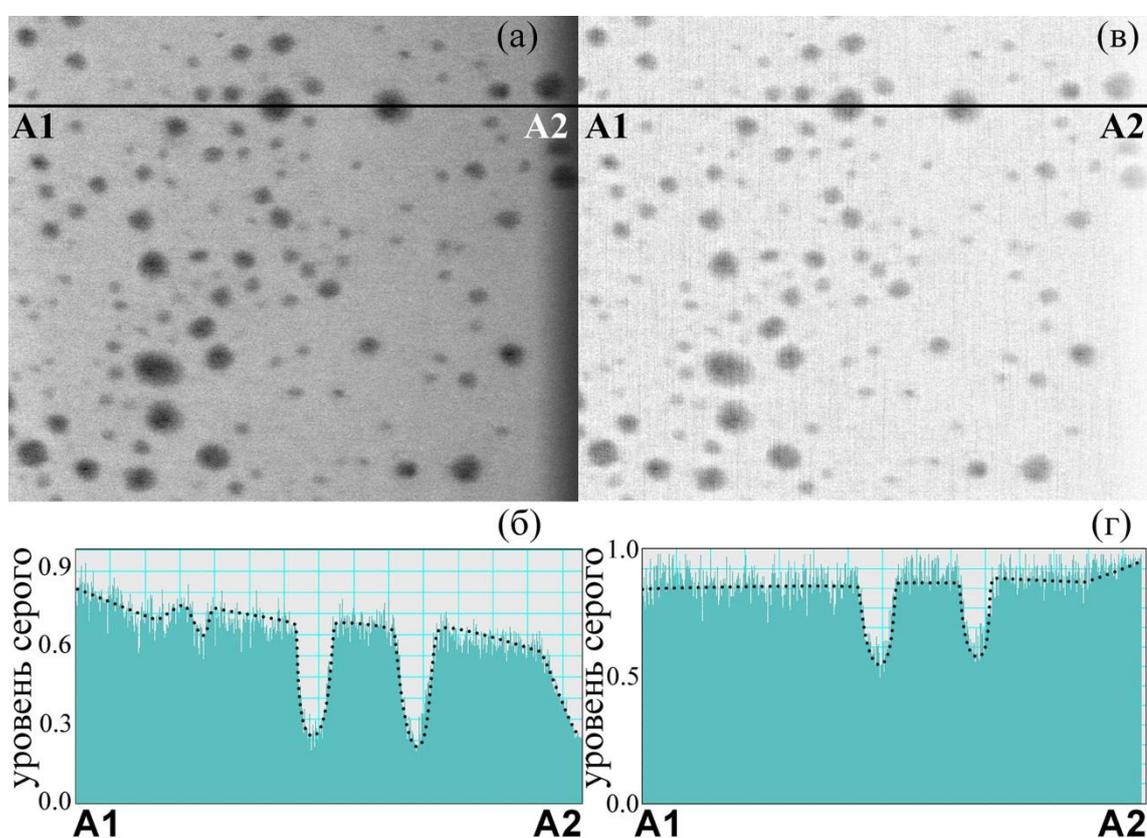


Рис. 8. Светлопольное СПЭМ-изображение с неравномерным фоном в виде темной вертикальной области в правой стороне микрофотографии (а), соответствующий профиль уровня серого вдоль линии А1–А2 (б), это же изображение после вычитания фона с использованием шара радиусом 50 пикселей в программе АнНа (в), соответствующий профиль уровня серого вдоль линии А1–А2 (г).

Однако процедура, математически воплощающая описанный процесс катания шара, весьма затратна (требует значительных вычислительных ресурсов): для ее выполнения требуется выполнить порядка $h \cdot w \cdot R^2$ действий, где h и w – высота и ширина изображения в пикселях, R – заданный радиус шара.

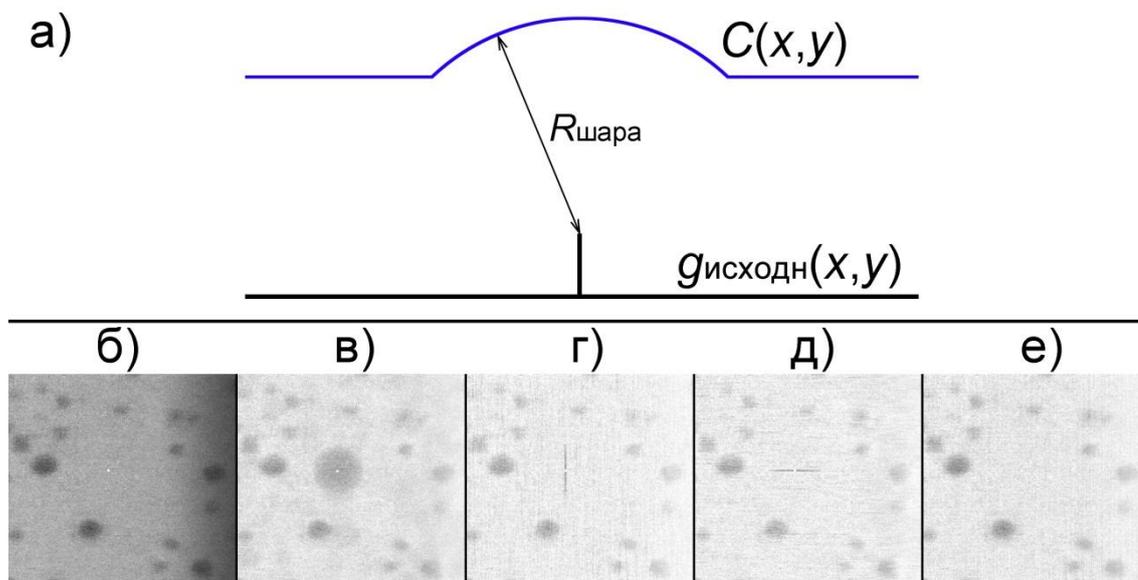


Рис. 9. Схема формирования поверхности $C(x,y)$ (светлопольное изображение) при наличии выделяющегося светлого пикселя – (а), пример изображения с неравномерным фоном, на котором присутствует выделяющийся светлый пиксель – (б), результат вычитания фона, реализованный методом катящегося шара – (в), результат вычитания фона, реализованный методом катящегося по вертикали кольца – (г), результат вычитания фона, реализованный методом катящегося по горизонтали кольца – (д), результат вычитания фона в программе АнНа – (е).

В связи с этим в программе АнНа была реализована процедура, имитирующая качение не шара, а кольца по горизонтальным и вертикальным рядам пикселей. Такая процедура требует порядка $h \cdot w \cdot R$ действий. При этом значение $C(x,y)$ выбирается как меньшее из двух координат вдоль третьей оси центров колец, катящихся над пикселем (x,y) по горизонтали и вертикали. Такая реализация вычитания фона позволяет избежать проблемы,

возникающей при наличии обособленных групп или единичных пикселей, чей уровень серого оказывается резко выше, чем характерный уровень серого изображения. Таким пикселям на поверхности $g_{\text{исходн}}(x, y)$ соответствуют высокие пики (в случае светлопольных изображений), которые искажают поверхность $C(x, y)$, что в итоге искажает изображение, на котором ожидается получить равномерный фон (см. рис. 9).

2.3. Определение размеров наночастиц: аппроксимация полиномиальной модели к изображениям.

Все автоматизированные алгоритмы для обработки изображений учитывают абсолютные значения уровня серого и/или его изменения от пикселя к пикселю [127–129,134,135]. В случае электронно-микроскопического изображения абсолютное значение уровня серого в некоторой точке зависит как от толщины наночастицы в соответствующей точке, так и от ряда других факторов: полной толщины образца, настройки записи изображения CCD-камерой (яркость, контраст, гамма-коррекция), размеров диафрагм и т.д. Однако при условии, что подложка и полимерная пленка не претерпевают значительных изменений толщины в латеральных направлениях на расстояниях порядка диаметра наночастицы, можно полагать, что изменения уровня серого будут обусловлены только изменениями толщины самой наночастицы. Поэтому в настоящей работе предложена аппроксимация теоретической зависимости уровня серого $g_{\text{модель}}(x, y)$ к реальному распределению уровня серого $g(x, y)$. Преимущества такой методики 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 величине длины, приходящейся на один пиксель.

Для реализации данного подхода необходимо, однако, осуществить выбор модели $g_{\text{модель}}(x, y)$.

При выборе модели зависимости уровня серого от толщины наночастицы $g(t)$ необходимо принимать во внимание, что данная модель должна позволять собирать надежную статистику в течение как можно более короткого интервала времени. Компьютер работает с экспонентой или тригонометрическими функциями дольше, чем со сложениями и умножениями, поэтому использование в модели этих функций, несмотря на то, что они достаточно точно описывают изменение интенсивности прошедшего пучка электронов в зависимости от толщины наночастицы в случае масс-толщинного, дифракционного и Z-контраста, замедлит обработку изображения. При необходимости измерить несколько сотен размеров наночастиц такое замедление существенно скажется на общем времени обработки. Явный учет уравнений (1.1) и (1.2) в модели затрудняется тем, что экстинкционная длина ξ_k и ошибка возбуждения s зависят от ориентации наночастицы и, таким образом, меняются от частицы к частице случайным образом.

Оптимальным будет использование в качестве модели $g(t)$ полинома по степеням толщины наночастицы: $g(t) = g_0 + g_1 t(x, y) + g_2 t^2(x, y) + g_3 t^3(x, y) + \dots$, так как любая реальная зависимость может быть аппроксимирована с требуемой точностью полиномом достаточно большой степени. $t(x, y)$ – толщина наночастицы в точке (x, y) , g_i – неопределенные коэффициенты. В сферическом приближении:

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

В приближении стержня:

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

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

Неопределенные коэффициенты g_i , координаты центра (x_c, y_c) и модельный диаметр d и, если работать в стержневом приближении, длина L частицы вычисляются в процессе аппроксимации. Для получения распределений наночастиц по размерам представляют интерес результирующие значения диаметра и длины частиц в рамках модели, которые принимаются за истинные.

Нижняя граница старшей степени полинома диктуется немонотонностью зависимости интенсивности прошедшего и дифрагированных пучков от толщины наночастицы. Как было продемонстрировано выше, указанная немонотонность может проявляться уже для частиц до 10 нм в диаметре, поэтому степень полинома должна быть как минимум 2.

Для определения верхней границы старшей степени полиномиальной модели была выполнена аппроксимация полиномов с различной старшей степенью к обезразмеренной зависимости (1.2) (рис. 10). Как видно из рисунка, полином со старшей степенью 4 обеспечивает достаточно точную аппроксимацию (коэффициент детерминации $R^2 = 0.99$). Поскольку зависимость $g(t)$ связана с зависимостью $I(t)$ через передаточную функцию CCD-камеры линейно, точная аппроксимация полинома к зависимости $I(t)$ обеспечивает точную аппроксимацию полинома с той же старшей степенью к зависимости $g(t)$: второй полином получается из первого умножением его коэффициентов на коэффициент пропорциональности между g и I .

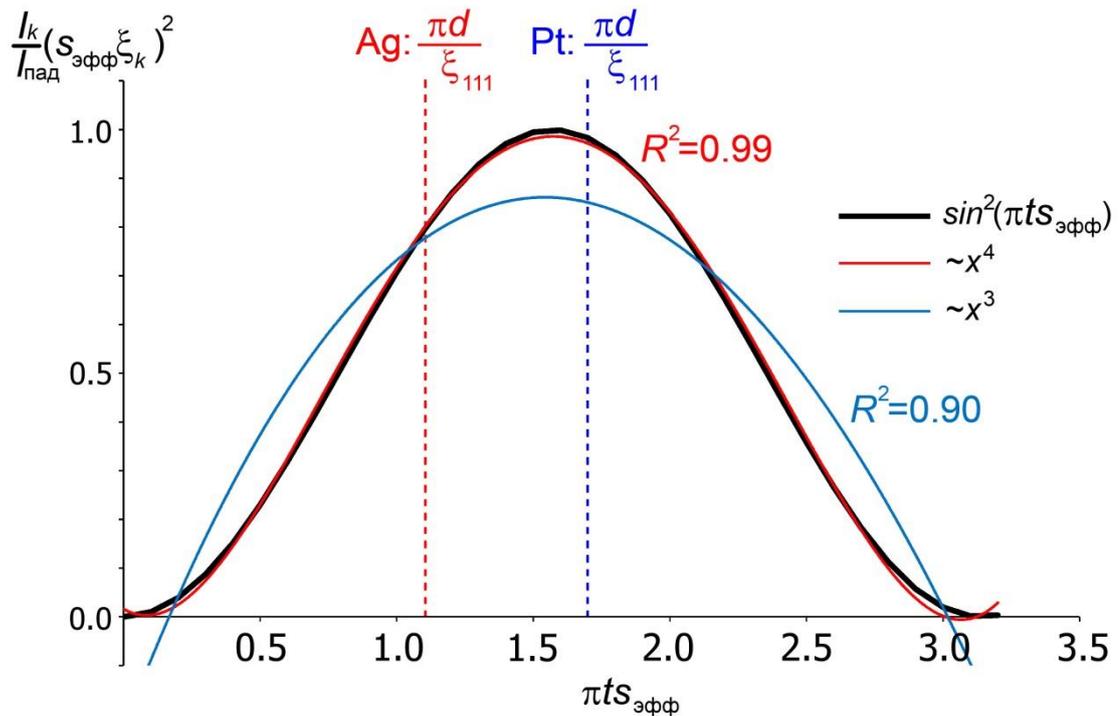


Рис. 10. Обезразмеренная зависимость (1.2) интенсивности дифрагированного пучка I_k от толщины t и аппроксимированные полиномы третьей и четвертой степени, коэффициенты детерминации R^2 соответственно равны 0.90 и 0.99.

Аналогично аппроксимация была проведена для зависимости, представленной на рис. 5а, на интервале от 0 до 10 нм (на данном интервале указанная зависимость имеет наибольшее количество точек экстремума из всех зависимостей на рис. 5). Рис. 11 демонстрирует результаты аппроксимации полиномов со старшими степенями 3, 4 и 5. Как видно из графика, в данном случае оказалось, что для рассматриваемой зависимости по окончании аппроксимации у полинома четвертой степени старший коэффициент по модулю много меньше единицы и значения полиномов третьей и четвертой степени отличаются незначительно. Полином со старшей степенью 4 обеспечивает не столь высокий коэффициент детерминации ($R^2 = 0.87$), как полином со старшей степенью 5 ($R^2 = 0.99$). Однако, учитывая, что рассматривается наиболее сложная зависимость, а на реальной микрофотографии всегда присутствуют шумы, использование полиномов со старшей степенью 5 на практике лишь сделает процесс аппроксимации

неоправданно долгим. Поэтому можно утверждать, что учет многолучевой дифракции не требует повышения верхней границы старшей степени полинома, и для аппроксимации распределения уровня серого для частиц до 10 нм могут быть использованы полиномы со старшими степенями от 2 до 4.

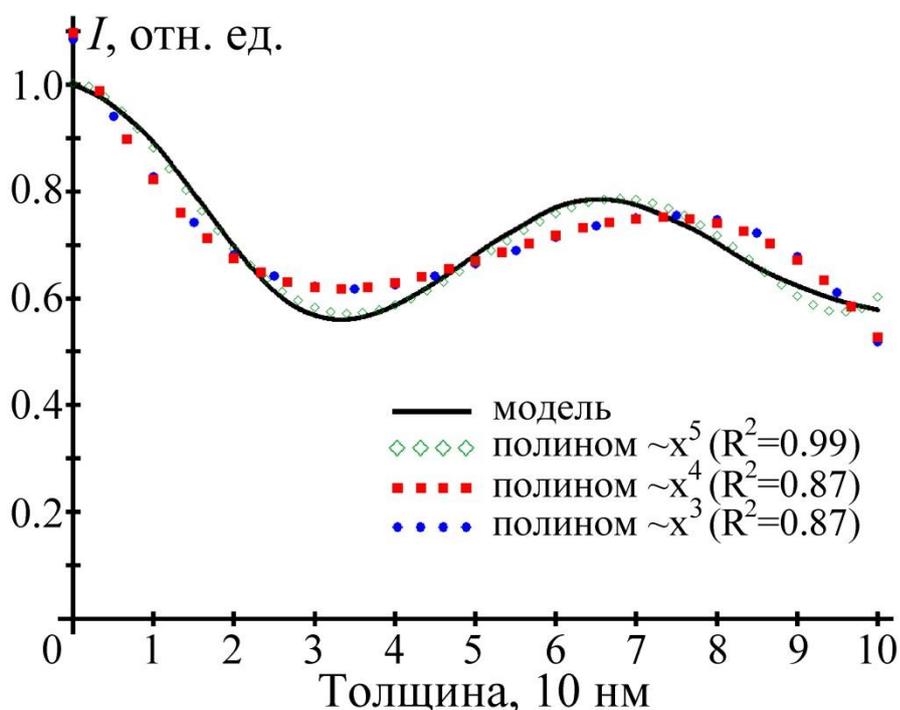


Рис. 11. Графики полиномов со старшими степенями 3, 4 и 5, аппроксимированные к зависимости интенсивности прошедшего пучка от толщины наночастицы серебра при прохождении волны электронов вдоль оси зоны [110] (рис. 5а).

В программе АнНа аппроксимация выполняется по методу наименьших квадратов. Это означает, что программа ищет минимум целевой функции F , которая конструируется следующим образом: $F = \sum_{i,j \in \Omega} (g_{i,j} - g(t(x_i, y_i)))^2$, где Ω – выделенная бинаризацией область с изображением наночастицы, сумма вычисляется по всем пикселям данной области, $g_{i,j}$ – уровень серого пикселя i -й строки и j -го столбца, $g(t(x_i, y_i))$ – уровень серого модели в центре пикселя i -й строки и j -го столбца. Минимизация целевой функции выполняется методом Нелдера-Мида [136], также известным как метод деформируемого многогранника. Данный метод – один из наиболее

устойчивых, но требующих большого количества итераций [137]. Методы, анализирующие вторые производные целевой функции (гессиан), могут находить минимум за 10 и менее итераций, однако они крайне неустойчивы и требуют подробного предварительного изучения целевой функции [137]. В задачах обработки электронно-микроскопических изображений это выполнить невозможно, так как в данном случае целевая функция определяется текущим изображением наночастицы. Метод градиентного спуска, учитывающий первые производные целевой функции, может рассматриваться как достойный компромисс между скоростью и устойчивостью, однако, будучи примененным в настоящей задаче, также весьма часто проявляет неустойчивость.

Из всех процедур, реализованных в программе АнНа, аппроксимация требует наибольшего количества операций. Ее длительность зависит от выбора начальных параметров модели: g_i, x_c, y_c, d . Для ускорения аппроксимации была реализована оценка начальных параметров модели индивидуально для каждой наночастицы по результатам бинаризации.

Начальное значение диаметра наночастицы в рамках модели вычисляется как больший линейный размер бинаризованной области. Положение центра частицы в рамках модели вычисляется как «центр масс» изображения (для светлополюсных изображений):

$$x_c = \frac{\sum_{i,j \in \Omega} (1 - g_{i,j}) x_i}{\sum_{i,j \in \Omega} (1 - g_{i,j})}$$

$$y_c = \frac{\sum_{i,j \in \Omega} (1 - g_{i,j}) y_j}{\sum_{i,j \in \Omega} (1 - g_{i,j})}$$

Неопределенный коэффициент g_0 , задающий уровень серого фона, вычисляется как среднее арифметическое уровней серого пикселей вдоль сторон прямоугольника, содержащего бинаризованную область (рис. 12).

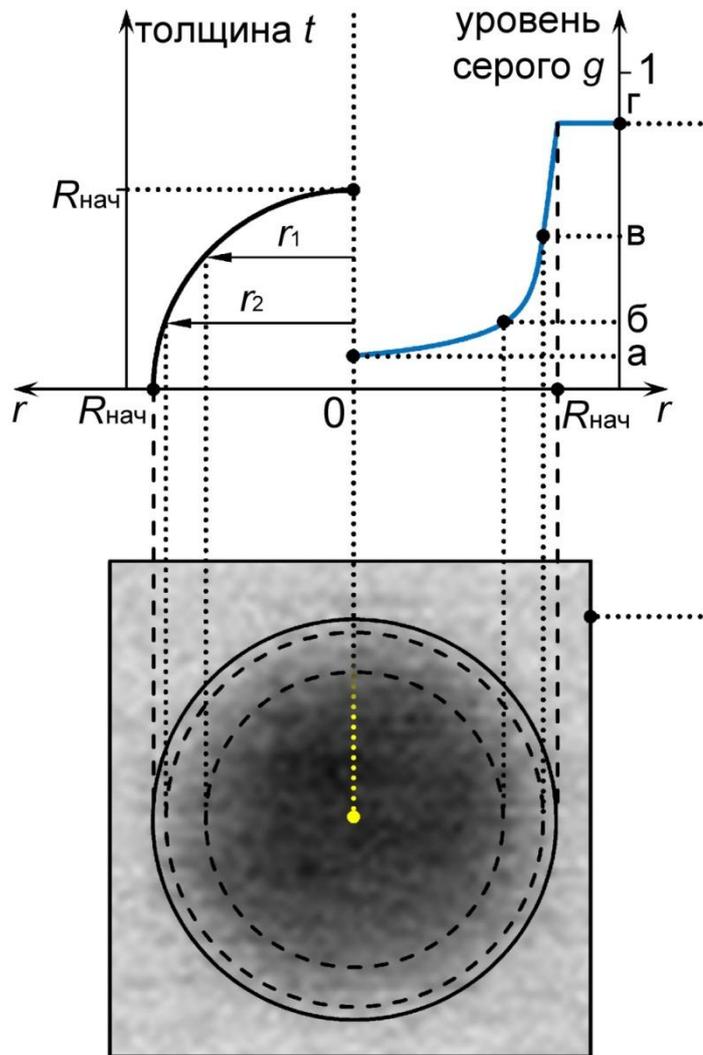


Рис. 12. Пример схемы оценки начальных параметров перед началом процедуры аппроксимации для полиномиальной модели со старшей степенью, равной трем: зависимость толщины сферической частицы от расстояния до ее центра (—), r_1 и r_2 – радиусы эквидистантных сечений и соответствующие им окружности (пунктирная линия), (а) – уровень серого изображения наночастицы в точке начального модельного центра, (б), (в) – средние значения уровней серого вдоль окружностей с радиусами r_1 и r_2 , (г) – среднее значение вдоль сторон прямоугольника, описанного вокруг бинаризованной области, предварительное модельное распределение уровня серого до начала аппроксимации (—).

Для того чтобы вычислить начальные значения остальных неопределенных коэффициентов g_i ($i > 0$), программа производит

следующие действия: строится ряд окружностей с общим центром, располагающимся в «центре масс» бинаризованной области. Радиусы окружностей соответствуют эквидистантным сечениям сферы, радиус которой равен начальному радиусу наночастицы в рамках модели. Число сечений на единицу меньше старшей степени используемого полинома модели. Программа вычисляет значения неопределенных коэффициентов таким образом, чтобы значение модельного уровня серого совпадало с реальным уровнем серого в «центре масс» и со средним уровнем серого вдоль соответствующих сечениям окружностей (рис. 12).

Такой алгоритм оценки начальных параметров не требует больших временных затрат и ускоряет процесс нахождения минимума целевой функции. Отсутствует риск получения некорректного диаметра наночастицы, соответствующего постороннему локальному минимуму целевой функции, поскольку параметры модели оказываются близкими к своим окончательным значениям.

Существенным отличием программы АнНа от других программ для статистического анализа размеров наночастиц является то, что измерения диаметров проводятся с использованием оригинального изображения, которое программа хранит в памяти после загрузки. Все предварительные операции необходимы только для корректного распознавания изображений наночастиц, не искажают оригинальное изображение и не могут нарушить точность измерения.

Рис. 13 демонстрирует результаты измерения размеров наночастиц в программе АнНа. На рис. 13а, б приведены исходные изображения наночастиц. Частица на рис. 13а имеет монотонную зависимость уровня серого от толщины, частица на рис. 13б, очевидно, немонотонную. На рис. 13в, г приведены распределения уровня серого в рамках квадратичной модели $g(t)$ для частиц сферической формы на основе параметров, вычисленных в процессе аппроксимации, которые составили для частицы (а):

$d = 47.2489$ пикселей, $g_0 = 741.9192 \cdot 10^{-3}$, $g_1 = 23.1809 \cdot 10^{-4}$, $g_2 = -86.5338 \cdot 10^{-5}$, для частицы (б): $d = 41.7387$ пикселей, $g_0 = 777.2017 \cdot 10^{-3}$, $g_1 = -916.6787 \cdot 10^{-4}$, $g_2 = 319.9989 \cdot 10^{-5}$; графическое представление распределений уровня серого выполнены в программе Matlab и могут быть воспроизведены в любом программном пакете, позволяющем устанавливать RGB-значения пикселей холста. На рис. 13д, е представлены профили уровня серого вдоль линий АБ и ВГ микрофотографий и квадратичных моделей для обеих частиц.

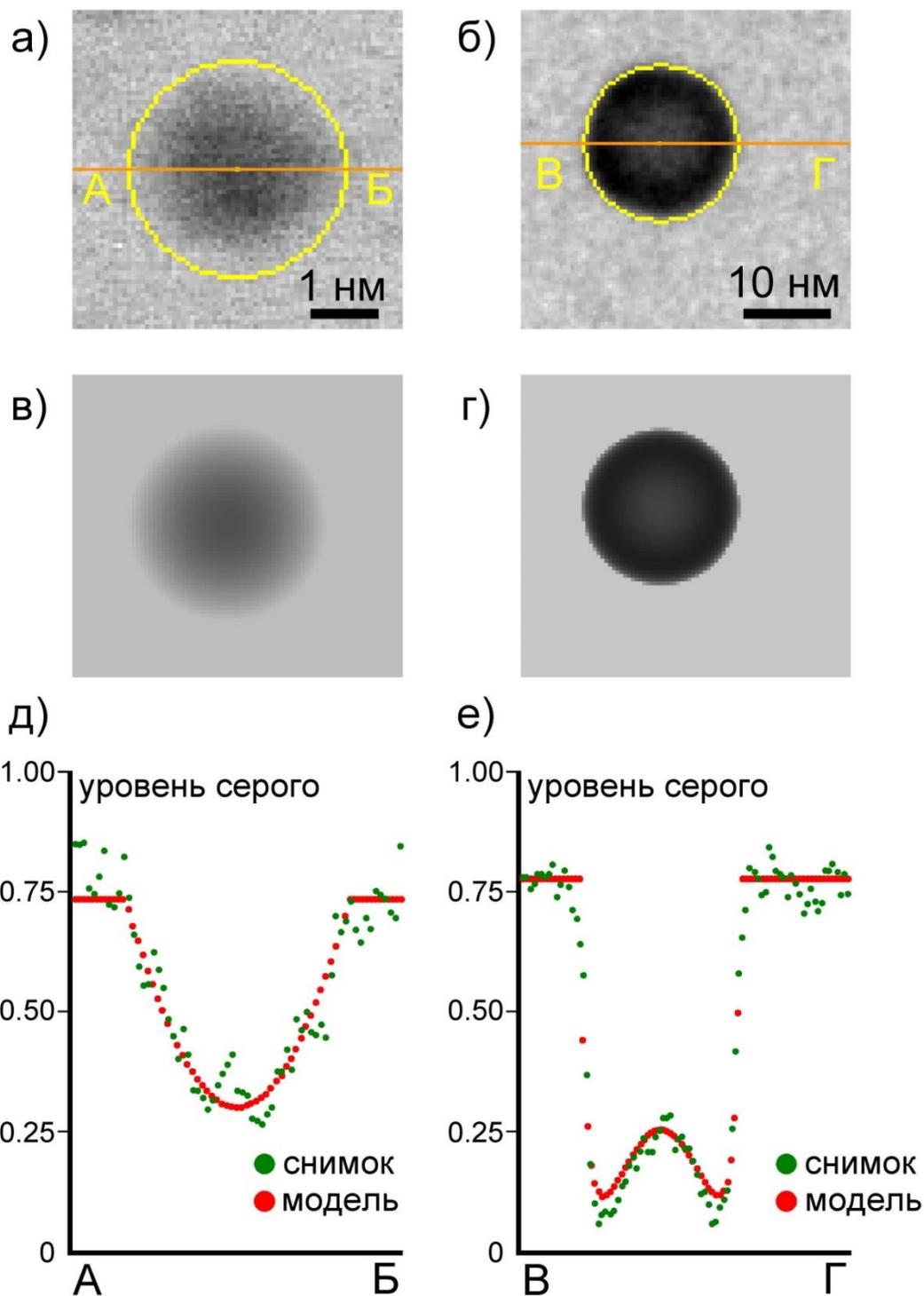


Рис. 13. Пример изображений наночастиц, измеренных в программе AnNa (а, б), модельные распределения уровня серого по окончании аппроксимации (в) – для частицы (а), (г) – для частицы (б), профиль распределения уровня серого изображения (●) и аппроксимированной модели (●) вдоль линии АБ (д) и вдоль линии ВГ (е).

2.4. Архитектура компьютерной программы «Анализатор Наночастиц» (АнНа).

Внешний вид программы АнНа приведен на рис. 14.

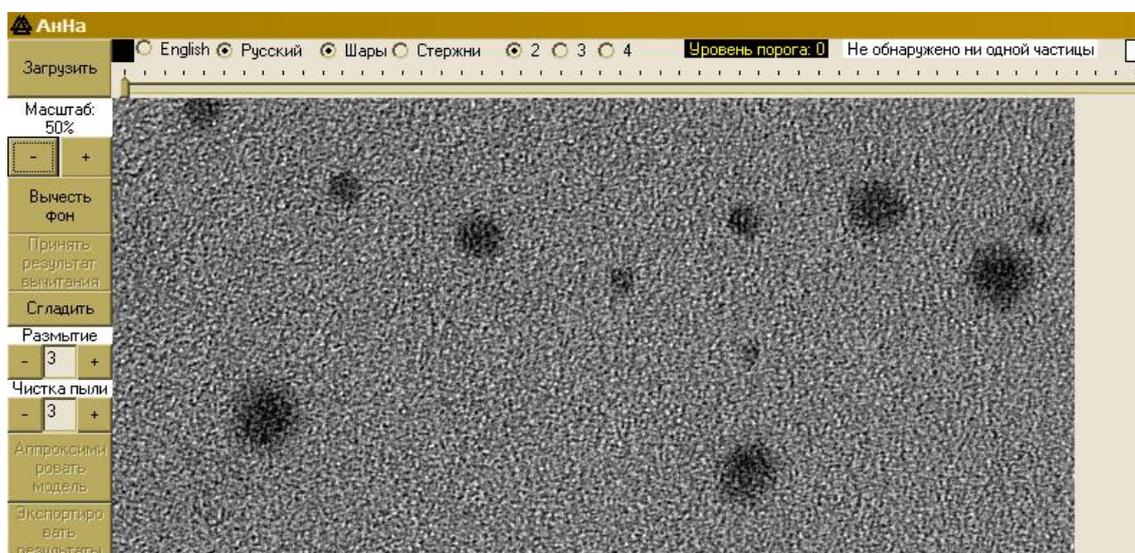


Рис. 14. Внешний вид программы АнНа.

Работа с программой начинается с загрузки изображения нажатием кнопки «Загрузить». Программа позволяет загружать изображения формата .BMP и .JPG. После выбора файла пользователю необходимо указать в диалоговом окне в темном или в светлом поле получена микрофотография (рис. 15).

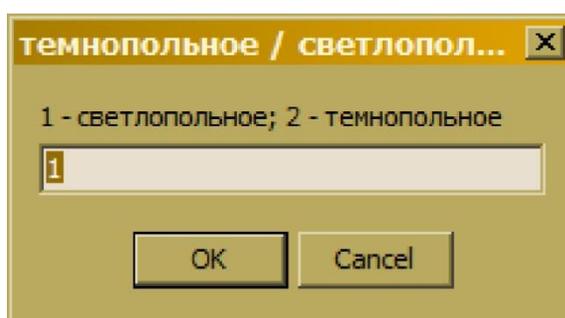


Рис. 15. Диалоговое окно выбора типа микрофотографии – светлопольного или темнопольного.

По окончании загрузки изображения станут доступны кнопки управления, с помощью которых будет осуществляться корректное распознавание и измерение размеров наночастиц.

Основной инструмент распознавания наночастиц – слайдер, на котором вручную устанавливается уровень порога. Шкала слайдера имеет соответствующий 8-битным изображениям интервал уровня серого от 0 до 255, а не используемый в научной литературе по анализу изображений интервал от 0 до 1. Пороговый уровень может устанавливаться мышью или нажатием кнопок «Page Up» и «Page Down». На рис. 16 представлено изображение программы с загруженной ПЭМ-микрофотографией.

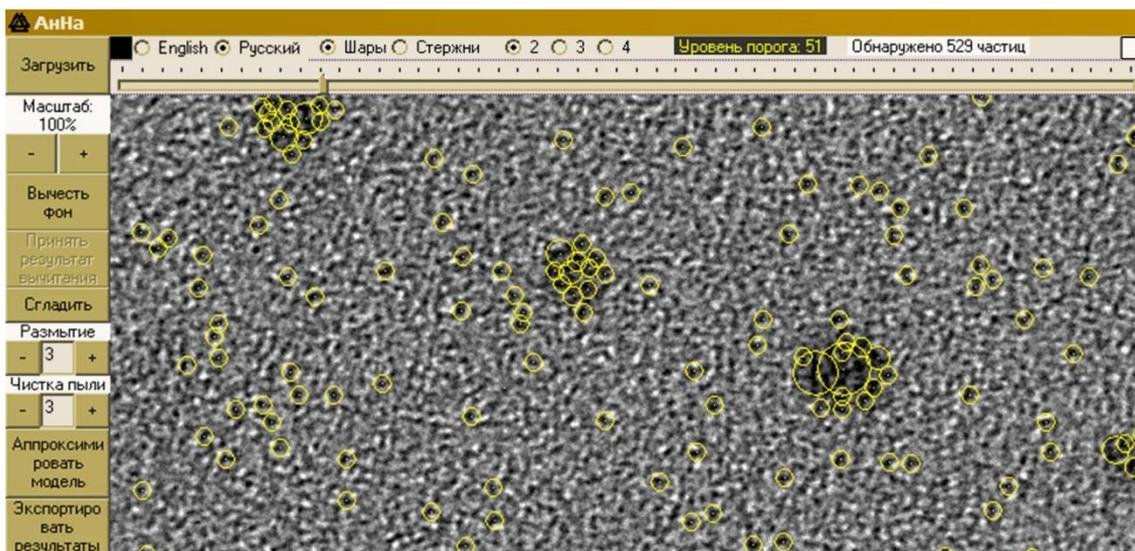


Рис. 16. Программа AnNa с загруженной ПЭМ-микрофотографией наночастиц, на котором группы темных пикселей распознаны как изображения частиц.

Как можно видеть на рис. 16, программа может распознать как частицы группы темных пикселей, представляющих собой шумы фона. Уровень серого таких групп действительно ниже установленного порога, однако размеры существенно меньше размеров частиц. Для решения подобной проблемы введена операция «чистки пыли», которая заключается в установлении порогового размера, после чего объекты с размером менее порогового программой игнорируются. На рис. 17 показано, что при установке минимального размера в 12 пикселей программа больше не распознает маленькие группы пикселей фона.

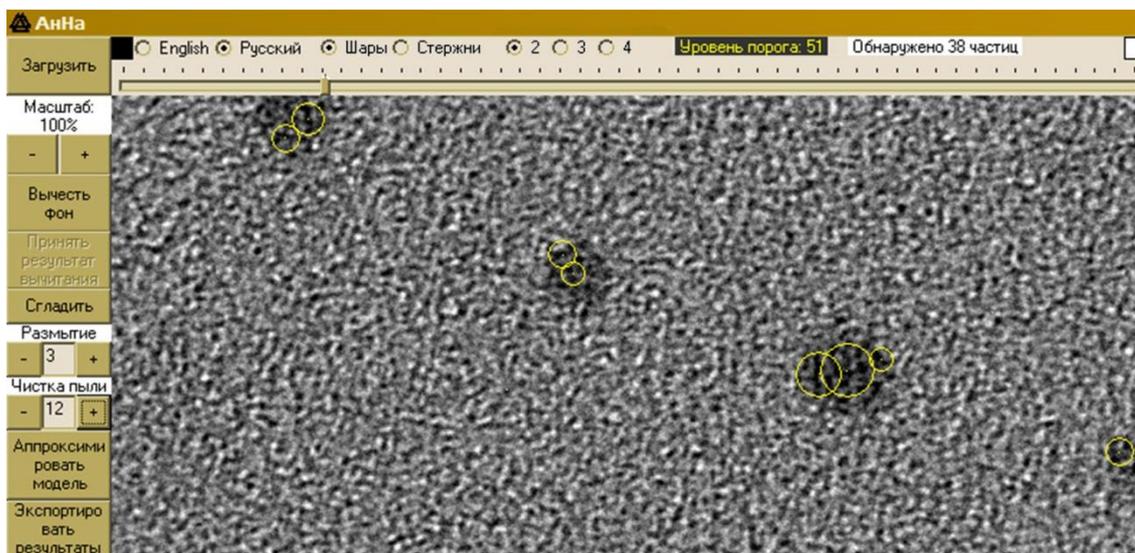


Рис. 17. Распознавание наночастиц после увеличения уровня «чистки пыли» (см. рис. 16).

Однако, как видно на рис. 17, изображения частиц распознаются программой не как единое целое. При наличии сильного шума на изображении присутствуют не только группы темных пикселей, но и группы светлых пикселей. Последние, располагаясь на изображениях наночастиц, заставляют программу воспринимать изображение одной частицы как изображения нескольких частиц. Предотвратить расщепление изображений частиц позволяет операция размытия: в программе устанавливается значение в пикселях, которое программа использует как размеры стороны квадратов, на которые изображение разбивается, и уровень серого усредняется в пределах каждого квадрата. Другими словами, данная процедура представляет собой намеренное снижение разрешения изображения. На рис. 18 показано, что при повышении уровня размытия частицы могут быть распознаны корректно.

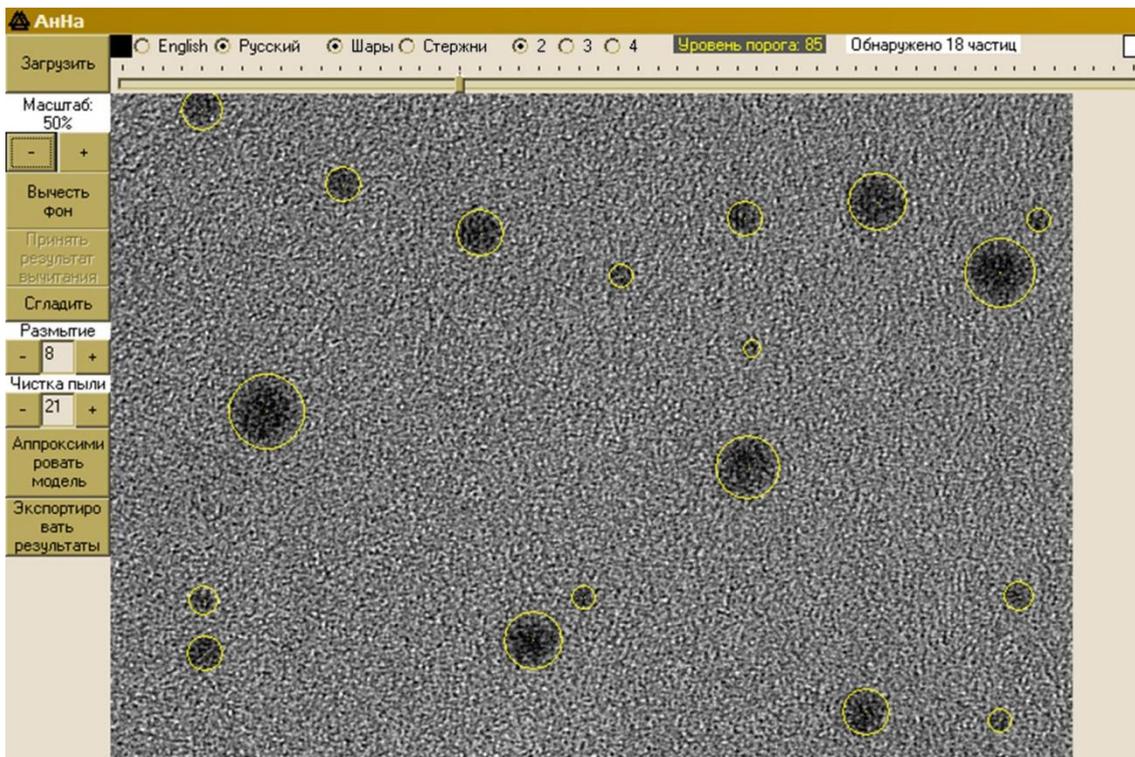


Рис. 18. Корректное распознавание изображений наночастиц после повышения уровня размытия (см. рис. 16 и 17).

Example_results — Блокнот	Example_results_1 — Блокнот
Файл Правка Формат Вид	Файл Правка Формат Вид
диаметры в единицах пикселей	диаметры в единицах пикселей
57	57,000000000000
49	47,5948157400952
81	81,8301270121190
49	47,7754942126256
33	33,5164222726129
65	65,3753284378955
97	96,0113499172453
33	33,0000000000000
25	25,3042320633420
105	107,471884184051
89	89,4139502975636
41	39,3603341182232
33	35,6694393414127
41	41,6616699048414
81	81,9336457875955
49	50,2574926815087
65	64,2317575043633
33	32,0961585632620

Рис. 19. Результаты измерения размеров наночастиц (см. рис. 18) после экспорта непосредственно по окончании распознавания изображений (а), после выполнения процедуры аппроксимации (б).

После распознавания изображений наночастиц пользователь может сразу экспортировать результаты, полученные на основе бинаризации, или запустить процедуру аппроксимации, после которой размеры частиц будут измерены точнее. Программа экспортирует результаты как массив данных в текстовый файл с расширением .TXT. На рис. 19 показано содержимое файлов, в которые был произведен экспорт результатов до (рис. 19а) и после (рис. 19б) процедуры аппроксимации. Графическая интерпретация

результатов может быть произведена в доступных программах (Excel, Origin и т.д.).

Если изображение имеет неравномерный фон, корректно распознать изображения наночастиц с помощью пороговой обработки оказывается невозможным. Для обработки микрофотографий с неравномерным фоном в программе реализована процедура вычитания фона (математические основы описаны в п. 2.2.). После нажатия на соответствующую кнопку программа предложит пользователю ввести значение радиуса шара, который будет использован для вычитания фона (рис. 20), по умолчанию используется значение в 30 пикселей.

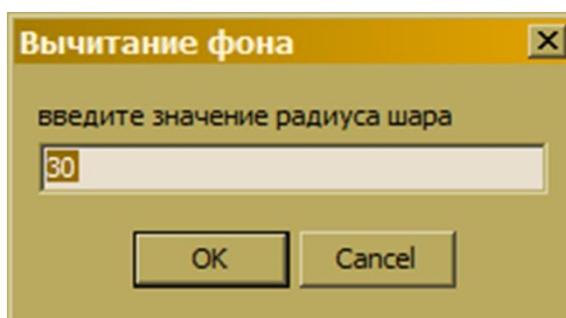


Рис. 20. Диалоговое окно ввода значения диаметра шара, используемого для вычитания фона.

Результат вычитания продемонстрирован на рис. 21 на примере СПЭМ-микрофотографии с регистрацией высокоугловых электронов. На оригинальном изображении (рис. 21а) уровень фона слева выше, что приводит к тому, что программа регистрирует его фон как большую частицу. После применения операции вычитания фона фон изображения становится равномерным, и все частицы распознаются корректно (рис. 21б).

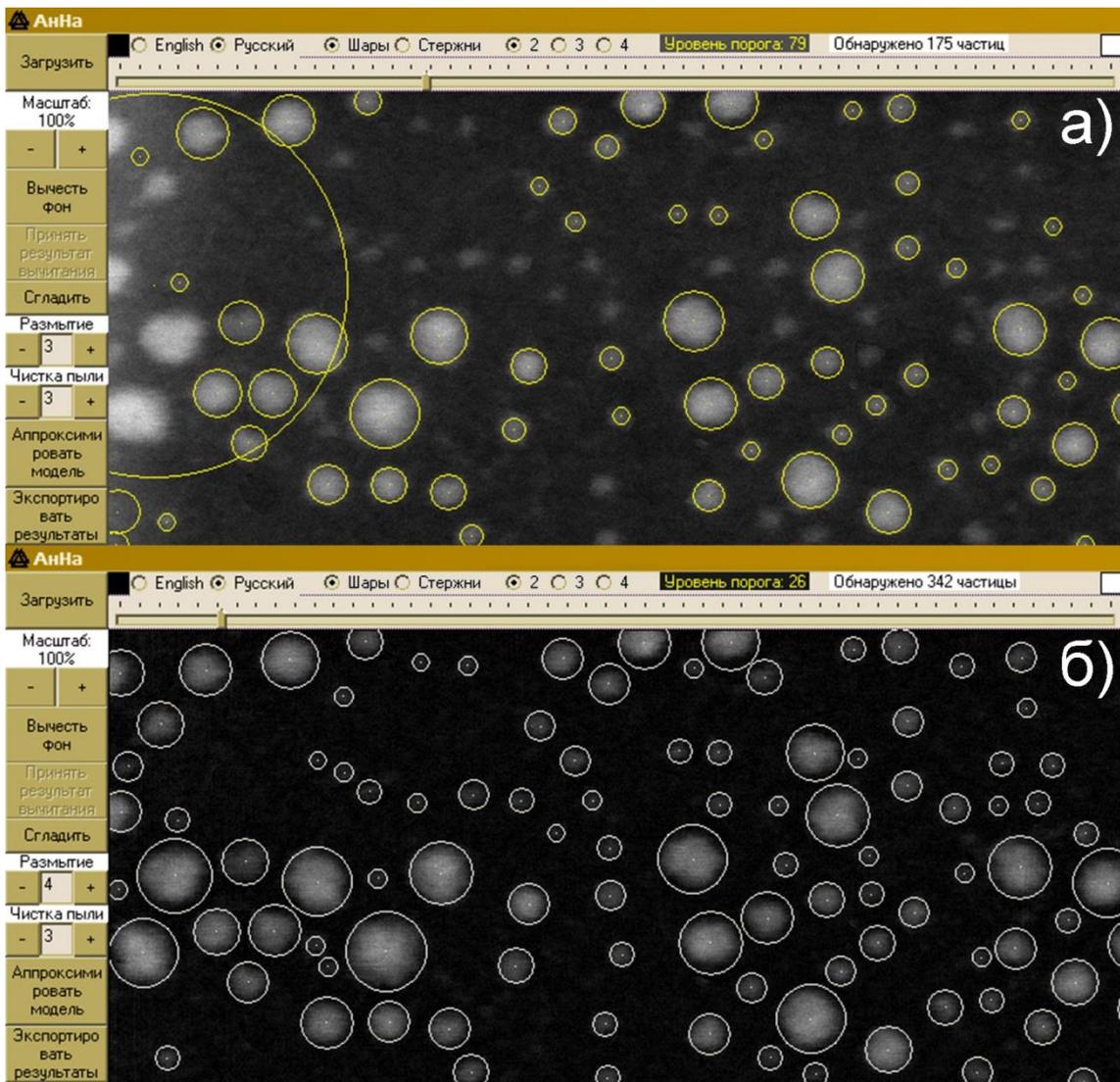


Рис. 21. Пример корректного распознавания изображений наночастиц после выравнивания фона. Оригинальная СПЭМ-микрофотография с регистрацией высокоугловых электронов с неравномерным фоном, на которой частицы определяются некорректно (а), микрофотография после процедуры вычитания фона с корректно распознанными изображениями наночастиц (б).

2.5. Тестирование программы АнНа и оценка точности измерений.

Оценка точности измерений в программе АнНа была произведена на моделированных изображениях двух типов. Первый тип – изображения, полученные с помощью простого кода в Matlab в рамках приближения, когда уровень серого в каждой точке изображения определяется только толщиной

наночастицы. Обработка подобных идеальных изображений позволяет определить исключительно вычислительную погрешность измерений.

Второй тип изображений – изображения наночастиц серебра различного размера, формы и в различных осях зоны, полученные моделированием в программе JEMS [132], которая учитывает вклад параметров микроскопа (ускоряющее напряжение, значение дефокуса, коэффициенты сферической и хроматической аберраций и т.д.). Обработка таких изображений позволяет оценить погрешность, обусловленную этим вкладом.

Тестирование программы AnNa на идеальных изображениях. Для создания идеальных изображений в среде Matlab был написан простой код, позволяющий создавать графические файлы с заданными значениями уровня серого каждого пикселя. В качестве зависимостей уровня серого g от толщины t было выбрано несколько монотонных и немонотонных функций (графики представлены на рис. 22):

$$g(t) = 1 - 2 \cdot 10^{-2}t \quad (2.1)$$

$$g(t) = 1 - 1 \cdot 10^{-2}t \quad (2.2)$$

$$g(t) = 1 - 4 \cdot 10^{-4}t^2 \quad (2.3)$$

$$g(t) = 1 - 4 \cdot 10^{-2}t + 4 \cdot 10^{-4}t^2 \quad (2.4)$$

$$g(t) = 1 - 8 \cdot 10^{-2}t + 16 \cdot 10^{-4}t^2 \quad (2.5)$$

$$g(t) = 1 - 5 \cdot (3) \cdot 10^{-1}t + 7 \cdot (1) \cdot 10^{-4}t^2 \quad (2.6)$$

Монотонные зависимости (2.1)–(2.4) соответствуют рассеянию электронов, которое может быть описано в рамках кинематического приближения, – волна электронов проходит через образец, не взаимодействуя с рассеянными волнами и монотонно теряя интенсивность с увеличением пути в объеме образца. Немонотонные зависимости (2.5), (2.6) соответствуют рассеянию, при котором волна электронов взаимодействует с рассеянными волнами и ее интенсивность может изменяться немонотонно при распространении в объеме образца.

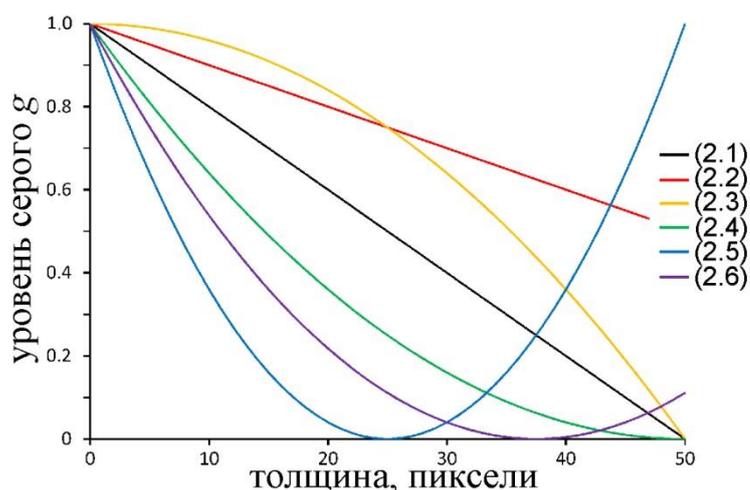


Рис. 22. Графики зависимостей уровня серого g от толщины t : (2.1) $1 - 2 \cdot 10^{-2}t$, (2.2) $1 - 1 \cdot 10^{-2}t$, (2.3) $1 - 4 \cdot 10^{-4}t^2$, (2.4) $1 - 4 \cdot 10^{-2}t + 4 \cdot 10^{-4}t^2$, (2.5) $1 - 8 \cdot 10^{-2}t + 16 \cdot 10^{-4}t^2$, (2.6) $1 - 5 \cdot (3) \cdot 10^{-1}t + 7 \cdot (1) \cdot 10^{-4}t^2$.

Функции (2.1)–(2.6) использовались для получения изображений шара диаметром 100 пикселей, которые приведены на рис. 23.

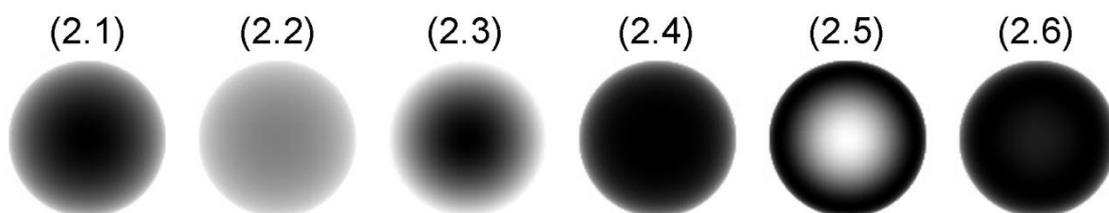


Рис. 23. Моделированные изображения шара с диаметром 100 пикселей с различными зависимостями уровня серого от толщины (см. рис. 22).

Измерения, проведенные с помощью программы АнНА показали, что максимальная ошибка не превышает 2% и снижается для немонотонных функций $g(t)$. Значения производных $dg(t)/dt$ немонотонных функций имеют большую область значений, что приводит к большей кривизне целевой функции вдоль оси диаметров в окрестности точки минимума. Таким образом, снижается вероятность, что в процессе итераций в пространстве аргументов точка, соответствующая текущей модели, будет «блуждать» вокруг точки минимума в области малых градиентов.

Тестирование программы AnNa на моделированных микрофотографиях с учетом приборных параметров и особенностей образцов.

Вклад приборных параметров в изображения учитывается в программе JEMS. Для выполнения моделирования изображений наночастиц в данной программе требуется структурный файл с координатами атомов наночастиц и подложки, на которой эти частицы расположены. Падение электронов предполагается вдоль оси z .

Для создания структурных TXT-файлов была написана простая программа. Данные TXT-файлов включали координаты атомов серебра, формирующих наночастицы различной формы, размеров и в различных ориентациях, а также координаты атомов углерода подложки.

Примитивная ячейка кристаллической решетки серебра может быть задана векторами трансляций:

$$\begin{cases} \mathbf{a}_1 = \frac{a}{2}(\mathbf{e}_y + \mathbf{e}_z) \\ \mathbf{a}_2 = \frac{a}{2}(\mathbf{e}_x + \mathbf{e}_z) \\ \mathbf{a}_3 = \frac{a}{2}(\mathbf{e}_x + \mathbf{e}_y) \end{cases}$$

Радиус-вектор каждого атома выражается как

$$\mathbf{r} = k\mathbf{a}_1 + l\mathbf{a}_2 + m\mathbf{a}_3 = \frac{a}{2}(l + m)\mathbf{e}_x + \frac{a}{2}(k + m)\mathbf{e}_y + \frac{a}{2}(k + l)\mathbf{e}_z, \quad (2.7)$$

где k, l, m – целые числа.

Алгоритм для записи координат атомов наночастиц в файл можно описать следующей блок-схемой (рис. 24). Программа совершает перебор целых чисел и вычисляет координаты атомов решетки по формуле (2.7), которые затем преобразуются умножением на матрицу поворота \hat{T}_{uvw} так, чтобы ось z была ориентирована вдоль произвольной оси зоны $[uvw]$ кристалла. Перед записью в файл выполняется проверка, оказывается ли текущий атом внутри желаемого объема кристалла.

Несложно показать, что, если координаты атомов были сгенерированы по формуле (2.7) и решетку требуется повернуть так, чтобы ось z была

ориентирована вдоль произвольной оси зоны [uvw], матрица поворота должна иметь вид:

$$\hat{T}_{[uvw]} = \begin{pmatrix} 1 - \frac{u^2}{u^2 + v^2} \left(1 - \frac{w}{\sqrt{u^2 + v^2 + w^2}}\right) & -\left(1 - \frac{w}{\sqrt{u^2 + v^2 + w^2}}\right) \frac{uv}{u^2 + v^2} & \frac{-u}{\sqrt{u^2 + v^2 + w^2}} \\ -\left(1 - \frac{w}{\sqrt{u^2 + v^2 + w^2}}\right) \frac{uv}{u^2 + v^2} & 1 - \frac{v^2}{u^2 + v^2} \left(1 - \frac{w}{\sqrt{u^2 + v^2 + w^2}}\right) & \frac{-v}{\sqrt{u^2 + v^2 + w^2}} \\ \frac{u}{\sqrt{u^2 + v^2 + w^2}} & \frac{v}{\sqrt{u^2 + v^2 + w^2}} & \frac{w}{\sqrt{u^2 + v^2 + w^2}} \end{pmatrix}$$

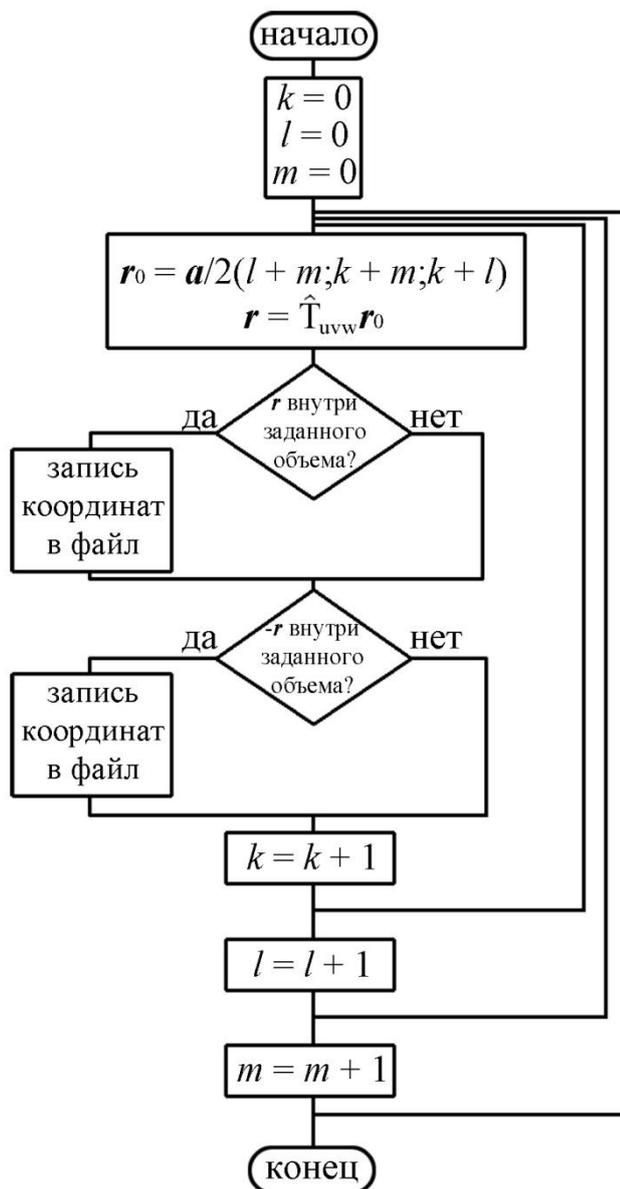


Рис. 24. Блок-схема алгоритма программы, выполняющей запись в файл координат атомов наночастиц серебра различных размеров, формы и в различных ориентациях.

Были смоделированы наночастицы, ориентированные таким образом, что ось z располагалась вдоль осей зоны $[001]$, $[120]$ и $[111]$. Соответствующие матрицы поворота имеют вид:

$$\hat{T}_{[001]} = \begin{pmatrix} 1 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & 1 \end{pmatrix}$$

$$\hat{T}_{[120]} = \begin{pmatrix} \frac{4}{5} & -\frac{2}{5} & -\frac{1}{\sqrt{5}} \\ -\frac{2}{5} & \frac{1}{5} & -\frac{2}{\sqrt{5}} \\ \frac{1}{\sqrt{5}} & \frac{2}{\sqrt{5}} & 0 \end{pmatrix}$$

$$\hat{T}_{[111]} = \begin{pmatrix} \frac{1}{2\sqrt{3}} + \frac{1}{2} & \frac{1}{2\sqrt{3}} - \frac{1}{2} & -\frac{1}{\sqrt{3}} \\ \frac{1}{2\sqrt{3}} - \frac{1}{2} & \frac{1}{2\sqrt{3}} + \frac{1}{2} & -\frac{1}{\sqrt{3}} \\ \frac{1}{\sqrt{3}} & \frac{1}{\sqrt{3}} & \frac{1}{\sqrt{3}} \end{pmatrix}$$

Текстовые файлы с координатами атомов «образцов» загружались в программу JEMS, где выполнялось моделирование ПЭМ-изображений. При этом были установлены следующие параметры виртуального электронного микроскопа: ускоряющее напряжение 300 кэВ, апертура объективной линзы 3.2 nm^{-1} , коэффициент сферической аберрации 0.7 мм, коэффициент хроматической аберрации 1.2 мм. Истинные границы наночастиц на ПЭМ-изображениях устанавливались по ВРЭМ-изображениям, которые также моделировались для каждого «образца».

В таблице 3 приведены относительные ошибки измерения размеров наночастиц серебра сферической формы различного диаметра и в различной ориентировке, возникающие при использовании полиномиальных моделей с различной старшей степенью.

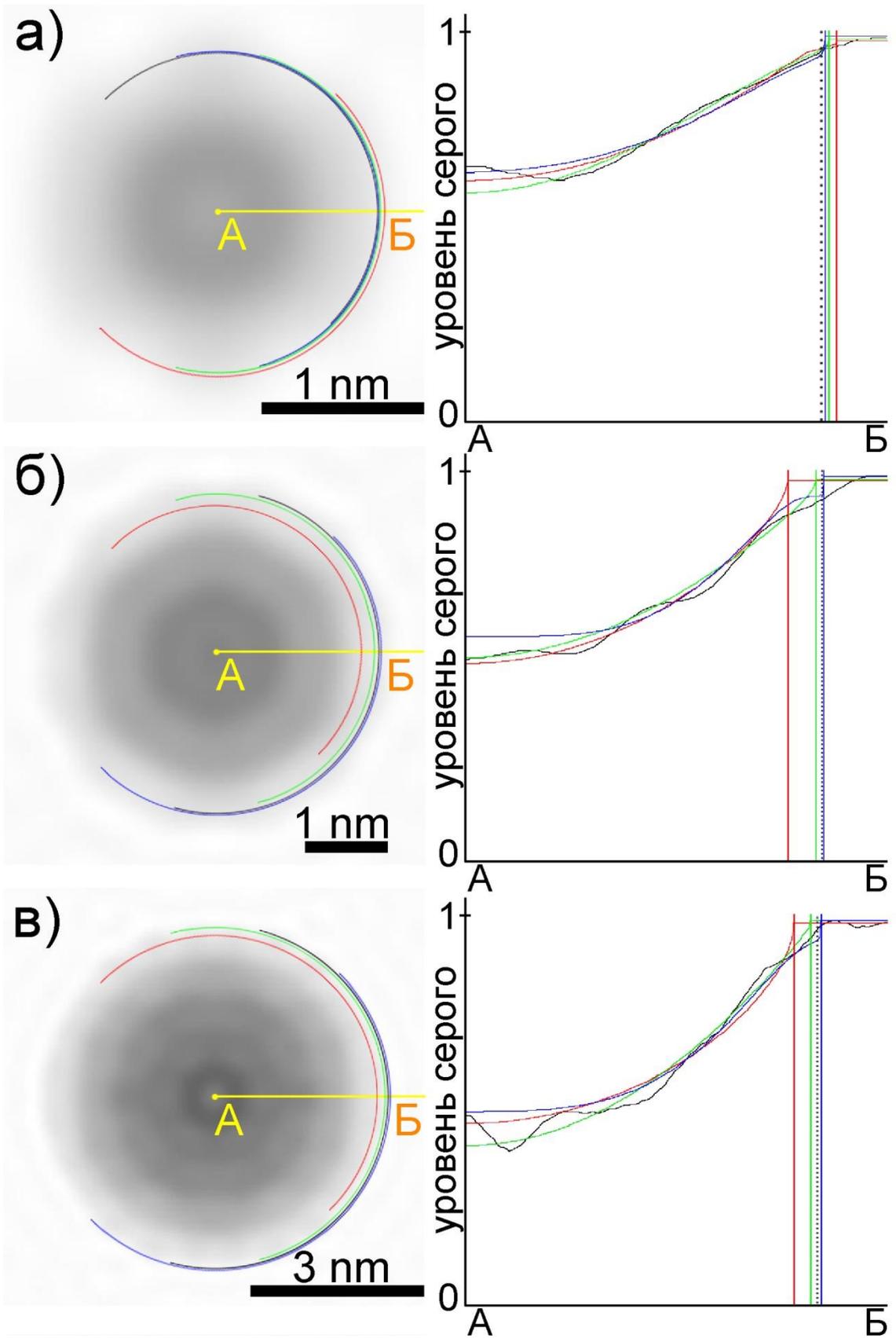
Таблица 3. Относительные ошибки измерения диаметра сферических наночастиц серебра, соответствующие полиномиальным моделям с различной старшей степенью.

d, нм	Ось зоны	Относительная ошибка измерения, соответствующая полиномиальной модели с различной старшей степенью, %		
		2	3	4
2	[001]	1	3	1
	[111]	5	2	1
	[120]	2	4	5
4	[001]	2	2	3
	[111]	9	2	1
	[120]	6	0	0
6	[001]	5	3	1
	[111]	7	1	1
	[120]	0	3	0
8	[001]	1	0	2
	[111]	10	0	0
	[120]	6	8	3
10	[001]	5	1	1
	[111]	4	0	1
	[120]	4	4	3
Средние значения, %		5	2	2

Относительная ошибка измерения зависит от метода минимизации целевой функции (в данном случае используется метод Нелдера-Мида [136]), т.е. для одного и того же изображения ошибка измерения может быть различной при выполнении аппроксимации, например, методом градиентного спуска и методом Ньютона. Объяснение полученного значения ошибки или его предсказание требует подробного исследования целевой функции и оценки применимости того или иного метода аппроксимации для данной целевой функции. Последняя зависит от текущего изображения. Таким образом, подобная задача не может быть решена в общем виде. Тем не

менее, как видно из таблиц 3, 4, 5 и 6, относительная ошибка измерения не превышает 10% и в среднем уменьшается с ростом старшей степени полиномиальной модели от 2 до 4. На рис. 25 приведены моделированные микрофотографии сферических наночастиц в ориентации [111], истинные границы наночастиц и границы в рамках моделей отмечены дугами различных цветов, справа соответствующим цветом показаны радиальные профили уровня серого изображений и аппроксимированных моделей, вертикальными линиями отмечены истинные границы наночастиц и границы в рамках моделей. Вариации уровня серого, наблюдаемые на моделированных ПЭМ-изображениях, представляют собой вклад фазового контраста.

Для проверки точности измерений в случае частиц несферической формы были получены «образцы» наночастиц серебра в форме эллипсоидов вращения с отношением полуосей 2:2:1. Частицы располагались так, что ось вращения эллипсоида совпадала с направлением падения электронов, падающий пучок электронов был направлен вдоль оси зоны [001]. На рис. 26 приведен пример построенного в JEMS 3D-изображения эллиптической частицы диаметром 4 нм (а) и соответствующее моделированное ПЭМ-изображение (б). Таблица 4 показывает относительные ошибки измерений диаметров эллиптических наночастиц серебра, которые оказываются меньше для полиномов с большей старшей степенью.



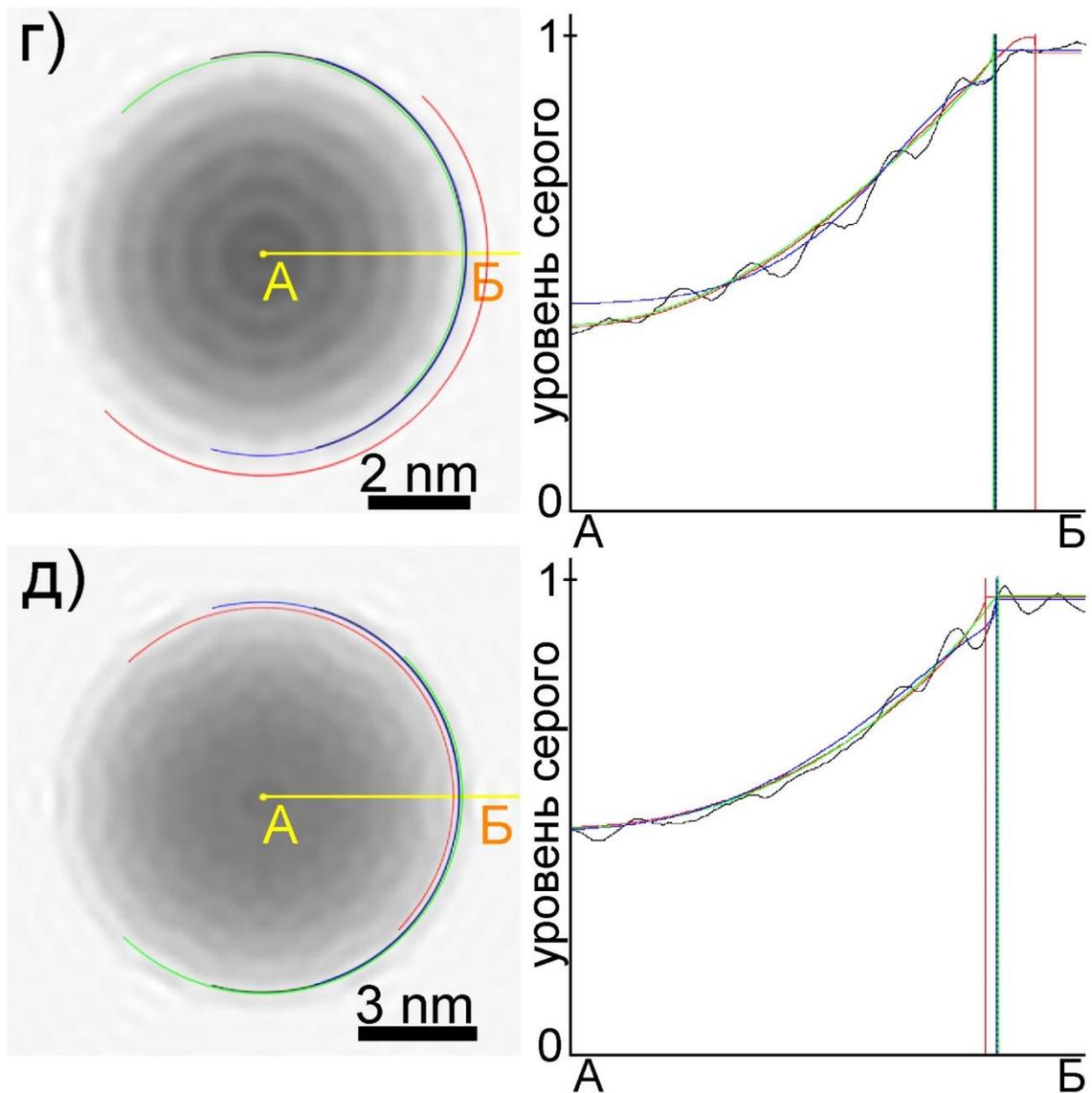


Рис. 25. Моделированные ПЭМ-изображения сферических наночастиц серебра в ориентации $[111]$ диаметром 2 (а), 4 (б), 6 (в), 8 (г) и 10 (д) и соответствующие радиальные распределения уровня серого изображения (—) и аппроксимированных полиномиальных моделей со старшей степенью 2 (—), 3 (—), 4 (—), истинные границы наночастиц и границы в рамках моделей аналогичными цветами показаны дугами на микрофотографиях и вертикальными линиями на распределениях.

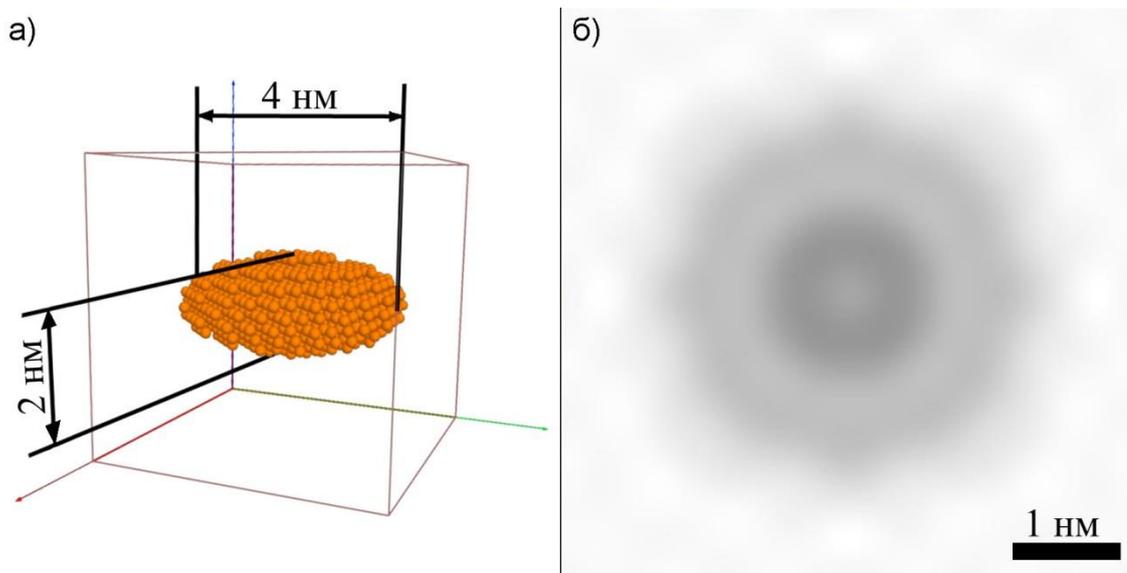


Рис. 26. 3D-изображение эллиптической наночастицы серебра диаметром 4 нм (а) и соответствующее моделированное ПЭМ-изображение (б).

Таблица 4. Относительные ошибки измерения диаметра эллиптических наночастиц серебра, соответствующие полиномиальным моделям с различной старшей степенью.

d , нм	Относительная ошибка измерения, соответствующая используемой полиномиальной модели с различной старшей степенью, %		
	2	3	4
2	8	4	2
4	10	5	3
6	4	2	2
8	1	1	2
10	3	1	0
Средние значения, %	5	3	2

Для исследования влияния аморфной углеродной подложки на точность измерений размеров были получены модели сферических наночастиц серебра разных диаметров, располагающихся на углеродной подложке и ориентированных вдоль оси зоны [001].

На рис. 27 приведено 3D-изображение (JEMS) сферической наночастицы диаметром 4 нм на углеродной подложке (а) и соответствующее моделированное ПЭМ-изображение (б). Таблица 5 содержит относительные ошибки измерений в случае сферических наночастиц серебра на углеродной подложке, которые также оказываются меньше для полиномов с большей старшей степенью.

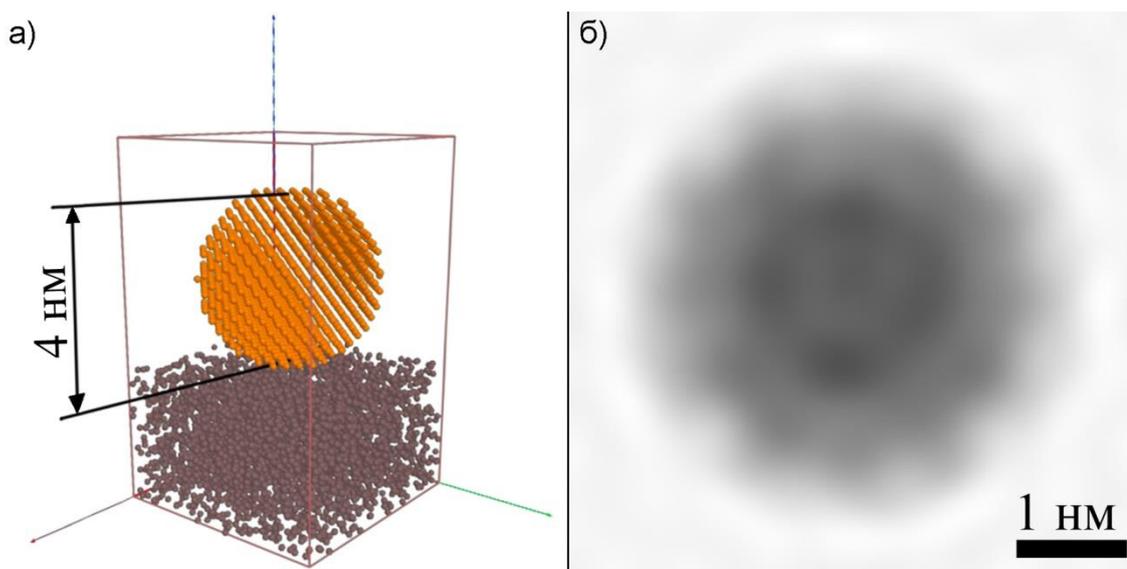


Рис. 27. Визуализации сферической наночастицы серебра на углеродной подложке диаметром 4 нм (а) и соответствующий ПЭМ-снимок (б).

Таблица 5. Относительные ошибки измерения диаметра сферических наночастиц серебра на углеродной подложке, соответствующие полиномиальным моделям с различной старшей степенью.

d , нм	Относительная ошибка измерения, соответствующая используемой полиномиальной модели с различной старшей степенью, %		
	2	3	4
2	9	1	3
4	0	2	2
6	2	2	1
8	5	3	2
10	2	1	1
Средние значения, %	4	2	2

Для тестирования программы на изображениях, где проекция наночастицы отличается от круговой, были смоделированы наночастицы серебра в форме цилиндров с отношением длина:диаметр = 2:1. Цилиндры располагались перпендикулярно направлению падения электронов с ориентацией кристаллической решетки в оси зоны [001]. На рис. 28 приведено 3D-изображение (JEMS) цилиндрической наночастицы длиной 4 нм (а) и соответствующее моделированное ПЭМ-изображение (б). В таблице 6 приведены относительные ошибки измерений длин и диаметров цилиндрических частиц. Данные значения демонстрируют, что повышение старшей степени полинома незначительно снижает относительную ошибку измерения диаметра частицы.

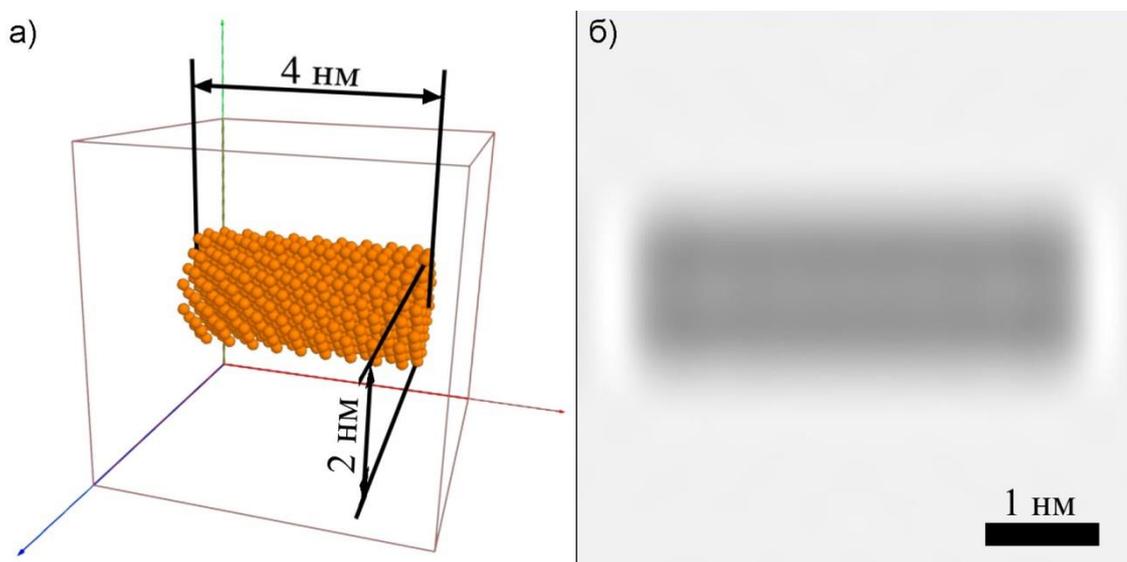


Рис. 28. Визуализации цилиндрической наночастицы серебра длиной 4 нм (а) и соответствующий ПЭМ-снимок (б).

Таблица 6. Относительные ошибки измерения длины и диаметра цилиндрических наночастиц серебра, соответствующие полиномиальным моделям с различной старшей степенью.

L, нм	Относительная ошибка измерения, соответствующая используемой полиномиальной модели с различной старшей степенью, %					
	2		3		4	
	L, %	d, %	L, %	d, %	L, %	d, %
2	3	3	3	2	2	4
4	1	4	1	4	1	4
6	1	1	0	1	1	0
8	1	4	0	3	1	2
10	1	5	1	5	1	6
Средние значения, %	1	4	1	3	1	3

2.6. Сравнительный анализ результатов измерений, проведенных с помощью программы АнНа и другими методами.

Для тестирования программы АнНа были измерены размеры и построены распределения по размерам наночастиц Ag по их микрофотографиям в режимах ПЭМ, СПЭМ в светлом поле и СПЭМ с регистрацией высокоугловых рассеянных электронов (СПЭМ в темном поле). Полученные результаты были сопоставлены с результатами измерений вручную и полученными с помощью доступных программ ImageJ и Pebbles.

Для выявления возможных различий результатов статистического анализа при обработке микрофотографий, полученных в разных режимах электронной микроскопии, с помощью программы АнНа были обработаны микрофотографии одного и того же образца (наночастиц Ag в пленке ДМАЭМ), полученные в режимах СПЭМ в светлом поле и СПЭМ с регистрацией обратно рассеянных электронов (рис. 29). Полученные распределения по размерам приведены на рис. 29в.

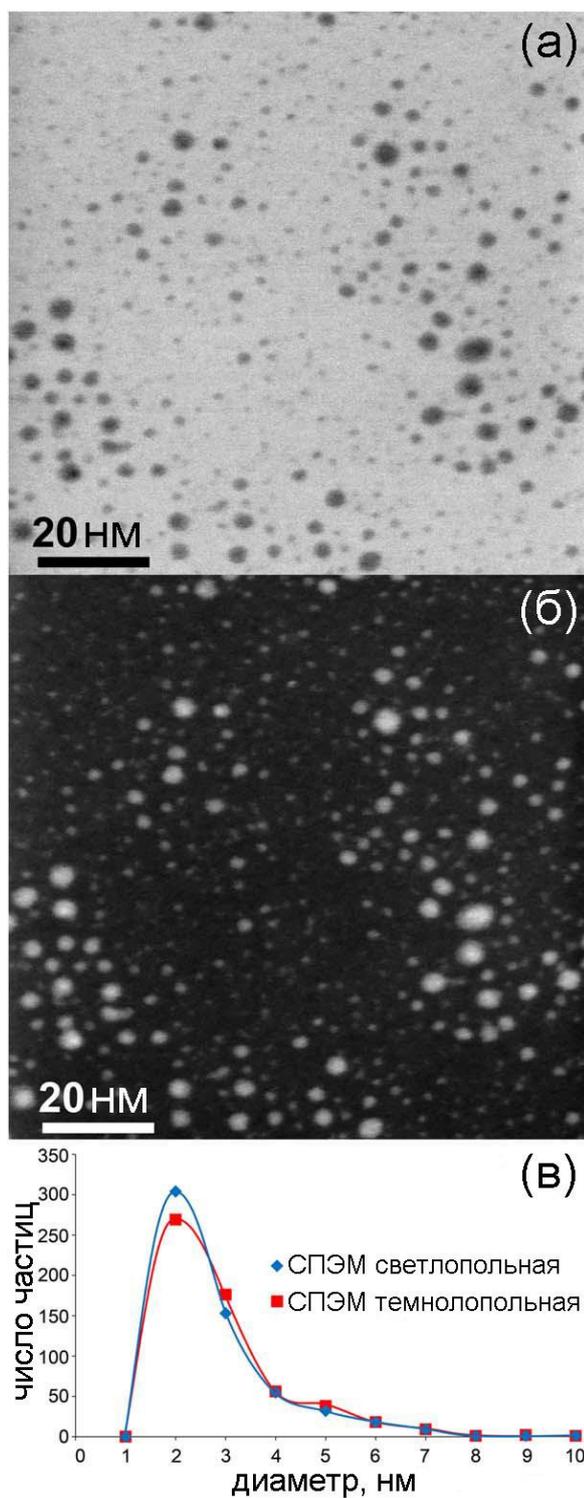


Рис. 29. СПЭМ-микрофотография наночастиц Ag в светлом поле – (а), СПЭМ-микрофотография того же участка образца в темном поле – (б), распределения по размерам наночастиц Ag, полученные в программе AnNa обработкой \blacklozenge – светлопольного изображения, \blacksquare – темнопольного изображения.

На микрофотографиях обоих типов программой было обнаружено приблизительно одинаковое число частиц: на светлопольных СПЭМ микрофотографиях 574, на темнопольных – 570 частиц. На обоих распределениях модовый диаметр оказался на уровне 2 нм. Однако, как можно видеть из графиков (рис. 29в), в случае светлопольной СПЭМ-микроскопии размеры частиц оказываются несколько меньше. Это может быть объяснено тем, что изображение в данном случае получается с использованием прошедшего пучка электронов, большой вклад в рассеяние которого вносит полимерная пленка и подложка. Вклад в рассеяние от приграничных областей частиц, где их толщина мала, может оказаться пренебрежимо малым по сравнению с вкладом в рассеяние от полимерной пленки и подложки, что может привести к визуальному уменьшению площади изображений наночастиц. В темнопольной СПЭМ-микроскопии вклад подложки и полимерной пленки в рассеяние электронов на большие углы оказывается пренебрежимо малым по сравнению с вкладом в рассеяние наночастиц по причине большего значения их зарядового числа Z . Таким образом, в данном режиме не происходит уменьшения площади изображения наночастицы по сравнению с площадью ее проекции.

Результаты статистического анализа светлопольных и темнопольных изображений и их негативов, которые программа может формально обрабатывать как соответственно темнопольные и светлопольные изображения, совпадают.

На рис. 30 и 31 сопоставлены результаты, полученные при обработке изображений различных образцов измерениями вручную, с помощью программы АнНа, ImageJ и Pebbles. Наночастицы Ag располагались в полимерной пленке гомополимера ДМАЭМ (рис. 30а) и в пленке сополимера МАГ-ДМАЭМ с мольным соотношением мономеров [МАГ]:[ДМАЭМ] = 53%:47% (рис. 31а). Распределения частиц по размерам приведены на рис. 30б и рис. 31б.

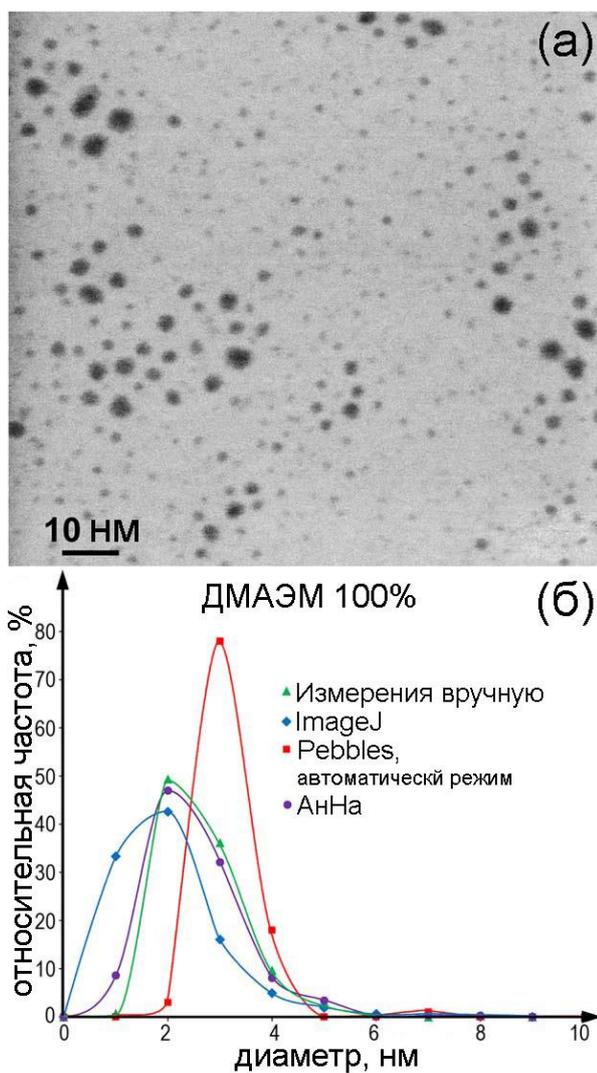


Рис. 30. Светлопольное СПЭМ изображение наночастиц Ag, полученных с использованием гомополимера ДМАЭМ (а), соответствующие распределения по размерам наночастиц Ag, полученные с помощью измерений вручную – ▲, ImageJ – ◆, Pebbles (автоматический режим) – ■, AnNa – ● (б).

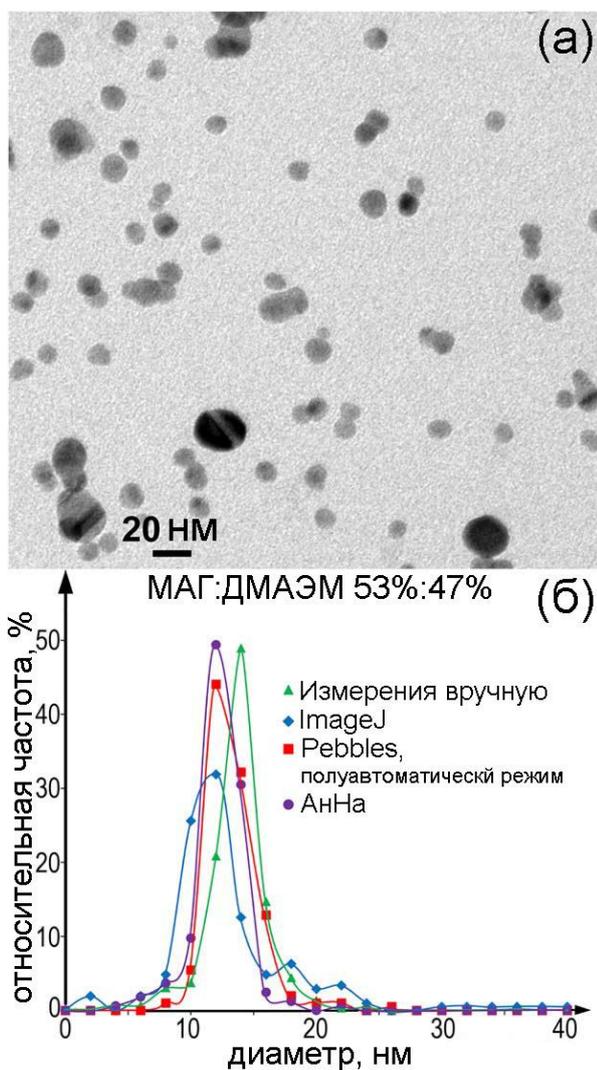


Рис. 31. Светлопольное ПЭМ изображение наночастиц Ag, полученных с использованием сополимера МАГ-DMAЭМ с мольным соотношением мономеров $[МАГ]:[DMAЭМ] = 53\%:47\%$ (а), соответствующие распределения по размерам наночастиц Ag, полученные с помощью измерений вручную – ▲, ImageJ – ◆, Pebbles (полуавтоматический режим) – ■, АнНа – ● (б).

Было установлено (см. п. 3.2), что наночастицы серебра, синтезированные при помощи гомополимера DMAЭМ, имеют узкое распределение по размерам с модовым диаметром около 2 нм, а максимальный размер частицы не превышает 10 нм. Наночастицы, синтезированные при помощи сополимера МАГ-DMAЭМ с мольным соотношением $[МАГ]:[DMAЭМ] = 53\%:47\%$, напротив, имеют широкое распределение с модовым диаметром около 13 нм и хвостом распределения,

соответствующим большим частицам. Использование таких образцов для сравнительного анализа позволяет оценить надежность получаемых программой АнНа результатов как в случае маленьких сопоставимых по размерам наночастиц, так и в случае наночастиц с большой разницей в размерах.

В случае светлопольных СПЭМ-изображений (рис. 30а) наночастиц Ag в пленке ДМАЭМ в программе АнНа производилась процедура вычитания фона. Светлопольные ПЭМ-изображения наночастиц в пленке сополимера МАГ-ДМАЭМ имели изначально равномерный фон (рис. 31а).

Программа Pebbles оказалась неспособной произвести автоматическое распознавание изображений наночастиц в пленке сополимера МАГ-ДМАЭМ. Обработка данных изображений с помощью Pebbles производилась в полуавтоматическом режиме, при котором пользователь вручную указывает программе местоположение наночастицы и приблизительно оценивает ее диаметр.

В случае наночастиц в пленке ДМАЭМ ImageJ переоценил долю нанометровых частиц, что объясняется склонностью этой программы идентифицировать проявления интерференционной картины от углеродной подложки и полимерной пленки как изображения маленьких наночастиц. Программа Pebbles зафиксировала наименьшее общее число частиц на всем интервале диаметров. Значения модовых диаметров и формы распределений, полученные при помощи измерений вручную и АнНа, хорошо совпадают. Модовый диаметр распределения, полученного при помощи ImageJ, также оказался на уровне 2 нм. Относительно других результатов программа Pebbles переоценила модовый диаметр, составивший значение 3 нм (рис. 30б).

Для образца, приготовленного с использованием сополимера МАГ-ДМАЭМ, вручную было зафиксировано наибольшее общее число наночастиц на всем интервале диаметров. Pebbles зафиксировал наименьшее число частиц до 10 нм. ImageJ, напротив, по указанной выше причине

переоценил количество нанометровых частиц, что привело к образованию ложного пика в окрестности 2 нм (рис. 31б). Модовые диаметры всех распределений, полученных с помощью программ, равны 12 нм. Модовый диаметр распределения, полученного измерениями вручную, оказался переоцененным вплоть до 14 нм. Распределения по размерам, соответствующие Pebbles и AnNa, хорошо совпадают по форме, однако измерения с помощью Pebbles производились, как было указано выше, в полуавтоматическом режиме и не превосходят по скорости обычных измерений вручную. Получение статистики в тысячу измерений при измерениях вручную и при использовании Pebbles заняли несколько часов. При использовании AnNa и ImageJ аналогичная по объему статистика была получена в течение нескольких минут.

2.7. Выводы к главе 2.

Была разработана и написана программа Анализатор Наночастиц (AnNa) для автоматизированного статистического анализа наночастиц по их (С)ПЭМ микрофотографиям. Разработка была мотивирована необходимостью производить статистический анализ наночастиц Ag в рамках (С)ПЭМ для их биомедицинского применения. Используемые в процессе синтеза наночастиц органические реагенты приводят к тому, что соответствующие микрофотографии обладают выраженными шумами и их фон может быть неравномерен. Это устанавливает дополнительные требования к программному обеспечению, используемому для статистического анализа наночастиц.

Работа программы включает в себя две последовательные процедуры:

- распознавание изображений наночастиц с помощью пороговой обработки изображения, выполняемой вручную и сопровождаемой при надобности рядом вспомогательных процедур для подавления шума и выравнивания фона
- измерение диаметров обнаруженных наночастиц, оптимизированная для работы с изображениями с высоким уровнем шума.

Измерение размеров наночастицы выполняется путем аппроксимации модели распределения уровня серого к реальному изображению наночастицы. В рамках модели уровень серого предполагается зависящим только от толщины наночастицы и выражается полиномом по степеням толщины: $g(t) = g_0 + g_1 t(x, y) + g_2 t^2(x, y) + g_3 t^3(x, y) + \dots$. Толщина частицы $t(x, y)$ вычисляется в каждой точке (x, y) , исходя из предположения о форме частицы.

Предварительная обработка изображений позволяет повысить корректность распознавания изображений частиц пороговой обработкой, однако измерения размеров частиц производятся с использованием неискаженного предварительной обработкой оригинального изображения, которое программа хранит в памяти после загрузки.

Тестирование программы на моделированных микрофотографиях показало, что относительная ошибка измерения не превосходит 10% и снижается с увеличением старшей степени полинома. Ошибка оказывается выше, если уровень серого незначительно меняется на площади изображения наночастицы. При этом вычислительная погрешность не превосходит 3%.

Обработка в программе АнНа темнопольных и светлопольных микрофотографий одного и того же участка образца продемонстрировала хорошее совпадение результатов. Сравнительный анализ результатов статистического анализа образцов с широким и узким распределением частиц по размерам, проведенного с помощью доступных программ, измерений вручную и программы АнНа, продемонстрировал хорошее совпадение результатов измерений вручную и программы АнНа. При этом последние были получены в течение нескольких минут.

ГЛАВА 3. РАЗРАБОТКА МОДЕЛИ ОБРАЗОВАНИЯ И СТАБИЛИЗАЦИИ НАНОЧАСТИЦ ИЗ ИОНОВ СЕРЕБРА, ВОССТАНОВЛЕННЫХ С ПОМОЩЬЮ ПОЛИМЕРОВ.

В данной главе представлены результаты статистического анализа размеров наночастиц серебра, проведенного с помощью программы AnNa. Синтез наночастиц проводился с использованием гомополимеров МАГ и ДМАЭМ, их физических смесей и сополимеров с различными мольными соотношениями [МАГ]:[ДМАЭМ]. На основе результатов статистического анализа было установлено влияние структуры полимеров на размер наночастиц и их распределения по размерам, была предложена модель образования наночастиц серебра с учетом количества восстанавливающих центров в мономерах МАГ и ДМАЭМ.

3.1. Гомополимеры МАГ и ДМАЭМ и сополимеры МАГ-ДМАЭМ – восстановители и стабилизаторы наночастиц серебра в растворах.

2-(диметиламино)этил метакрилат (ДМАЭМ) является хорошим восстановителем ионов металлов и стабилизатором наночастиц [138–144]. Данный полимер обладает бактерицидными свойствами и биосовместимостью [145,146]. Для снижения токсичности ДМАЭМ и дальнейшего повышения его биосовместимости обычно применяются такие методики, как снижение молекулярной массы полимера или введение экранирующих компонентов в процесс полимеризации. Поэтому практический интерес для задач синтеза наночастиц и создания эффективных антисептических материалов на их основе представляют сополимеры ДМАЭМ, в частности, с 2-деокси-2-метакриламидо-*D*-глюкозой (МАГ) [146].

Все необходимые для синтеза (со)полимеров и наночастиц серебра реагенты – 2-(диметиламино)этил метакрилат (ДМАЭМ), (+)-*D*-глюкозамин гидрохлорид, метакрилоил хлорид, триэтиламин, азобисизобутиронитрил, диметилформамид, нитрат серебра – были приобретены в фирме Aldrich (Германия).

2-деокси-2-метакриламидо-*D*-глюкоза (МАГ) была синтезирована как описано в работе [146]. (+)-*D*-глюкозамин гидрохлорид был растворен в щелочи, затем был добавлен триэтиламин, служащий для устранения фиксации соляной кислоты. Раствор был охлажден до -5°C . Во время интенсивного помешивания одновременно в течение часа в раствор добавлялись метакрилоил хлорид и триэтиламин при постепенном повышении температуры. Помешивание продолжалось последующие три часа при температуре от 5 до 10°C и еще три часа при комнатной температуре. Раствор был оставлен на 12 часов, после чего был выпарен при пониженном давлении. Оставшийся продукт – мономеры МАГ – был три раза промыт хлороформом, высушен в вакууме и рекристаллизован в этаноле. Мономеры МАГ были растворены в диметилформамиде, затем в раствор был добавлен азобисизобутиронитрил, после чего смесь была прочищена азотом. Полимеризация была произведена в герметичных ампулах при 60°C в течение 24 ч. Полимеры были осаждены в диэтиловом эфире, профильтрованы и высушены в вакууме.

ДМАЭМ перед радикальной сополимеризацией с МАГ был очищен при пониженном давлении. Радикальная сополимеризация МАГ и ДМАЭМ производилась в атмосфере аргона в герметичных ампулах при 60°C азобисизобутиронитрила в качестве инициатора. Отсутствие низкомолекулярных примесей в образцах подтверждалось тонкослойной хроматографией. Состав сополимеров МАГ-ДМАЭМ устанавливался с помощью протонного магнитного резонанса (Bruker Avance 400 spectrometer, Германия), а также с помощью потенциометрического титрования звеньев ДМАЭМ раствором соляной кислоты (pH-410 pH-meter, Аквилон, Россия). Оба метода давали одинаковое значение доли ДМАЭМ в соответствующих сополимерах. Молекулярные массы полимеров определялись вискозиметрически [147].

Наночастицы серебра были синтезированы путем смешения водных растворов полимеров и нитрата серебра при комнатной температуре,

атмосферном давлении и естественном освещении. В процессе восстановления полимерами ионов Ag^+ наблюдалось окрашивание раствора в красно-коричневый цвет, при этом в спектре плазмонного резонанса возникала полоса на уровне 400–425 нм, свойственная спектру поглощения наночастиц серебра. Наблюдение за полосой поглощения оптического излучения коллоидным раствором производилось с помощью спектрометра Spexord M40 (Карл Цейс, Йена). Концентрация полимеров составляла 10–30 мг/мл, концентрация нитрата серебра подбиралась так, чтобы соотношение [мономер]: $[\text{AgNO}_3]$ равнялось 7–9 [140]. Окончание процесса синтеза наночастиц, т.е. отсутствие в реакционной смеси ионов Ag^+ , подтверждалось отсутствием мутности при добавлении капли раствора к децинормальному раствору соляной кислоты. Полученные коллоидные растворы хранились при комнатной температуре в течение суток, затем были подвергнуты диализу и лиофильной сушке. Сухие образцы сохраняли стабильность и после повторного растворения проявляли первоначальные свойства.

В процессе синтеза наночастиц серебра индукционные периоды составили один час для ДМАЭМ, 12 часов для МАГ и отсутствовали для сополимеров МАГ-ДМАЭМ; длительности реакции составляли 12 часов для ДМАЭМ, 24 часа для МАГ и 3 часа для всех сополимеров МАГ-ДМАЭМ (табл. 7). Таким образом, временные характеристики процесса синтеза в настоящей работе совпали с соответствующими величинами из [140].

Таблица 7. Состав использованных полимеров и соответствующие индукционные периоды и длительности реакции.

Полимер	Мольная доля ДМАЭМ α , %	Индукционный период, ч	Время реакции, ч
Поли-ДМАЭМ	100	1	12
МАГ-ДМАЭМ	75.0	0	3
МАГ-ДМАЭМ	70.7	0	3

МАГ-ДМАЭМ	47.0	0	3
МАГ-ДМАЭМ	18.0	0	3
Поли-МАГ	0	12	24

Структурные формулы мономеров ДМАЭМ и МАГ представлены на рис. 32. Молекулярная масса мономера ДМАЭМ составляет 157 Да, МАГ – 247 Да. В мономере ДМАЭМ в качестве восстановителя ионов серебра может выступать атом азота в третичном амине, в мономере МАГ – несколько групп: карбонильная группа [148] и спиртовые ОН-группы, которые могут быть окислены до карбоксильных групп или кетонов [149]. Также возможен сопровождающийся отдачей электрона разрыв С-С-связи в кольце с образованием альдегид-несущих полимеров [146]. Таким образом, без разрушения кольца мономер МАГ может восстановить до четырех ионов Ag^+ .

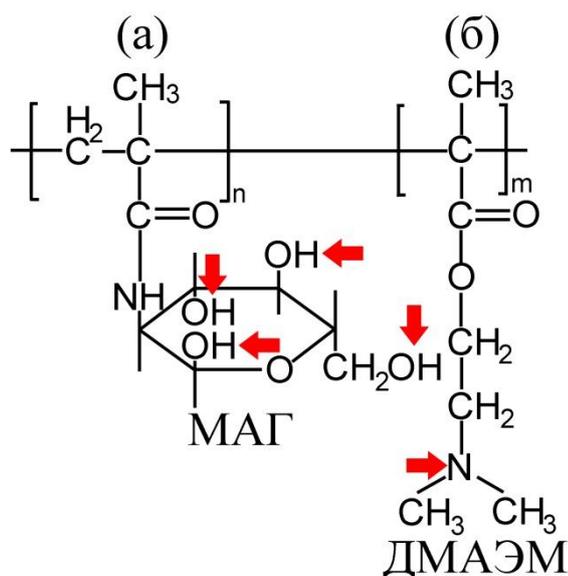


Рис. 32. Структурные формулы мономеров МАГ (а) и ДМАЭМ (б) с возможными центрами восстановления (указаны стрелками).

С учетом молекулярных масс мономеров и числа ионов, которые каждый мономер может восстановить, можно рассчитать длину цепей использованных полимеров, а также среднее число $\langle i \rangle$ ионов Ag^+ , которые могут быть восстановлены одним мономером. В таблице 8 приведены мольные соотношения [МАГ]:[ДМАЭМ] и молекулярные массы

использованных гомо- и сополимеров, а также рассчитанные значения числа восстанавливающих центров $\langle i \rangle$ и длины полимеров.

Таблица 8. Состав сополимеров, молекулярная масса, длина макромолекулы и среднее число восстанавливающих центров в мономере $\langle i \rangle$.

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

В работах [138] и [139] указывается, что аминогруппы полимеров способны координировать ионы металлов, создавая благоприятное для их восстановления микроокружение, а в работе [140] предполагается, что более высокие скорости реакции в случае сополимеров МАГ-ДМАЭМ обусловлены не только совместным восстановлением ионов Ag^+ звеньями МАГ и ДМАЭМ, но и оптимальными условиями протекания процесса восстановления, обеспеченными распределением звеньев по цепи сополимера. Этим могут быть объяснены более короткие времена реакции восстановления ионов серебра и отсутствие индукционных периодов в случае сополимеров, что делает сополимеры МАГ-ДМАЭМ еще более привлекательными с практической точки зрения.

3.2. Влияние структуры полимеров на размер наночастиц.

ПЭМ-, ВРЭМ- и СПЭМ-снимки наночастиц серебра показали, что нанометровые частицы преимущественно являются монокристаллическими сферами. Частицы больших размеров (> 15 нм) могут принимать эллиптическую форму. В некоторых частицах проявляется двойникование.

Как правило, для оценки различных методов синтеза, эффективности реагентов, биологической и химической активности наночастиц серебра и оценки экономической рентабельности их производства анализируются только распределения наночастиц по размерам. Однако в настоящей работе для оценки доли больших малоэффективных наночастиц были построены не только распределения по размерам числа частиц, но и распределения по размерам их объема.

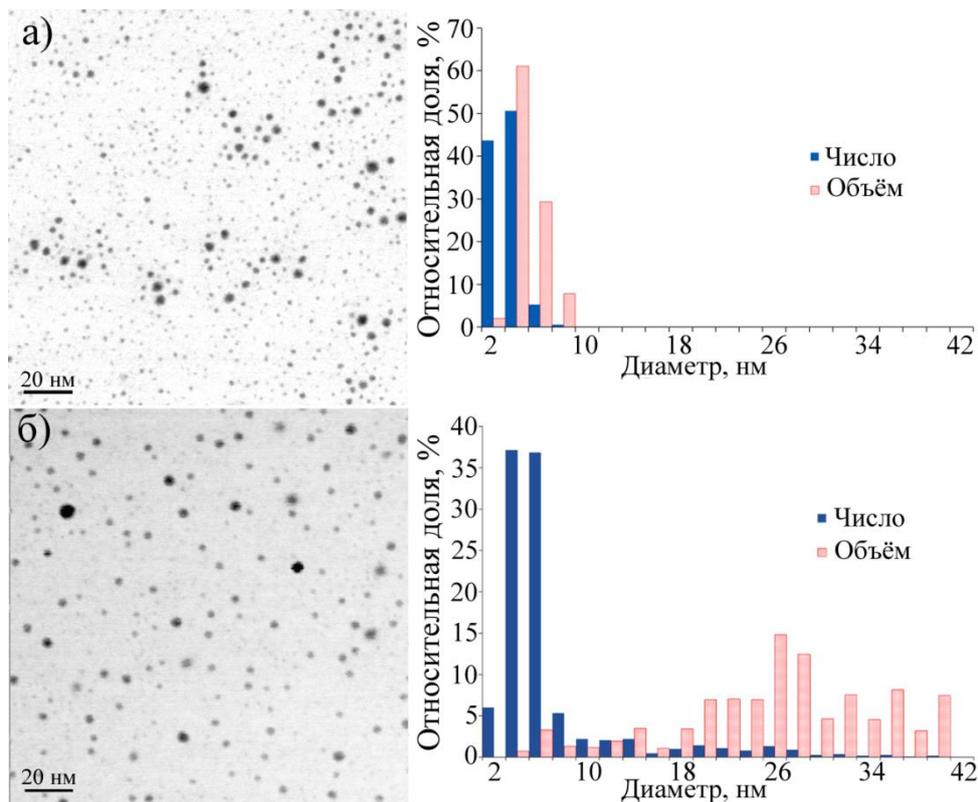


Рис. 33. Светлопольные СПЭМ-снимки наночастиц серебра, синтезированных при помощи гомополимера ДМАЭМ (а) и МАГ (б), и соответствующие распределения по размерам числа и полного объема наночастиц.

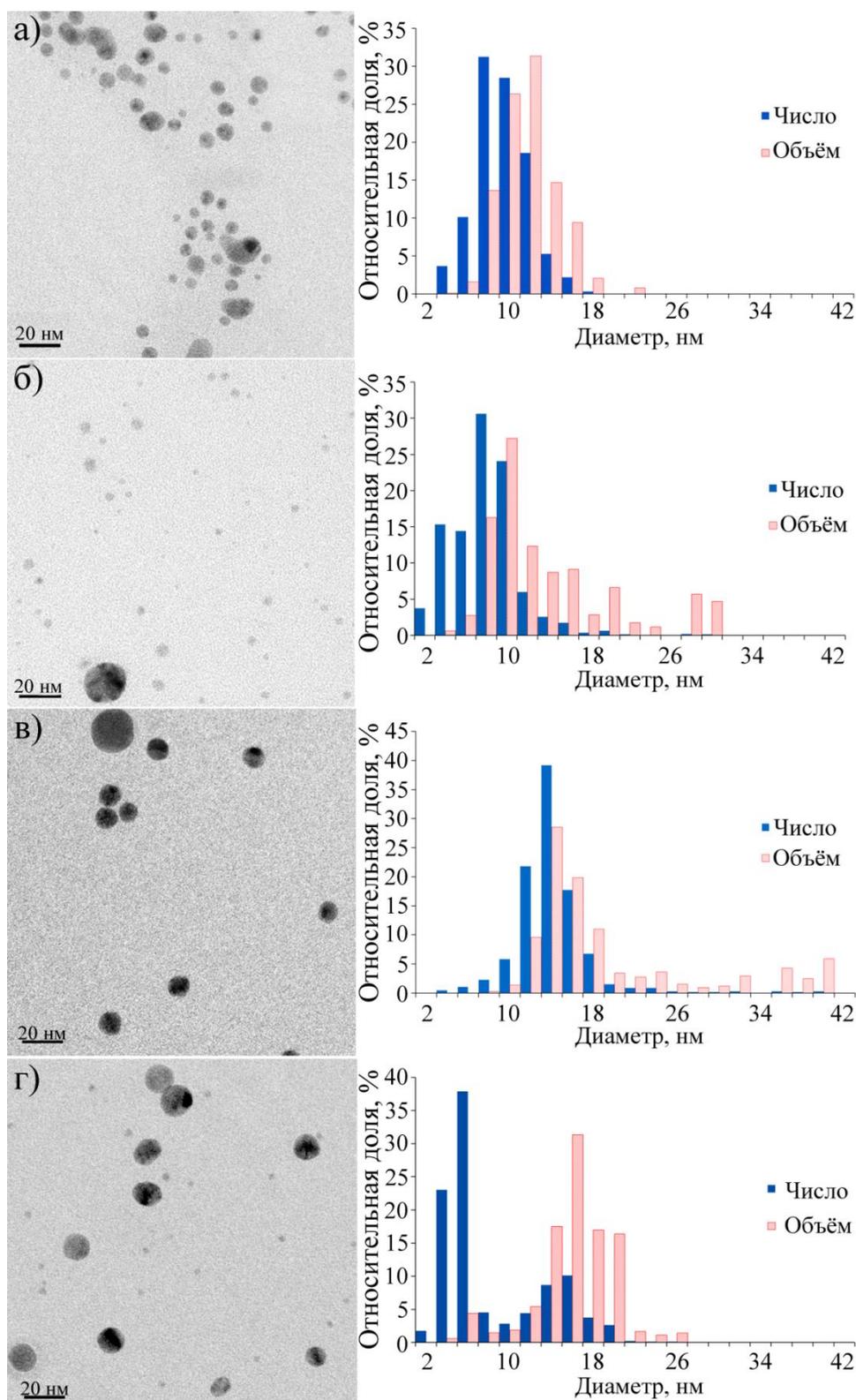


Рис. 34. Светлопольные ПЭМ-снимки наночастиц серебра, синтезированных при помощи сополимеров МАГ-ДМАЭМ в различных мольных соотношениях, и соответствующие распределения по размерам числа и полного объема наночастиц. (а) $\alpha = 75.0\%$, (б) $\alpha = 70.7\%$, (в) $\alpha = 47.0\%$, (г) $\alpha = 18.0\%$.

Для всех образцов с помощью программы AnNa было получено порядка 1000 измерений диаметров изображений наночастиц. С использованием набранной статистики были получены как распределения по размерам числа частиц, так и распределения по размерам полного объема серебра (рис. 33 и рис. 34). Были определены такие важные для оценки химической активности наночастиц и экономических перспектив методов синтеза величины, как модовые и средние диаметры распределений, дисперсии распределений, объемные доли наночастиц менее 10 нм и объемные доли больших наночастиц, соответствующих хвостам распределений (табл. 9).

Таблица 9. Параметры распределений по размерам частиц, синтезированных с использованием гомо- и сополимеров на основе МАГ и ДМАЭМ, 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	Бимодальное	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 модовым диаметром распределения, равным 2.3 нм, и малым значением дисперсии (0.9 нм) были получены при использовании гомополимера ДМАЭМ (рис. 33а). Все наблюдаемые в данном образце частицы не превышают 10 нм. При использовании гомополимера МАГ, напротив, были получены наночастицы серебра с

широким распределением и большим количеством наночастиц >10 нм (рис. 33б).

Оказалось, что сополимеризация ДМАЭМ и МАГ приводит к увеличению как среднего и модового диаметров наночастиц, так и ширины распределений частиц по размерам. В распределениях полного объема серебра появляются выраженные хвосты (рис. 34). Наибольший средний диаметр частиц зафиксирован в образце, соответствующем сополимеру МАГ-ДМАЭМ с $\alpha = 47.0\%$. В данном образце средний диаметр наночастиц оказался в 4 раза больше, чем у частиц, синтезированных с использованием ДМАЭМ. Единственное бимодальное распределение наблюдалось у частиц, синтезированных с использованием сополимера МАГ-ДМАЭМ с $\alpha = 18.0\%$. Большее значение модового диаметра составляет 16 нм, что является наибольшим значением для всех образцов, меньший модовый диаметр располагается на уровне 6 нм.

Объемные доли больших частиц, соответствующих хвостам распределения, увеличивались с уменьшением мольной доли ДМАЭМ до 70.7%, достигая максимума в 33%.

Если предположить, что каталитическая и антимикробная активность наночастицы зависит только от ее площади поверхности, помимо приведенных в табл. 9 параметров распределений, важной для характеристики коллоидов величиной будет удельная площадь поверхности наночастиц: $S_{уд} = \sum_{\text{част}} \pi d^2 / \sum_{\text{част}} \rho \frac{\pi}{6} d^3$, где сумма берется по всем измеренным частицам, ρ – плотность серебра, d – диаметр текущей частицы. В частности, данное предположение означает, что кривизна поверхности наночастицы, ее масса и индекс атомных плоскостей на ее поверхности не влияют на ее активность. Если допустить, что активность наночастицы исчезает при превышении некоторого порогового диаметра, интерес будет представлять не только полная удельная площадь поверхности, но и удельная площадь поверхности частиц, не превышающих некоторого порогового

диаметра d_0 : $s_{уд}(d_0) = \sum_{\text{част}<d_0} \pi d^2 / \sum_{\text{част}} \rho \frac{\pi}{6} d^3$, где сумма в числителе теперь берется только по частицам, размер которых меньше d_0 . Графики зависимости удельной площади поверхности частиц меньше некоторого диаметра от этого диаметра для всех образцов приведены на рис. 35. Значения пределов, к которым стремятся данные зависимости, – полная удельная площадь поверхности частиц.

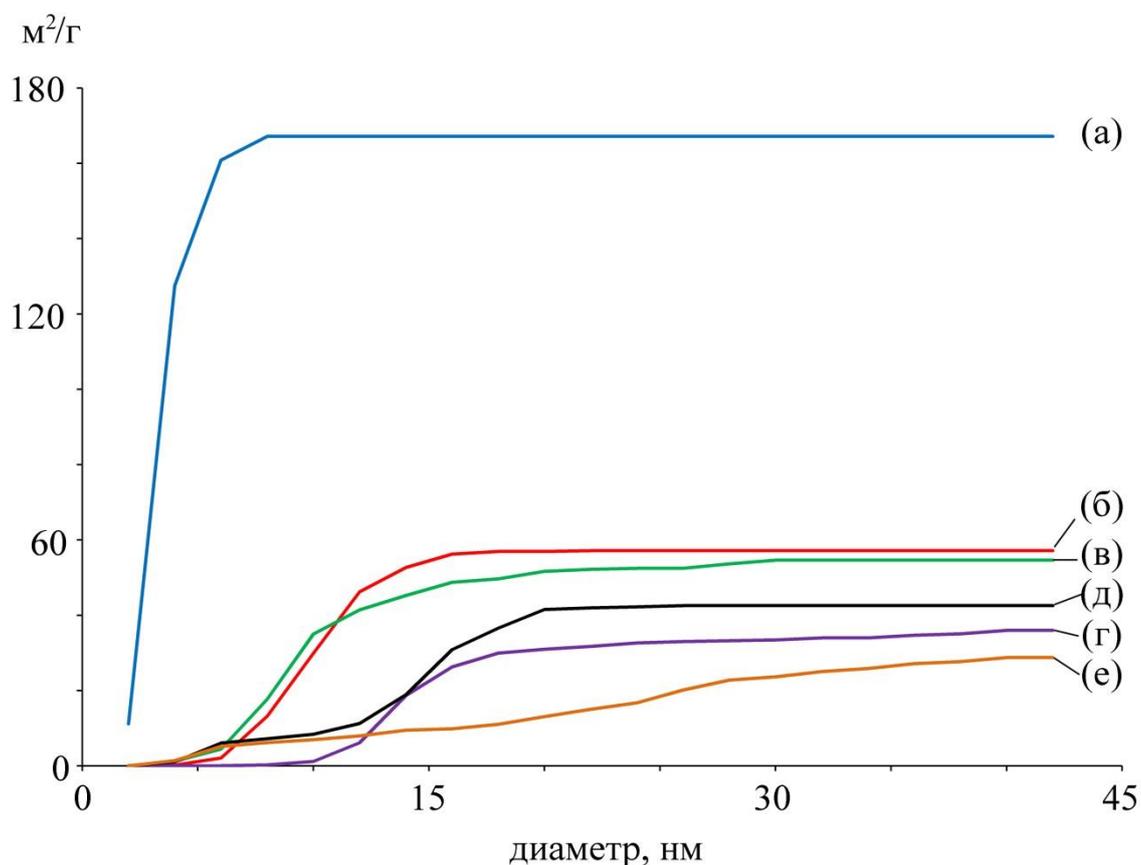


Рис. 35. Функции распределения удельной площади поверхности для наночастиц, синтезированных при помощи ДМАЭМ (а), МАГ-ДМАЭМ с $\alpha = 75.0\%$ (б), $\alpha = 70.7\%$ (в), $\alpha = 47.0\%$ (г), $\alpha = 18.0\%$ (д), МАГ (е).

Наиболее сильно по значению удельной площади поверхности выделяются наночастицы, синтезированные с использованием ДМАЭМ: значение превышает остальные приблизительно в пять раз. Если рассматривать только частицы менее 10 нм, отличие будет еще значительнее – в 20 раз.

Таким образом, можно утверждать, что частицы, синтезированные с помощью гомополимера ДМАЭМ обладают наилучшими морфологическими характеристиками с точки зрения активности, экономии дорогого сырья и контролируемости процесса синтеза. Необходимо отметить, что из использованных в настоящей работе полимеров-восстановителей гомополимер ДМАЭМ является наиболее токсичным. Однако исследование оптимальности выбора между токсичностью полимера-восстановителя и морфологическими характеристиками соответствующих наночастиц лежит за рамками настоящей работы.

3.3. Механизм восстановления и образования наночастиц.

Для того, чтобы связать величину модового диаметра наночастицы и мольное соотношение мономеров МАГ и ДМАЭМ в молекуле используемого полимера в данной работе была предложена простая модель роста наночастицы, учитывающая только мольные соотношения мономеров МАГ и ДМАЭМ в цепях со- и гомополимера.

Как правило, при исследовании влияния условий синтеза на размеры наночастицы учитываются такие параметры, как концентрация ионов серебра в растворе, концентрация молекул полимера, мольное соотношение [мономер]:[Ag⁺], молекулярная масса полимеров и длина их цепей, температура, тип растворителя и его рН [138,150–156]. В настоящей работе в процессе синтеза данные параметры имели одинаковый порядок величины для всех образцов (см. табл. 8). Условия синтеза различаются только мольными соотношениями мономеров МАГ и ДМАЭМ в цепи полимера, которые, в свою очередь, различаются по числу восстанавливающих центров.

Можно оценить, что одна молекула полимера может восстановить порядка 10–100 ионов Ag⁺, что в несколько раз меньше количества атомов в наночастице диаметром 2 нм. Это означает, что для восстановления одной частицы требуется вклад нескольких молекул полимера, и, следовательно, на ее формирование не может оказать влияние последовательность мономеров в цепи отдельно взятой молекулы. Число ионов серебра, которое может

восстановить до атомов Ag^0 одна молекула, N_{Ag^0} может быть вычислено как произведение среднего числа восстанавливающих центров в мономере $\langle i \rangle$ на число мономеров в молекуле $N_{\text{мм}}$: $N_{\text{Ag}^0} = \langle i \rangle \cdot N_{\text{мм}}$. $\langle i \rangle$ выражается через мольные соотношения и число восстанавливающих центров в каждом мономере ДМАЭМ и МАГ как $\langle i \rangle = i_{\text{ДМАЭМ}} \cdot \alpha + i_{\text{МАГ}} \cdot \beta = 1 \cdot \alpha + 4 \cdot \beta$, где α и β – мольные доли мономеров ДМАЭМ и МАГ соответственно. Учитывая, что $\alpha + \beta = 1$, окончательно $\langle i \rangle = 4 - 3\alpha$.

В таблице 10 для каждого полимера с учетом $\langle i \rangle$ приведены значения числа его молекул, достаточные для того, чтобы восстановить ионы Ag^+ до атомов Ag^0 в количестве, необходимом для формирования наночастицы соответствующего модового диаметра. Кроме значения $i_{\text{МАГ}} = 4$ вычисления также были произведены для $i_{\text{МАГ}} = 1, 2$ и 3 , так как в реакциях синтеза, возможно, могут окисляться не все центры восстановления.

Таблица 10. Среднее число восстанавливающих центров в мономере и необходимое для восстановления частицы модового диаметра число молекул для использованных полимеров.

Мольная доля ДМАЭМ α , %	Модовый диаметр, нм	$\langle i \rangle$ ($i_{\text{МАГ}} = 4$)	Необходимое для восстановления наночастицы с модовым диаметром число молекул полимера			
			$i_{\text{МАГ}} = 1$	$i_{\text{МАГ}} = 2$	$i_{\text{МАГ}} = 3$	$i_{\text{МАГ}} = 4$
100.0	4	1.00	14	14	14	14
75.0	8	1.75	61	49	40	35
70.7	8	1.88	77	60	49	41
47.0	14	2.59	898	587	436	347
18.0	16*	3.46	373	205	141	108
0.0	4	4.00	7	3	2	2

* большее значение модового диаметра бимодального распределения

Аналитическая связь между модовым диаметром $d_{\text{модовый}}$ и мольной долей ДМАЭМ α может быть установлена в предположении, что наиболее

вероятным механизмом роста наночастицы является такой, при котором поверхность частицы покрывают, образуя стабилизирующую оболочку, те же молекулы полимера, которые восстанавливали ионы Ag^+ до атомов Ag^0 , образовавших эту наночастицу. Детально механизм роста можно описать следующим образом (рис. 36): молекулы полимеров и ионы Ag^+ вступают в окислительно-восстановительную реакцию (рис. 36а), каждый восстанавливающий центр в мономере восстанавливает один ион Ag^+ (рис. 36б), возле молекул полимера образуются металлические кластеры Ag^0 (рис. 36в), наночастица серебра формируется вследствие случайных столкновений кластеров (рис. 36г), и процесс завершается покрытием окисленными молекулами полимера сформированной наночастицы с образованием стабилизирующей оболочки. Полимерная оболочка предотвращает приток сторонних кластеров, дальнейший рост наночастицы и ее агрегацию с другими наночастицами (рис. 36д). Для простоты на рис. 36д молекулы полимера на поверхности наночастицы изображены ровными рядами.

Поскольку описанный выше механизм предполагается наиболее вероятным, определяемый этим механизмом диаметр будет соответствовать моде распределения частиц по размерам. Возможная диффузия кластеров через окружение из полимерных молекул приводит к возникновению частиц с диаметром, отличным от модового, и, как следствие, уширению распределения частиц по размерам.

Число атомов в наночастице модового диаметра N_{Ag^0} совпадает с полным числом восстанавливающих центров молекул полимера $N_{\text{восст. центров}}$, которые образуют оболочку на поверхности этой наночастицы: $N_{\text{Ag}^0} = N_{\text{восст. центров}}$. Число восстанавливающих центров выражается как произведение полного числа мономеров $N_{\text{мм}}$ стабилизирующей полимерной оболочки на поверхности частицы на среднее число восстанавливающих центров в мономере $\langle i \rangle$: $N_{\text{восст. центров}} = \langle i \rangle \cdot N_{\text{мм}}$.

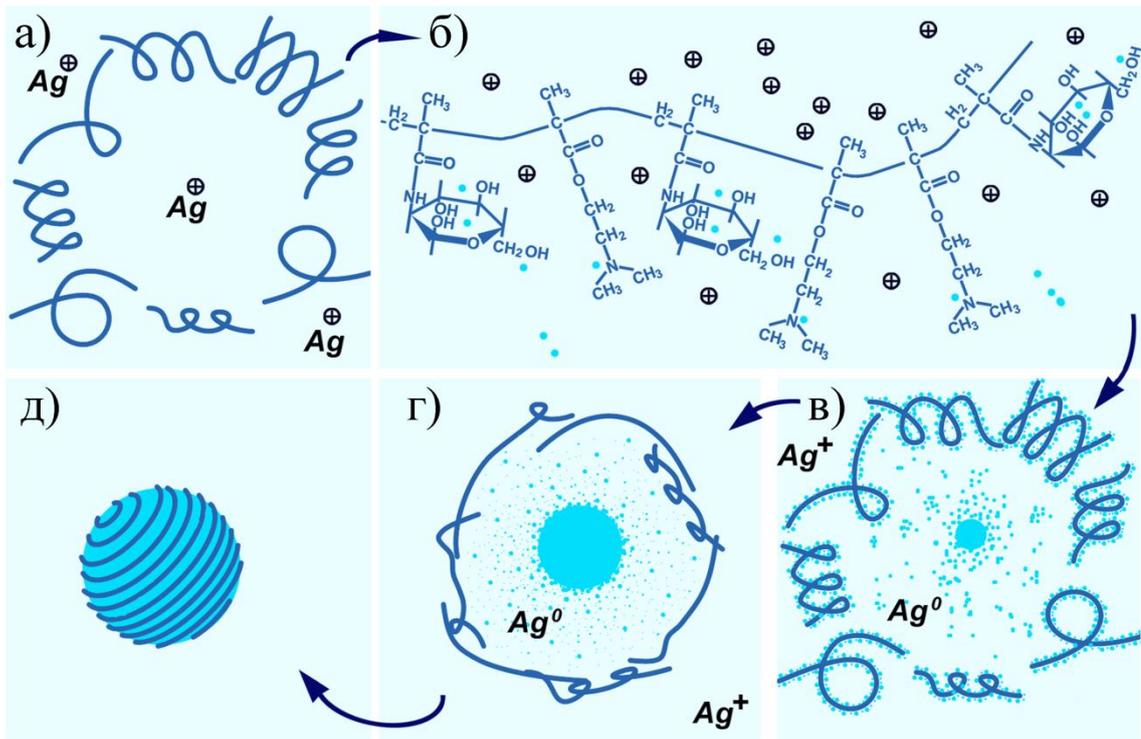


Рис. 36. Схематическое изображение процесса роста наночастицы в рамках модели. (а) – молекулы полимера в водном растворе, (б) – ионы Ag^+ вблизи молекул полимера, (в) – восстановление металлических кластеров молекулами полимеров, (г) – рост наночастицы вследствие случайных столкновений кластеров, (д) – наночастица модового диаметра, стабилизированная теми же молекулами полимеров.

При плотной упаковке молекул полимера в стабилизирующей оболочке расстояние между соседними витками (рис. 36д) можно считать сопоставимым с длиной С-С-связи (0.15 нм). Поэтому полное число мономеров на поверхности частицы диаметром d может быть оценено как

$$N_{\text{мм}} = \frac{S_{\text{сферы}}}{(0.15 \text{ нм})^2} = \pi \left(\frac{d}{0.15 \text{ нм}} \right)^2$$

Число атомов в наночастице Ag с учетом того, что элементарная ячейка кубической ГЦК-решетки содержит четыре атома, можно вычислить как

$$N_{Ag^0} = 4 \frac{V_{\text{шара}}}{(0.41 \text{ нм})^3} = 4 \frac{\pi}{6} \left(\frac{d}{0.41 \text{ нм}} \right)^3$$

В итоге может быть получено равенство:

$$\langle i \rangle \times \pi \left(\frac{d}{0.15 \text{ нм}} \right)^2 = 4 \frac{\pi}{6} \left(\frac{d}{0.41 \text{ нм}} \right)^3$$

Подставляя выражение $\langle i \rangle = (4 - 3\alpha)$ и решая уравнение относительно d , окончательно получаем зависимость модового диаметра от мольной доли ДМАЭМ α :

$$d_{\text{модовый}} = 4.6 \times (4 - 3\alpha) \text{ [нм]} \quad (3.1)$$

На рис. 37 изображены графики экспериментальной и теоретической зависимости модового диаметра наночастиц серебра от мольной доли ДМАЭМ α в полимере-восстановителе. Как видно из графика, наилучшее согласование наблюдается для $i_{\text{МАГ}} = 4$.

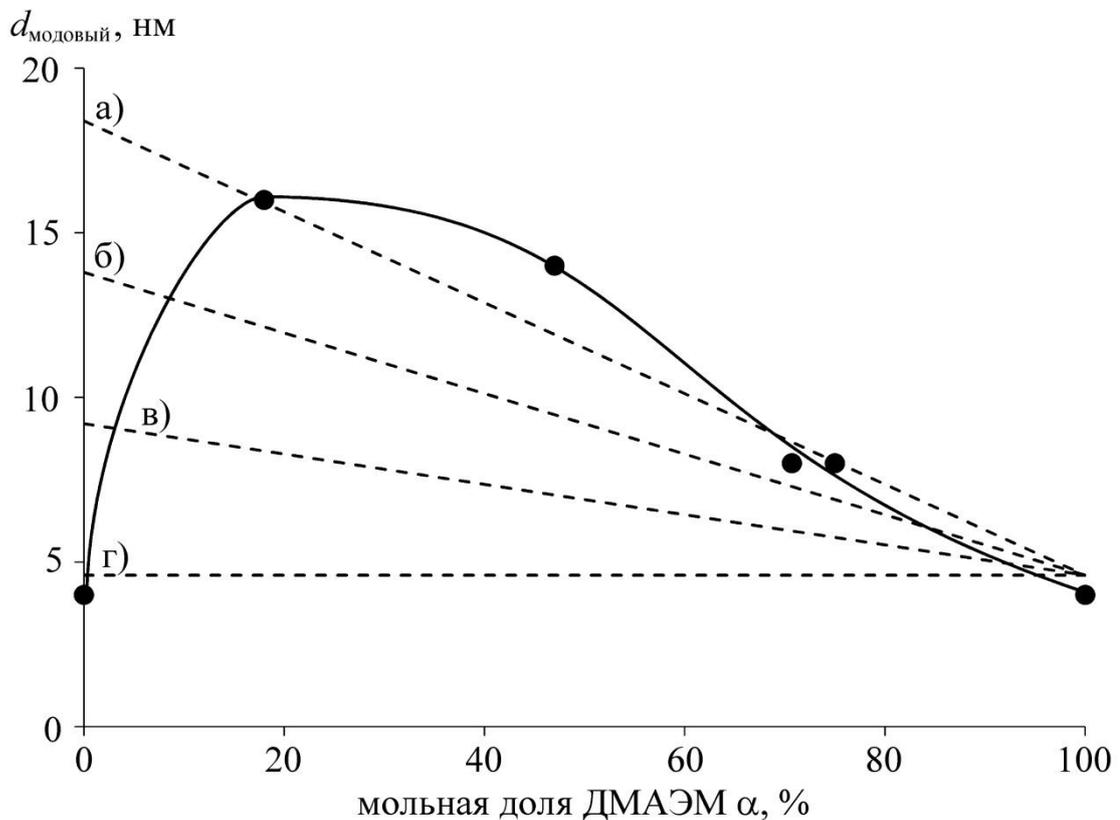


Рис. 37. Экспериментальная (—●—) и теоретические (---) зависимости модового диаметра от мольной доли ДМАЭМ в полимере-восстановителе для числа восстанавливающих центров в мономере МАГ $i_{\text{МАГ}} = 4$ (а), $i_{\text{МАГ}} = 3$ (б), $i_{\text{МАГ}} = 2$ (в) и $i_{\text{МАГ}} = 1$ (г).

Теоретическая зависимость, соответствующая $i_{\text{МАГ}} = 4$, хорошо согласуется с экспериментальными результатами на интервале от $\alpha \approx 15\%$ до

$\alpha \approx 85\%$. При достижении α значений 0% и 100%, что соответствует гомополимерам МАГ и ДМАЭМ соответственно, относительное расхождение теоретического и экспериментального значений увеличивается, достигая, в частности, отличия в 4 раза при $\alpha = 0\%$.

Как было установлено [140], синтез наночастиц с использованием гомополимеров был отмечен наличием индукционных периодов, а также большей длительностью протекания реакции (см. табл. 7). Таким образом, большие расхождения экспериментальных результатов с теоретическими в случае гомополимеров могут быть объяснены отличиями в кинематике процесса синтеза, а предельные значения α можно считать границей применимости предложенной модели.

Также в рамках предложенной модели можно объяснить бимодальность распределения по размерам наночастиц, синтезированных с использованием сополимера МАГ-ДМАЭМ с $\alpha = 18\%$. Значение $\alpha = 18\%$ является наименьшим, при этом больший модовый диаметр является наибольшим (16 нм) для всех образцов, что вполне согласуется с предсказаниями модели: модовый диаметр увеличивается с уменьшением α , согласно формуле (3.1). При этом можно предположить, что вследствие случайных столкновений кластеров образование нанометровых частиц также является весьма вероятным процессом, и во всех полученных распределениях присутствует своеобразный фон из нанометровых частиц. Но только в образце с $\alpha = 18\%$ модовый диаметр оказывается достаточно большим, чтобы в распределении мог проявиться соответствующий этому перманентному фону пик, что приводит к появлению второй моды распределения на уровне нескольких нанометров.

Предложенная модель может быть расширена с учетом гипотезы о создании мономерами МАГ и ДМАЭМ благоприятного для восстановления ионов Ag^+ микроокружения, которая, как упоминалось выше, была предложена в [139,140]. Можно предположить, что каждый

восстанавливающий центр в молекуле полимера окисляется с некоторой вероятностью, зависящей только от мольного соотношения мономеров МАГ и ДМАЭМ. Если обозначить вероятность окисления какого-либо центра восстановления как $\eta(\alpha)$, можно записать:

$$N_{Ag} = \eta(\alpha) \times \langle i \rangle \times N_{MM}$$

Тогда выражение для теоретической зависимости модового диаметра от α может быть записано как:

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

Используя экспериментальные результаты, можно вычислить вероятность окисления центра:

$$\eta(\alpha) = d_{\text{модовый эксп}}(\alpha) / \{4.6 \times (4 - 3\alpha)\}$$

На рис. 38 изображен график зависимости вычисленной вероятности окисления центра от мольной доли МДАЭМ α . Как видно из графика, вероятность окисления снижается при достижении α экстремальных значений, что согласуется с гипотезой о взаимной роли мономеров МАГ и ДМАЭМ: в молекуле полимера преобладают мономеры одного типа, и вызванная взаимной ролью мономеров разного типа оптимизация процесса восстановления снижается. Вероятность достигает максимума при $\alpha = 47\%$, т.е. при приблизительно равном количестве мономеров МАГ и ДМАЭМ, что, напротив, способствует их взаимному влиянию. Превышение величиной $\eta(47\%)$ 100% можно трактовать, во-первых, как результат погрешностей измерений, которые привели к переоценке истинного значения модового диаметра, во-вторых, как результат притока к растущей наночастице сторонних кластеров, которые были восстановлены молекулами полимеров, не участвующими в создании стабилизирующей оболочки рассматриваемой частицы, что в результате привело к увеличению значения модового диаметра.

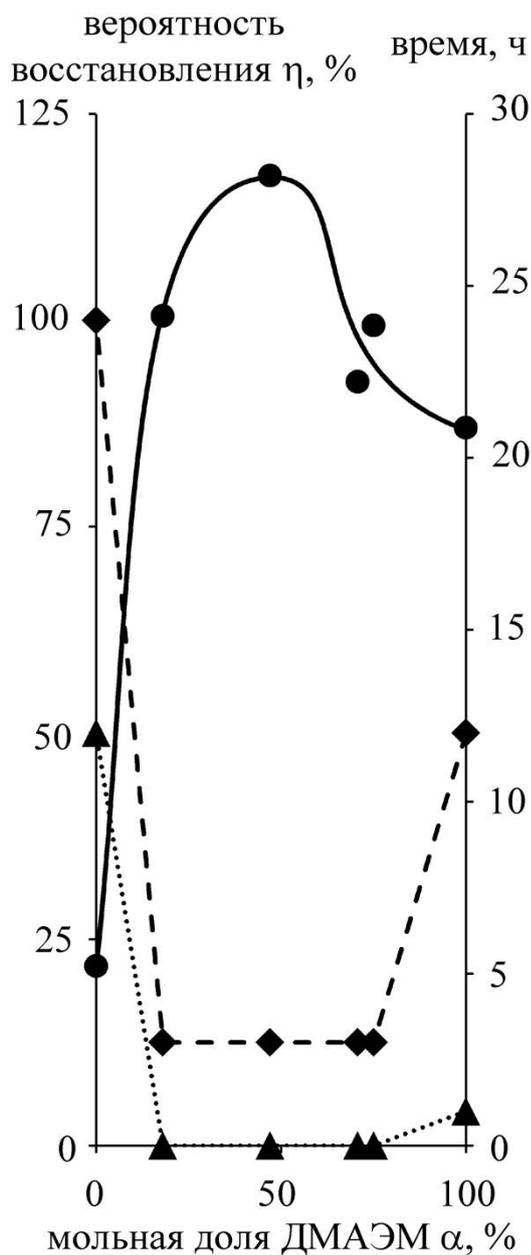


Рис. 38. Вероятность окисления восстанавливающего центра (●), индукционные периоды (▲) и продолжительности реакций (◆) для использованных полимеров.

Предположение, что восстановительный центр в мономере может окисляться с некоторой вероятностью, может также объяснить монотонное увеличение дисперсии распределений при снижении α (см. табл. 9): возрастает среднее число восстанавливающих центров, что приводит к увеличению разброса в числе атомов Ag^0 в кластерах, восстановленных различными мономерами. Как следствие, возрастает разброс в размерах наночастиц.

Оптимизация процесса восстановления вследствие взаимной роли мономеров МАГ и ДМАЭМ может быть поставлена под сомнение. Возможно, размер частицы определяет только общее мольное соотношение мономеров. В таком случае при использовании растворов физических смесей гомополимеров МАГ и ДМАЭМ с аналогичными представленным в табл. 9 мольными соотношениями мономеров следует ожидать частицы с распределениями по размерам, схожими с распределениями, полученными для сополимеров (рис. 33). Если, однако, для увеличения размера наночастицы действительно требуется взаимная роль мономеров МАГ и ДМАЭМ, то синтез наночастиц будет происходить независимо для каждого из гомополимеров. В результате распределение по размерам будет представлять собой суперпозицию распределений, полученных при использовании отдельно ДМАЭМ (рис. 33а) и МАГ (рис. 33б).

Для проверки гипотезы о взаимной роли мономеров МАГ и ДМАЭМ был проведен синтез наночастиц серебра с использованием растворов гомополимеров МАГ и ДМАЭМ с общими мольными соотношениями [ДМАЭМ]:[МАГ] 50%:50% и 20%:80%. Статистический анализ наночастиц, проведенный с помощью электронной микроскопии с использованием программы AnNa, показал, что модовые диаметры наночастиц в обоих образцах не превышают 10 нм, а распределения по размерам имеют хвосты (рис. 39 и рис. 40). Как видно из рис. 39 и 40, данные распределения не совпадают с распределениями по размерам частиц, синтезированных с помощью сополимеров со сходными мольными соотношениями – 47%:53% (рис. 34в) и 18%:82% (рис. 34г). Параметры распределений по размерам наночастиц Ag, синтезированных с использованием смесей гомополимеров, представлены в таблице 11.

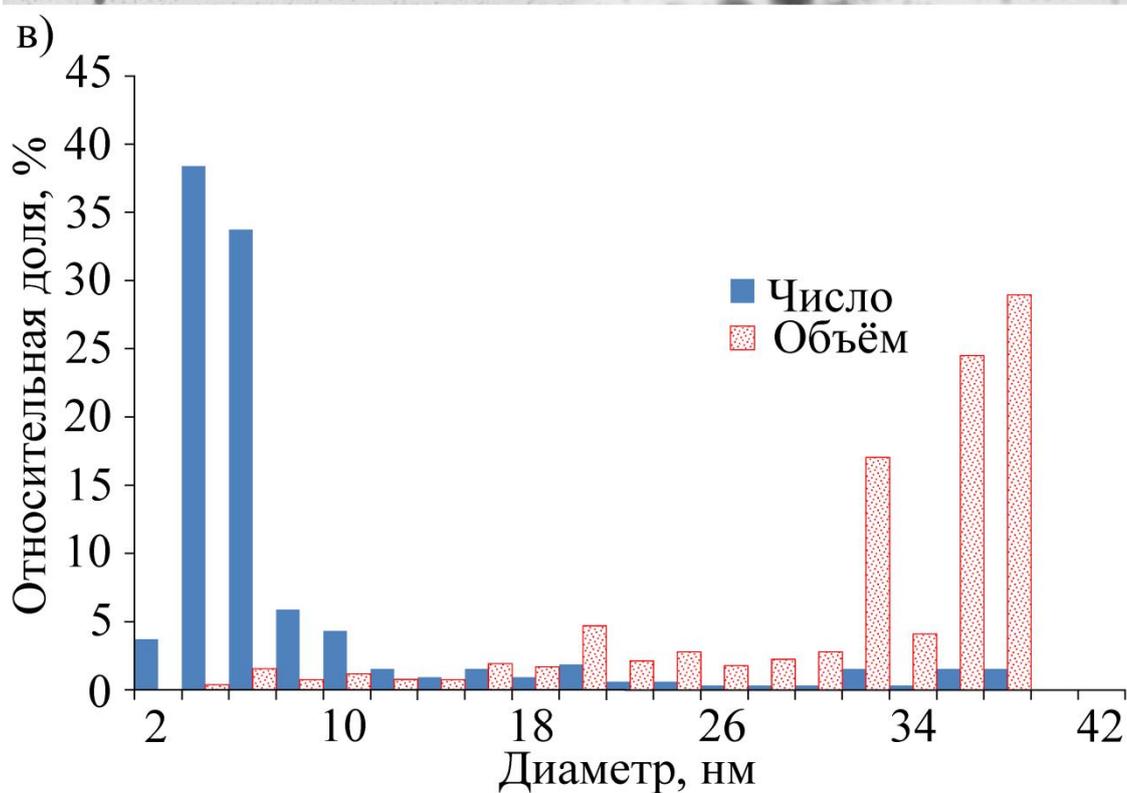
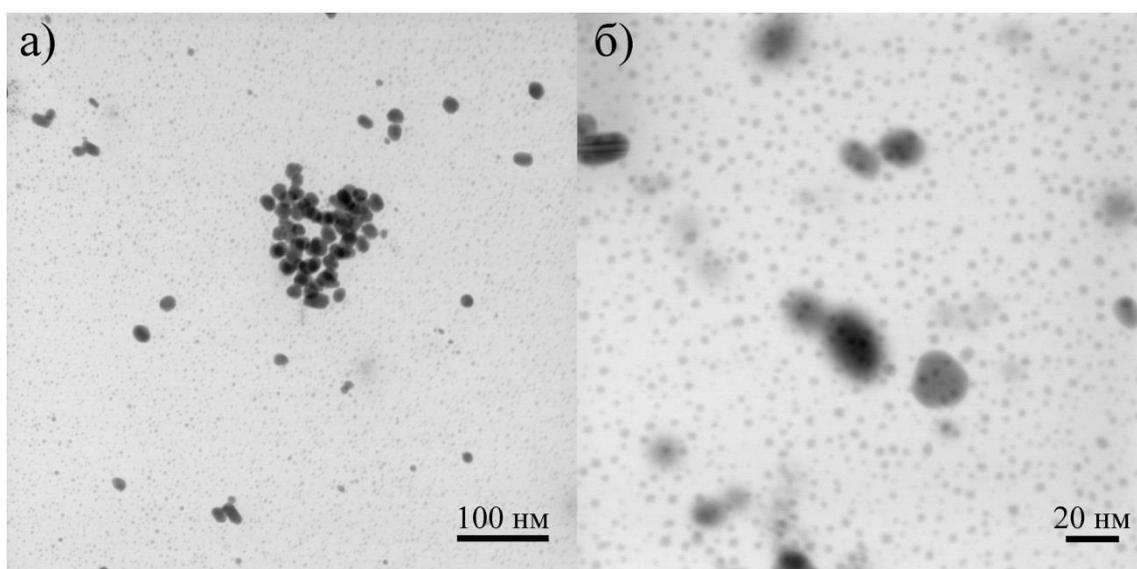


Рис. 39. Светлопольные СПЭМ-снимки с низким (а) и высоким (б) увеличением наночастиц серебра, синтезированных при помощи смеси гомополимеров ДМАЭМ и МАГ с общим мольным соотношением [ДМАЭМ]:[МАГ], равным 50%:50%, и соответствующие распределения по размерам числа и полного объема наночастиц (в).

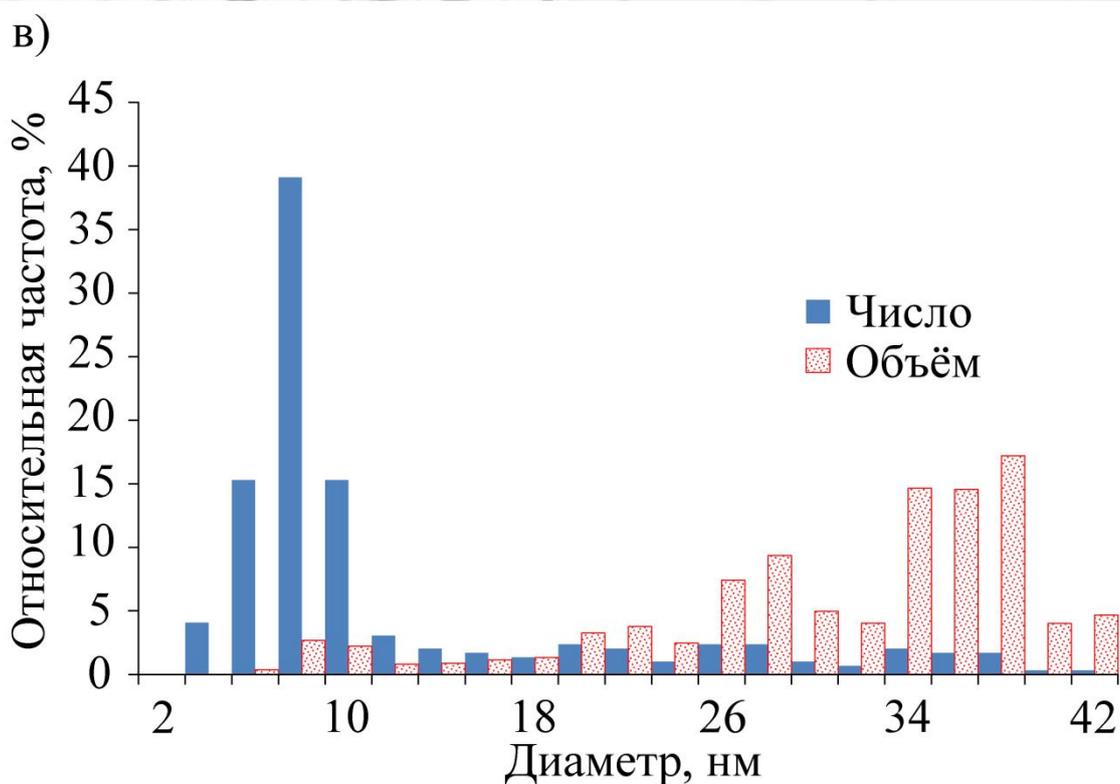
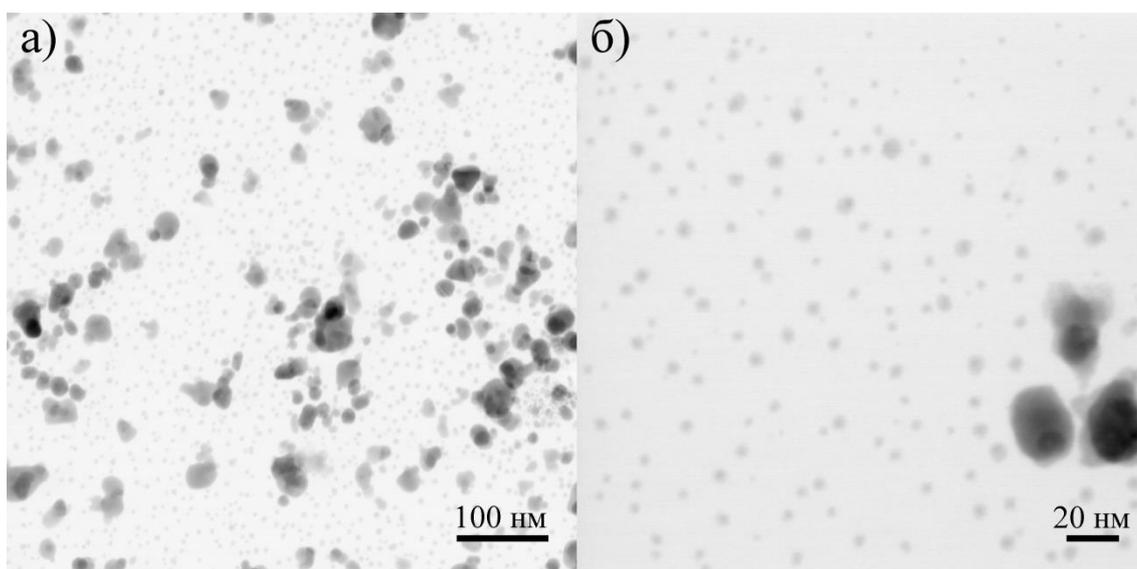


Рис. 40. Светлопольные СПЭМ-снимки с низким (а) и высоким (б) увеличением наночастиц серебра, синтезированных при помощи смеси гомополимеров ДМАЭМ и МАГ с общим мольным соотношением [ДМАЭМ]:[МАГ], равным 20%:80%, и соответствующие распределения по размерам числа и полного объема наночастиц (в).

Таблица 11. Параметры распределений и объемные доли частиц до 10 нм и частиц с хвостов распределений, соответствующие физическим смесям гомополимеров МАГ и ДМАЭМ.

Общее соотношение мономеров [ДМАЭМ]:[МАГ]	Модовый диаметр, нм	Средний диаметр, нм	Станд. откл. нм	Объемная доля частиц с диаметром менее 10 нм, %	Объемная доля частиц с хвоста распределений, %
50%:50%	4	7.19	7.55	4	95
20%:80%	8	11.25	8.69	5	94

Формы распределений по размерам позволяют утверждать, что при использовании физических смесей гомополимеров МАГ и ДМАЭМ, реакции синтеза наночастиц происходят независимо для каждого гомополимера и увеличения модового диаметра наночастицы, аналогичного возникающему при использовании сополимеров МАГ-ДМАЭМ, не происходит. Это подтверждает гипотезу об оптимизации процесса восстановления ионов Ag⁺ вследствие взаимного влияния мономеров МАГ и ДМАЭМ.

3.4. Выводы к главе 3.

Был проведен синтез наночастиц Ag с использованием гомополимеров ДМАЭМ и МАГ, а также их сополимеров в различных мольных соотношениях при комнатной температуре, инертной атмосфере и естественном освещении. Во всех образцах наночастицы Ag в основном представляли собой монокристаллы, изредка проявлялось двойникование.

Наночастицы Ag, синтезированные с использованием поли-ДМАЭМ, не превышали в размерах 10 нм и имели самое узкое распределение. Модовый диаметр частиц, синтезированных с использованием поли-МАГ, также составил несколько нм, однако распределение было широким, максимальный размер частицы достигал 50 нм. Физическим смесям гомополимеров МАГ и ДМАЭМ соответствовали частицы с модовым диаметром на уровне нескольких нанометров с выраженным хвостом распределения. Это

позволяет утверждать, что синтез наночастиц происходит независимо для молекул поли-МАГ и поли-ДМАЭМ.

Модовый диаметр распределений наночастиц Ag увеличивается при снижении мольной доли ДМАЭМ в цепи сополимера, достигая максимального значения в 13.4 нм при 47% ДМАЭМ. Сополимеру с мольной долей ДМАЭМ 15% соответствовало бимодальное распределение с модами на уровне 5 и 15 нм. Все распределения, полученные с использованием сополимеров, имели выраженные хвосты.

Был предложен механизм формирования наночастиц Ag в окружении молекул со- и гомополимеров на основе МАГ и ДМАЭМ. Механизм позволяет связать модовый диаметр и мольные соотношения МАГ-ДМАЭМ в молекуле полимера. Было установлено, что распределения, соответствующие физическим смесям поли-МАГ и поли-ДМАЭМ и сополимерам МАГ-ДМАЭМ со сходными мольными соотношениями [МАГ]:[ДМАЭМ], не совпадают, что подтверждает гипотезу о взаимной координации процесса восстановления ионов Ag^+ мономерами МАГ и ДМАЭМ.

ГЛАВА 4. СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ РАЗМЕРОВ НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА И СЕЛЕНА И ИХ РАСПРЕДЕЛЕНИЙ ПО ДАННЫМ ПРОСВЕЧИВАЮЩЕЙ ЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ И МАЛОУГЛОВОГО РЕНТГЕНОВСКОГО РАССЕЯНИЯ.

В данной главе демонстрируются преимущества комбинации двух методов – малоуглового рентгеновского рассеяния и просвечивающей электронной микроскопии – для получения полной и надежной информации о частицах в растворах и их распределениях по размерам, а также указываются причины ошибок в статистическом анализе размеров частиц для обоих методов как для моно-, так и для полидисперстных систем.

Ранее проведенные исследования [157] оптических и гидродинамических свойств растворов сополимеров МАГ-ДМАЭМ, содержащих серебряные наночастицы, показали, что размеры наночастиц, оцененные из измеренных радиусов гирации в данных системах по порядку величины совпадают с измеренными размерами наночастиц с помощью наПЭМ.

Для сравнительного анализа результатов в рамках ПЭМ и МУРР были исследованы морфологические характеристики различных полидисперсных систем наночастиц серебра и селена, синтезированных и стабилизированных в растворах полимеров. Наночастицы серебра были синтезированы с использованием сополимеров МАГ-ДМАЭМ с мольными соотношениями $[МАГ]:[ДМАЭМ] = 88.0\%:12.0\%$ и $55.5\%:44.5\%$, а также гомополимера ДМАЭМ.

Наночастицы селена были получены восстановлением селенистой кислоты аскорбиновой кислотой и стабилизированы с помощью поли-2-акриламидо-2-метил-1-пропан сульфокислоты (ПАМС) и поливинилпирролидона (ПВП). Скорость восстановления оценивалась в термостатируемом режиме (20°C) на спектрофотометре SpecordM-40 по нарастанию во времени оптической плотности раствора при длине волны 320 нм. Восстановление ионов селена производилось в водном растворе при

массовом соотношении полимер:селен 0.1%, т.е. при условии полного насыщения абсорбционных способностей наночастиц, которые были установлены для наноструктур полимер-селен в работе [158].

Статистический анализ размеров наночастиц в рамках электронной микроскопии был выполнен с помощью программы AnNa (подробное описание процедуры обработки микрофотографий см. в п. 2.3).

Профили рассеяния наночастицами рентгеновского излучения получались методом традиционного малоуглового рентгеновского рассеяния (МУРР) на дифрактометре «Амур-К», собранном в СКБ института кристаллографии РАН (г. Москва). Длина волны составляла фиксированное значение 0.154 нм (переход Cu-K_α). Эксперимент проводился в области значений волновых векторов $0.12 < s < 10.00 \text{ нм}^{-1}$ с использованием коллимационной камеры Кратки (волновой вектор s связан с углом рассеяния 2θ как $s = 4\pi \sin\theta / \lambda$). Полученные экспериментальные данные нормировались на интенсивность падающего пучка, после чего в них вводилась поправка на коллимационные искажения. Образцы коллоидных растворов помещались в кварцевый капилляр с внутренним диаметром 1 мм и толщиной стенок 0.01 мм. Обработка экспериментальных данных МУРР проводилась при помощи программы PRIMUS с вычитанием интенсивности рассеяния от раствора полимера и приборными поправками, объемные распределения наночастиц были получены в программе MIXTURE, исходя из предположения о сферичности наночастиц [159]. Объемное распределение частиц находилось как суперпозиция трех распределений Шульца.

4.1. Морфологический анализ наночастиц серебра.

На рис. 41 показаны (С)ПЭМ изображения наночастиц Ag (рис. 41а, б, в), а также соответствующие экспериментальные и теоретические (в рамках модели сферических частиц) кривые МУРР (рис. 41г).

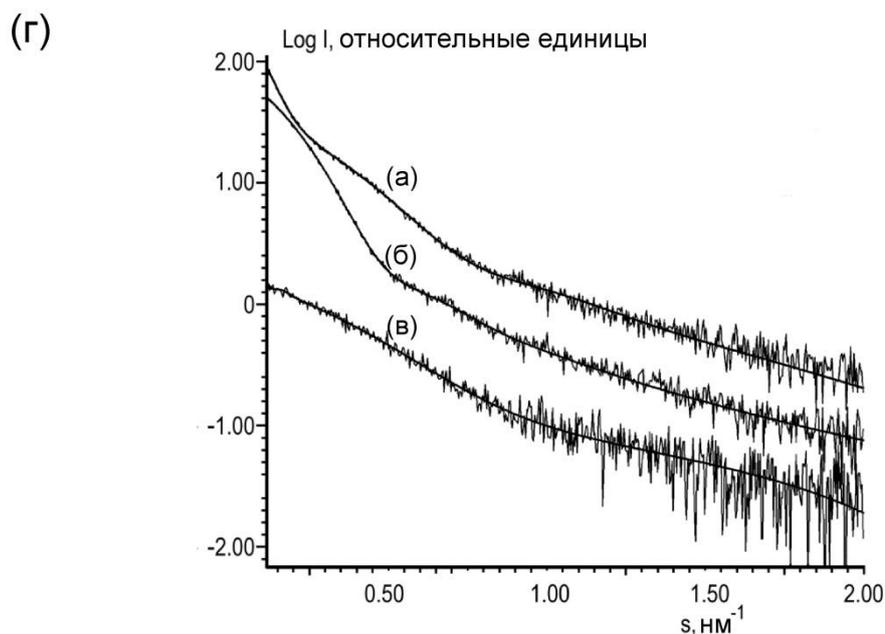
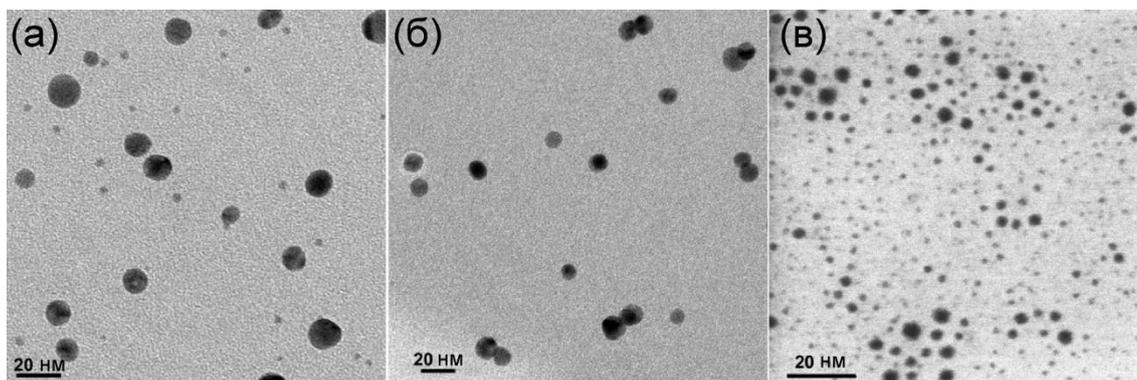


Рис. 41. (С)ПЭМ-изображения (а, б, в) наночастиц серебра и соответствующие экспериментальные (ломаные) и аппроксимированные теоретические (в рамках модели сферических частиц, гладкие) кривые МУРР (z). (а) и (б) – наночастицы серебра, полученные с использованием сополимеров МАГ-ДМАЭМ с мольной долей ДМАЭМ 12.0% и 44.5% соответственно, (в) – с использованием гомополимера ДМАЭМ.

Рисунок 42 а, б демонстрирует минимальный вклад от рассеяния чистого раствора гомополимера ДМАЭМ на результирующую кривую рассеяния от коллоидного раствора с наночастицами, так как вклад в рассеяние от полимерного раствора меньше почти на два порядка.

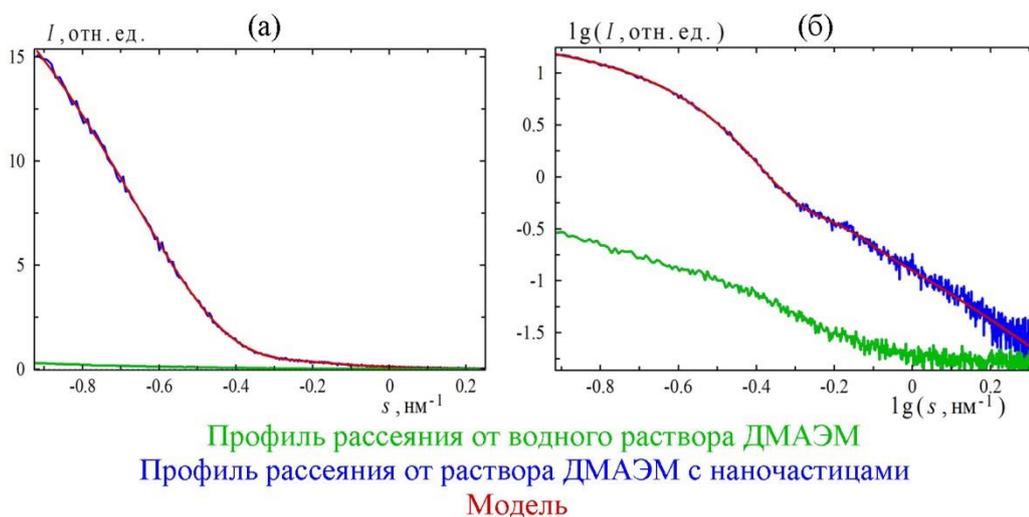


Рис. 42. (а) Профиль рентгеновского рассеяния от водного раствора ДМАЭМ (зеленый цвет), профиль рассеяния от раствора ДМАЭМ с наночастицами (синий цвет) с аппроксимированной теоретической кривой (красный цвет), (б) – Профиль рентгеновского рассеяния от водного раствора ДМАЭМ (зеленый цвет), профиль рассеяния от раствора ДМАЭМ с наночастицами (синий цвет) с аппроксимированной теоретической кривой (красный цвет) в логарифмических осях.

На рис. 43 приведены распределения по размерам числа наночастиц Ag и объема серебра, полученные в рамках ПЭМ, и распределения объема серебра, полученного в рамках МУРР. В таблице 12 – полученные с помощью обеих методик значения модовых диаметров распределений объема наночастиц серебра.

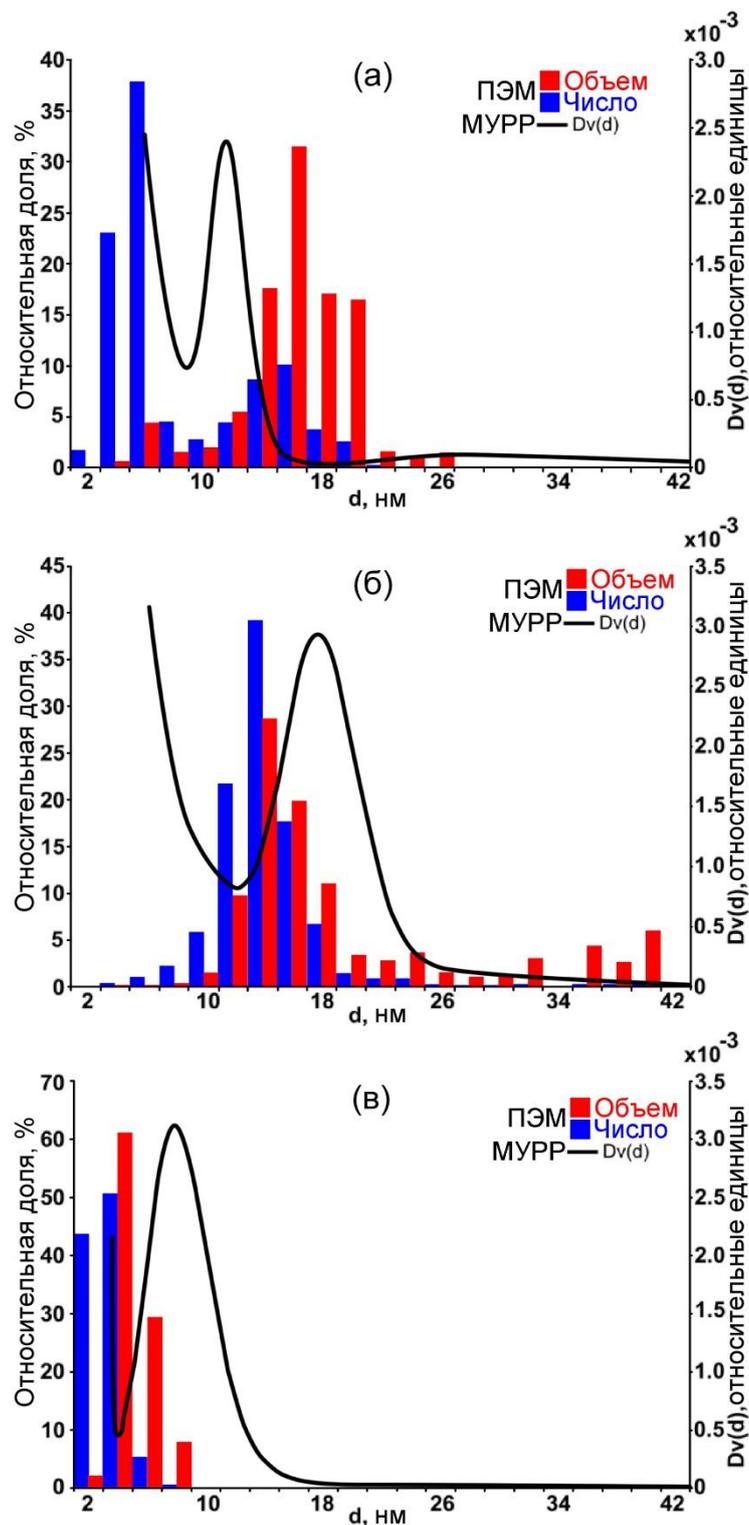


Рис. 43. Объемные распределения, полученные в рамках МУРР (сплошные линии), и численные (синие столбцы) и объемные (красные столбцы) распределения, полученные в рамках ПЭМ, наночастиц серебра, синтезированных с помощью сополимеров МАГ-ДМАЭМ с мольной долей ДМАЭМ 12.0% (а), 44.5% (б) и гомополимера ДМАЭМ (в).

Таблица 12. 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

Как видно из рис. 43, в распределениях объема, полученных с помощью ПЭМ и МУРР, положения пиков распределений не совпадают. В случае мономодальных распределений числа частиц (рис. 43б, в) сдвиг пика объемного распределения, полученного в рамках ПЭМ, происходит в сторону меньших диаметров. В случае бимодального распределения числа частиц (рис. 43а) сдвиг правого пика в соответствующем ПЭМ объемном распределении происходит в сторону бóльших диаметров. Наибольшее относительное отличие в результатах, достигающее 60%, наблюдается для частиц, синтезированных с использованием гомополимера ДМАЭМ (рис. 43в).

4.2. Морфологический анализ наночастиц селена.

На рис. 44 приведены примеры ПЭМ микрофотографий наночастиц селена, синтезированных с использованием ПАМС и ПВП (рис. 44а, б), и соответствующие экспериментальные и аппроксимированные теоретические (в рамках модели сферических частиц) кривые МУРР (рис. 44б). Распределения объема частиц, полученные в рамках МУРР, и соответствующие ПЭМ распределения числа и объема частиц представлены на рис. 45, значения модовых диаметров объемных распределений – в таблице 13. Рис. 45 и табл. 13 демонстрируют, что данные значения, полученные в рамках различных методик, для каждого образца отличаются более чем в два раза. В отличие от случая наночастиц серебра, пики

объемных распределений, соответствующих МУРР, оказались смещены в сторону меньших диаметров.

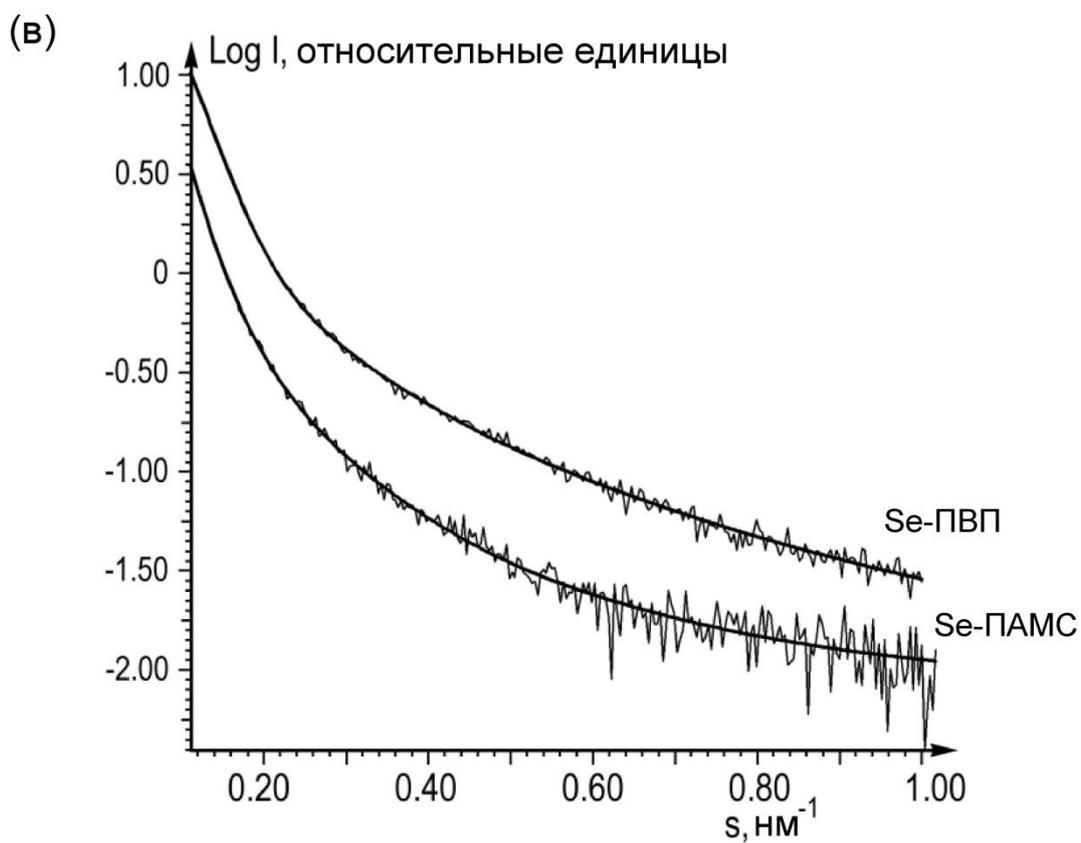
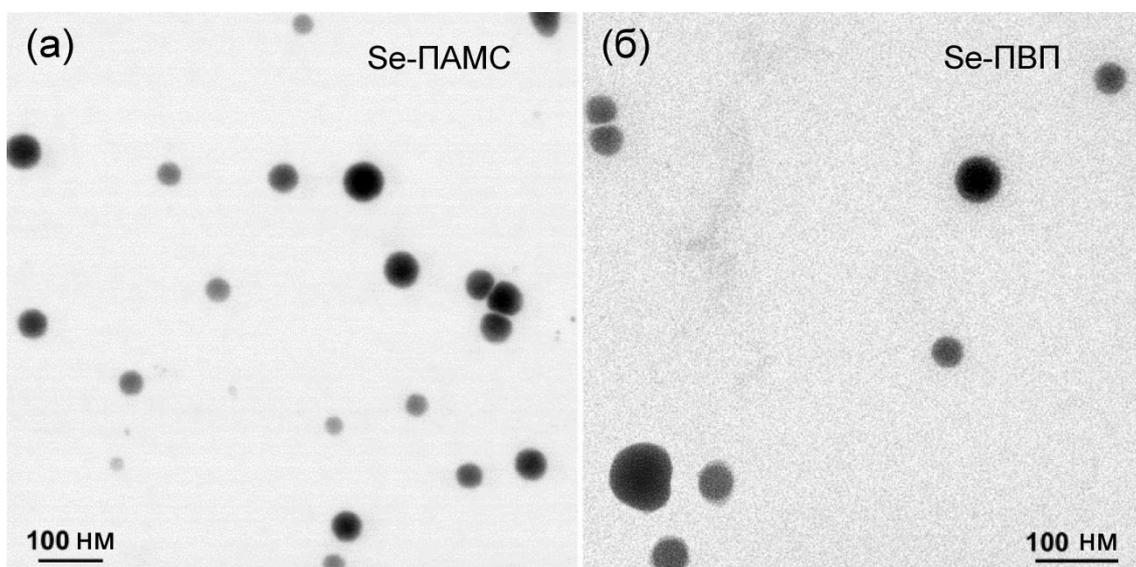


Рис. 44. (С)ПЭМ-изображения (а, б) наночастиц селена и экспериментальные кривые МУРР (в) с аппроксимированными кривыми рассеяния в рамках модели сферических частиц.

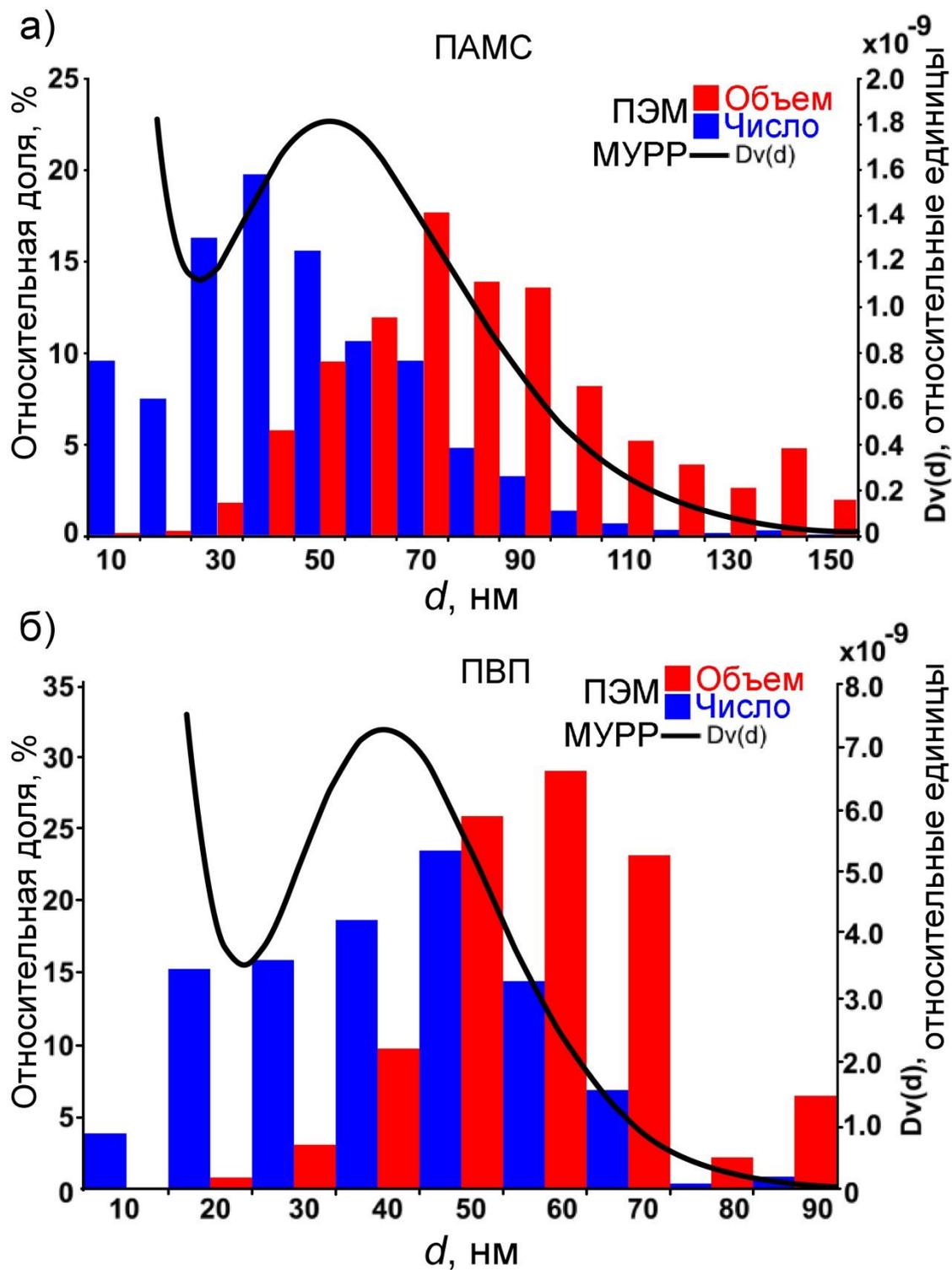


Рис. 45. Объемные распределения, полученные в рамках МУРР (сплошные линии) и численные (синие столбцы) и объемные (красные столбцы) распределения, полученные в рамках ПЭМ, наночастиц селена синтезированных с использованием ПАМС (а) и ПВП (б).

Таблица 13. 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

4.3. Применение комбинации методов ПЭМ и МУРР для всестороннего исследования наночастиц в растворе.

Бóльшие значения модовых диаметров мономодальных объемных распределений наночастиц Ag (рис. 43б, в), полученные в рамках МУРР, могут быть объяснены тем, что на поверхности наночастиц присутствует стабилизирующая полимерная оболочка. Так как рентгеновское излучение рассеивается на флуктуациях электронной плотности, в рамках МУРР результирующий диаметр наночастицы – это внешний диаметр полимерной оболочки. Кроме этого, в [160] сообщалось, что синтезированные с использованием гомополимера ДМАЭМ наночастицы имеют наименьший диаметр по сравнению с частицами, синтезированными с использованием сополимеров МАГ-ДМАЭМ. Модовый диаметр таких частиц составлял от 2 до 4 нм. На практике обнаружить нанометровые частицы в рамках МУРР затруднительно и возможно только при их очень высокой концентрации в растворе. Поэтому пик объемного распределения может соответствовать фону рассеяния рентгеновского излучения на флуктуациях электронной плотности раствора (рис. 43в).

В случае наночастиц Ag, синтезированных с использованием МАГ-ДМАЭМ с мольной долей ДМАЭМ 12.0% (рис. 43а), 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 низкий пик (рис. 43а) 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 объемного распределения, полученного с помощью ПЭМ.

Расхождение результатов для наночастиц Se может быть объяснено механическими свойствами наночастиц. На рис. 44а можно увидеть группу из трех, а на рис. 44б из двух соприкасающихся деформированных частиц. Однако деформация может происходить не только вследствие соприкосновения частиц друг с другом. Можно предположить, что при высыхании капли водного раствора коллоида на углеродной подложке частицы деформировались под действием сил поверхностного натяжения и сферические частицы приняли форму эллипсоидов, увеличив таким образом свои размеры в латеральных направлениях. Так как в рамках ПЭМ размеры наночастиц измеряются как размеры их проекций, деформация формы привела к искажению результатов в большую сторону. Поскольку рассеяние рентгеновского излучения происходит на частицах в растворе, данный эффект не проявлялся в случае МУРР-эксперимента.

Однако, как было установлено в [75], отнюдь не все исследуемые наночастицы селена деформируются при соприкосновении друг с другом, что свидетельствует об их различной структуре, и наночастицы одного образца могут иметь различный контраст. В данном случае только ПЭМ позволяет установить причину различий в механических свойствах наночастиц. Как показала дифракция электронов с выбранного участка, в образце также присутствуют кристаллические наночастицы селена моноклинной сингонии [75]. Эти частицы имеют большой контраст и сохраняют сферическую форму. Прочие наночастицы являются аморфными, а часть из них – композитными: в их объеме, как показала энергодисперсионная рентгеновская спектроскопия [75], содержится полимер-восстановитель в различной концентрации.

4.4. Выводы к главе 4.

Установлено, что отличия значений модовых диаметров объемных распределений, полученных в рамках ПЭМ и МУРР, могут возникать по различным причинам. В случае нанометровых частиц результаты МУРР могут быть ошибочными, тогда как ПЭМ позволяет получить информацию об их морфологии при условии репрезентативности статистики.

Мы полагаем, что в случае бимодального распределения вклады в рассеяние от двух подсистем частиц могут быть усреднены в рамках МУРР, и в результирующем распределении будет единственная мода, располагающаяся между двумя истинными модами.

Расхождения в значениях модовых диаметров распределений МУРР и ПЭМ могут быть объяснены наличием стабилизирующей полимерной оболочки на поверхности частиц, которая создает вклад в рассеяние рентгеновского излучения, однако имеет малый контраст на электронных микрофотографиях.

МУРР оказывается очень эффективным в исследовании мягких частиц в интервале размеров от 20 до 100 нм. При исследовании таких частиц в ПЭМ результаты оказываются искаженными артефактами высушивания – частицы увеличивают свои размеры в латеральных направлениях. Однако только ПЭМ позволяет обнаружить химические и структурные особенности таких частиц.

В данной главе показано преимущество использования комбинации двух методов – малоуглового рентгеновского рассеяния и просвечивающей электронной микроскопии в исследовании высушенных твердых композитов и наночастиц, находящихся в растворе.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

Свойства материалов, в которых наночастицы являются одним из основных компонентов, в большой степени зависят от их размеров и формы. Это обосновывает важность анализа их размеров и распределений, так как в настоящее время основными требованиями в производстве наночастиц и их композитов является монодисперсность, при этом в биологически активных материалах желателен размер частиц до 10 нм. Монодисперсность обеспечивает выраженный контролируемый эффект, тогда как полидисперсные системы не обладают необходимой селективностью. Частицы малого размера являются наиболее био- и химически активными. Таким образом, информация о размерах наночастиц и их распределениях необходима для (1) фундаментальных исследований механизма образования наночастиц в различных системах для установления механизма формирования частиц и оценки степени влияния среды на их морфологические характеристики и (2) критически важна в прикладных работах для оптимизации синтеза материалов и эффективности использования.

Настоящее исследование нацелено на решение двух задач: (1) разработать новый подход для автоматического измерения размеров наночастиц на электронно-микроскопических изображениях, подходящий для анализа частиц диаметром до 10 нм, расположенных внутри аморфной полимерной матрицы; (2) установить возможности алгоритма для анализа стабилизированных полимерами наночастиц серебра и исследовать механизм их формирования в растворе во время окислительно-восстановительных реакций в рамках принципов зеленой химии.

В процессе работы над определением влияния структуры полимеров на размер наночастиц мы осознали необходимость разработки новых алгоритмов морфологического анализа частиц размером несколько нанометров. Существующие программы (коммерческие и в свободном доступе), претендующие на универсальность обработки изображений

различных наночастиц, не смогли обеспечить правильность определения местоположения наночастиц на подложке, а измерения размеров в автоматическом режиме имели большую погрешность.

Результаты проведенных исследований позволили сделать следующие 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.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает искреннюю благодарность своему научному руководителю – ведущему научному сотруднику д.ф.-м.н. Елене Игоревне Суворовой за профессиональные и ценные советы, полученные во время обучения и выполнения исследований, постоянное внимательное отношение, мудрость и терпение. Автор благодарит всех сотрудников лаборатории электронографии за помощь.

Автор глубоко признателен:

– Татьяне Николаевне Некрасовой и Ольге Владимировне Назаровой за предоставленные образцы и реактивы;

– Филиппу Андре Буффа за плодотворное обсуждение идей, советы и критические замечания по тексту публикаций;

– Владимиру Владимировичу Волкову за помощь в проведении совместных экспериментов, беседы на тему вычислительных методов и рекомендацию ценной литературы;

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Fleuret F. et al. Comparing machines and humans on a visual categorization test // Proc. Natl. Acad. Sci. 2011. Vol. 108, № 43. P. 17621–17625.
2. Ullman S. et al. Atoms of recognition in human and computer vision // Proc. Natl. Acad. Sci. 2016. Vol. 113, № 10. P. 2744–2749.
3. Анциферова И.В. Источники поступления наночастиц в окружающую среду // Вестник ПНИПУ. 2012. P. 54–66.
4. Hench L.L., West J.K. The Sol-Gel Process // Chem. Rev. 1990. Vol. 90, № 1. P. 33–72.
5. Третьяков Ю.Д., Лукашин А.В., Елисеев А.А. Синтез функциональных нанокompозитов на основе твердофазных нанореакторов // Успехи химии. 2004. Vol. 73, № 9. P. 974–998.
6. Charkhi A., Kazemian H., Kazemeini M. Optimized experimental design for natural clinoptilolite zeolite ball milling to produce nano powders // Powder Technol. 2010. Vol. 203, № 2. P. 389–396.
7. Muñoz J.E. et al. Iron nanoparticles produced by high-energy ball milling // J. Nanoparticle Res. 2007. Vol. 9, № 5. P. 945–950.
8. He C. et al. Formation and characterization of silver nanoparticles in aqueous solution via ultrasonic irradiation // Ultrason. Sonochem. Elsevier B.V., 2014. Vol. 21, № 2. P. 542–548.
9. Sobhani A., Salavati-Niasari M. Chromium Selenide Nanoparticles: Hydrothermal Synthesis in the Presence of a New Selenium Source // Univ. Kashan. University of Kashan, 2017. Vol. 7, № 2. P. 141–146.
10. Darr J.A. et al. Continuous Hydrothermal Synthesis of Inorganic Nanoparticles: Applications and Future Directions // Chem. Rev. 2017. Vol. 117, № 17. P. 11125–11238.
11. Santhoshkumar A. et al. ZnO nanoparticles: hydrothermal synthesis and 4-nitrophenol sensing property // J. Mater. Sci. Mater. Electron. 2017. Vol. 28, № 13. P. 9272–9278.

12. Bharti D.B., Bharati A. V. Synthesis of ZnO nanoparticles using a hydrothermal method and a study its optical activity // *Luminescence*. 2017. Vol. 32, № 3. P. 317–320.
13. De G. et al. Formation of copper and silver nanometer dimension clusters in silica by the sol- gel process // *Appl. Phys. Lett.* American Institute of Physics, 1998. Vol. 68, № 26. P. 3820.
14. Cordoncillo E. et al. The Preparation of CdS Particles in Silica Glasses by a Sol-Gel Method // *J. Solid State Chem.* Academic Press, 1995. Vol. 118, № 1. P. 1–5.
15. Yusoff N. et al. Enhanced Photodegradation of Phenol by ZnO Nanoparticles Synthesized through Sol-gel Method // *Sains Malaysiana*. 2017. Vol. 46, № 12. P. 2507–2514.
16. Dubey R.S. Temperature-dependent phase transformation of TiO₂ nanoparticles synthesized by sol-gel method // *Mater. Lett.* 2018. Vol. 215. P. 312–317.
17. Chepkasov I. V., Gafner Y.Y., Gafner S.L. Synthesis of Cu nanoparticles by condensation from the gas phase // *Phase Transitions*. 2017. Vol. 90, № 6. P. 590–597.
18. Sharma G. et al. Calorimetric Measurements of Surface Energy of Amorphous HfO₂ Nanoparticles Produced by Gas Phase Condensation // *J. Phys. Chem. C*. 2017. Vol. 121, № 19. P. 10392–10397.
19. Chepkasov I. V. et al. Condensation of Cu nanoparticles from the gas phase // *Phys. Met. Metallogr.* 2016. Vol. 117, № 10. P. 1003–1012.
20. Koten M.A. et al. *In situ* measurements of plasma properties during gas-condensation of Cu nanoparticles // *J. Appl. Phys.* 2016. Vol. 119, № 11. P. 114306.
21. Henglein A., Giersig M. Formation of Colloidal Silver Nanoparticles: Capping Action of Citrate // *J. Phys. Chem. B*. 1999. Vol. 103, № 44. P. 9533–9539.
22. Shirokova L.N., Alexandrova V.A. Radiation-chemical synthesis of silver

- nanoparticles in carboxymethyl chitin // Dokl. Phys. Chem. 2015. Vol. 464, № 2. P. 234–237.
23. Biswal J. et al. Synthesis of rectangular plate like gold nanoparticles by in situ generation of seeds by combining both radiation and chemical methods // Radiation Physics and Chemistry. 2011. Vol. 80, № 1. P. 44–49.
 24. Fendler J.H. Self-Assembled Nanostructured Materials. American Chemical Society, 1996.
 25. Vaqueiro P., López-Quintela M.A., Rivas J. Synthesis of yttrium iron garnet nanoparticles via coprecipitation in microemulsion // J. Mater. Chem. Royal Society of Chemistry, 1997. Vol. 7, № 3. P. 501–504.
 26. Narayan K. Raman †, Mark T. Anderson ‡ and, C. Jeffrey Brinker* †. Template-Based Approaches to the Preparation of Amorphous, Nanoporous Silicas. American Chemical Society, 1996.
 27. Сумм Б.Д., Иванова Н.И. Объекты и методы коллоидной химии в нанохимии // Успехи химии. 2000. Vol. 69, № 11. P. 995–10008.
 28. Tong H., Li H.-L., Zhang X.-G. Ultrasonic synthesis of highly dispersed Pt nanoparticles supported on MWCNTs and their electrocatalytic activity towards methanol oxidation // Carbon N. Y. 2007. Vol. 45, № 12. P. 2424–2432.
 29. Fu G. et al. Optical study of the ultrasonic formation process of noble metal nanoparticles dispersed inside the pores of monolithic mesoporous silica // J. Phys. D. Appl. Phys. 2003. Vol. 36, № 12. P. 1382–1387.
 30. Chen W. et al. Synthesis of gold nanoparticles dispersed within pores of mesoporous silica induced by ultrasonic irradiation and its characterization // Mater. Res. Bull. 2001. Vol. 36, № 1–2. P. 335–342.
 31. Бугаенко Л.Т., Кузьмин М.Г., Полак Л.С. Химия высоких энергий / ed. Полак Л.С. Москва: Химия, 1988.
 32. Wilcoxon J.P., Williamson R.L., Baughman R. Optical properties of gold colloids formed in inverse micelles // J. Chem. Phys. 1993. Vol. 98, № June. P. 9933–9950.

33. Xu G. nian et al. Preparation and characterization of stable monodisperse silver nanoparticles via photoreduction // *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 2008. Vol. 320, № 1–3. P. 222–226.
34. Помогайло А.Д., Розенберг А.С., Уфлянд И.Е. Наночастицы металлов в полимерах / ed. Андриевский Р.А., Губин С.П. Москва: Химия, 2000.
35. Takeuchi Y., Ida T., Kimura K. Colloidal stability of gold nanoparticles in 2-propanol under laser irradiation // *J. Phys. Chem. B.* 1997. Vol. 101, № 8. P. 1322–1327.
36. Дыкман Л.А. et al. Синтез коллоидного золота с применением высокомолекулярных восстановителей // *Коллоидный журн.* 1998. Vol. 60. P. 757–762.
37. Sau T.K., Murphy C.J. Room Temperature , High-Yield Synthesis of Multiple Shapes of Gold Nanoparticles in Aqueous Solution // *Communications.* 2004. P. 9–10.
38. Patungwasa W., Hodak J.H. pH tunable morphology of the gold nanoparticles produced by citrate reduction // *Mater. Chem. Phys.* 2008. Vol. 108, № 1. P. 45–54.
39. Muangnapoh T. et al. Facile strategy for stability control of gold nanoparticles synthesized by aqueous reduction method // *Curr. Appl. Phys.* Elsevier B.V., 2010. Vol. 10, № 2. P. 708–714.
40. Prasad B.L.V. et al. Solvent-adaptable silver nanoparticles // *Langmuir.* 2005. Vol. 21, № 3. P. 822–826.
41. Guo L. et al. Thermoresponsive polymer-stabilized silver nanoparticles // *J. Colloid Interface Sci.* 2008. Vol. 319, № 1. P. 175–181.
42. Wang Y. et al. Controlled synthesis of water-dispersible faceted crystalline copper nanoparticles and their catalytic properties // *Chem. - A Eur. J.* 2010. Vol. 16, № 35. P. 10735–10743.
43. Guajardo-Pacheco M.J. et al. Synthesis of copper nanoparticles using soybeans as a chelant agent // *Mater. Lett. Elsevier B.V.*, 2010. Vol. 64, № 12. P. 1361–1364.

44. Tavares J., Swanson E.J., Coulombe S. Plasma synthesis of coated metal nanoparticles with surface properties tailored for dispersion // *Plasma Process. Polym.* 2008. Vol. 5, № 8. P. 759–769.
45. Xu Y. et al. Evolution of Nanoparticles in the Gas Phase during the Floating Chemical Vapor Deposition Synthesis of Carbon Nanotubes // *J. Phys. Chem. C.* 2018. Vol. 122, № 11. P. 6437–6446.
46. Shi G. et al. Phase-controlled growth of cubic phase CuO nanoparticles by chemical vapor deposition // *Phys. status solidi.* 2017. Vol. 214, № 10. P. 1700041.
47. Lassègue P. et al. Fluidized bed chemical vapor deposition of copper nanoparticles on multi-walled carbon nanotubes // *Surf. Coatings Technol.* 2017. Vol. 331. P. 129–136.
48. Abdelkader E.M., Jelliss P.A., Buckner S.W. Main group nanoparticle synthesis using electrical explosion of wires // *Nano-Structures & Nano-Objects.* Elsevier, 2016. Vol. 7. P. 23–31.
49. Kotov Y.A. The electrical explosion of wire: A method for the synthesis of weakly aggregated nanopowders // *Nanotechnologies Russ.* 2009. Vol. 4, № 7–8. P. 415–424.
50. Sedoi V.S., Yavorovsky N.A. Controlled synthesis of nanopowders via electrical explosion of wires // *2008 Third International Forum on Strategic Technologies.* IEEE, 2008. P. 220–225.
51. Веденеев В.И. et al. (1985) *Физическая химия. Химия* / ed. Колотыркин Я.М. Москва, 1985.
52. Tem H. et al. Visualization of Surfactants on Nanostructured Palladium Clusters by a Combination of Norbert Breuer and Roland Vogel Published by : American Association for the Advancement of Science Stable URL : <http://www.jstor.org/stable/2886242> JSTOR is a not-for-pr. 2016. Vol. 267, № 5196. P. 367–369.
53. FENDLER J.H., MELDRUM F.C. the Colloid-Chemical Approach To Nanostructured Materials // *Adv. Mater.* 1995. Vol. 7, № 7. P. 607–632.

54. Krutyakov Y.A. et al. Synthesis and properties of silver nanoparticles: advances and prospects // Russ. Chem. Rev. 2008. Vol. 77, № 3. P. 233–257.
55. Panigrahi S. et al. General method of synthesis for metal nanoparticles // J. Nanoparticle Res. 2004. Vol. 6, № 4. P. 411–414.
56. Salman S.A. et al. Synthesis and characterization of cobalt nanoparticles using hydrazine and citric acid // J. Nanotechnol. 2014. Vol. 2014.
57. Delgado J.A. et al. Fischer–Tropsch synthesis catalysed by small TiO₂ supported cobalt nanoparticles prepared by sodium borohydride reduction // Appl. Catal. A Gen. 2016. Vol. 513. P. 39–46.
58. Philip D. Synthesis and spectroscopic characterization of gold nanoparticles // Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc. 2008. Vol. 71, № 1. P. 80–85.
59. López-Serrano A. et al. Nanoparticles: a global vision. Characterization, separation, and quantification methods. Potential environmental and health impact // Anal. Methods. 2014. Vol. 6, № 1. P. 38–56.
60. Bootz A., Vogel V., Schubert D. Comparison of scanning electron microscopy, dynamic light scattering and analytical ultracentrifugation for the sizing of poly (butyl cyanoacrylate) nanoparticles. 2004. Vol. 57. P. 369–375.
61. Tuoriniemi J. et al. Intermethod comparison of the particle size distributions of colloidal silica nanoparticles // Sci. Technol. Adv. Mater. IOP Publishing, 2014. Vol. 15, № 3. P. 035009.
62. Шведченко Д.О., Суворова Е.И. Новый метод автоматического статистического анализа стабилизированных полимерами наночастиц металлов на электронно-микроскопических изображениях // Кристаллография. 2017. Vol. 62, № 5. P. 834–841.
63. Braun A. et al. A new certified reference material for size analysis of nanoparticles // J. Nanoparticle Res. 2012. Vol. 14, № 9.
64. Williams D.B., Carter C.B. Transmission Electron Microscopy // Transmission Electron Microscopy. 2009. 3-22 p.

65. Binnig G., Quate C.F. Atomic Force Microscope // *Phys. Rev. Lett.* 1986. Vol. 56, № 9. P. 930–933.
66. Синицына О., Мешков Г., Яминский И. Определение формы острия зонда в атомно-силовой микроскопии // *Контроль и измерения.* 2013. Vol. 5, № 43. P. 52–61.
67. Klapetek P. et al. Atomic force microscopy analysis of nanoparticles in non-ideal conditions // *Nanoscale Res. Lett.* 2011. Vol. 6, № 1. P. 514.
68. Lapshin R. V. Automatic drift elimination in probe microscope images based on techniques of counter-scanning and topography feature recognition // *Meas. Sci. Technol.* IOP Publishing, 2007. Vol. 18, № 3. P. 907–927.
69. Lapshin R. V. Feature-oriented scanning methodology for probe microscopy and nanotechnology // *Nanotechnology.* 2004. Vol. 15, № 9. P. 1135–1151.
70. Yurov V.Y., Klimov A.N. Scanning tunneling microscope calibration and reconstruction of real image: Drift and slope elimination // *Rev. Sci. Instrum.* 1994. Vol. 65, № 5. P. 1551–1557.
71. Свергун Д.И., Фейгин Л.А. Рентгеновское и нейтронное малоугловое рассеяние. Москва: Наука, 1986.
72. Ballauff M. SAXS and SANS studies of polymer colloids // *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 2001. Vol. 6, № 2. P. 132–139.
73. Putnam D.K., Lowe E.W., Meiler J. Reconstruction of Saxs Profiles From Protein Structures // *Comput. Struct. Biotechnol. J. Research Network of Computational and Structural Biotechnology,* 2013. Vol. 8, № 11. P. e201308006.
74. Свергун Д.И. et al. Рентгеновское малоугловое рассеяние, синхротронное излучение и структура био- и наносистем. // *Кристаллография.* 2011. Vol. 56, № 5. P. 847–875.
75. 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 // *Nanosyst. Physics, Chem. Math.* 2017. Vol. 8, № 4. P. 512–522.

76. Jackson A.J. Introduction to Small-Angle Neutron Scattering and Neutron Reflectometry [Electronic resource] // NIST Center for Neutron Research. 2008. № May. P. 1–24. URL:
https://www.ncnr.nist.gov/summerschool/ss10/pdf/SANS_NR_Intro.pdf.
77. Patterson A.L. The scherrer formula for X-ray particle size determination // Phys. Rev. 1939. Vol. 56, № 10. P. 978–982.
78. Радченко И.В. Рентгенографическое определение размеров частиц // Успехи физических наук. 1939. Vol. 22. P. 442–448.
79. Ewald P.P. X-ray diffraction by finite and imperfect crystal lattices // Proc. Phys. Soc. 1940. Vol. 52. P. 167–174.
80. Пушаровский Д.Ю. Рентгенография минералов. Москва: ЗАО “ГеоинфоМарк,” 2000.
81. Kwon S.Y. et al. Uncertainty analysis of measurements of the size of nanoparticles in aqueous solutions using dynamic light scattering // Metrologia. 2011. Vol. 48, № 5. P. 417–425.
82. Nicolai T., Brown W. Cooperative Diffusion of Concentrated Polymer Solutions: A Static and Dynamic Light Scattering Study of Polystyrene in DOP // Macromolecules. American Chemical Society, 1996. Vol. 29, № 5. P. 1698–1704.
83. Pecora R. Dynamic Light Scattering Measurement of Nanometer Particles in Liquids // J. Nanoparticle Res. Kluwer Academic Publishers, 2000. Vol. 2, № 2. P. 123–131.
84. Pristinski D., Chastek T.Q. A versatile, low-cost approach to dynamic light scattering // Meas. Sci. Technol. IOP Publishing, 2009. Vol. 20, № 4. P. 045705.
85. Takahashi K. et al. Precise Measurement of the Size of Nanoparticles by Dynamic Light Scattering with Uncertainty Analysis // Part. Part. Syst. Charact. WILEY-VCH Verlag, 2008. Vol. 25, № 1. P. 31–38.
86. Yang H., Zheng G., Li M. A Discussion of Noise in Dynamic Light

- Scattering for Particle Sizing // Part. Part. Syst. Charact. WILEY-VCH Verlag, 2008. Vol. 25, № 5–6. P. 406–413.
87. Dukhin A. et al. Particle sizing and zeta potential of silica koestrosol (Basis for certified reference material ERM-FD100 for nanoparticles) by acoustics and electroacoustics // Part. Part. Syst. Charact. 2010. Vol. 27, № 5–6. P. 165–171.
 88. Gibson R.L., Toksoz M.N. Viscous attenuation of acoustic waves in suspensions // J. Acoust. Soc. Am. 1989. Vol. 85, № 5. P. 1925–1934.
 89. Povey M.J.W. Ultrasound particle sizing: A review // Particuology. 2013. Vol. 11, № 2. P. 135–147.
 90. Chen D.-R. et al. Design and evaluation of a nanometer aerosol differential mobility analyzer (Nano-DMA) // J. Aerosol Sci. Elsevier Limited, 1998. Vol. 29, № 5–6. P. 497–509.
 91. Knutson E.O., Whitby K.T. Aerosol classification by electric mobility: apparatus, theory, and applications // J. Aerosol Sci. 1975. Vol. 6, № 6. P. 443–451.
 92. Brunelli N.A., Flagan R.C., Giapis K.P. Radial Differential Mobility Analyzer for One Nanometer Particle Classification. 2009. № 1995. P. 53–59.
 93. Wang S.C., Flagan R.C. Scanning Electrical Mobility Spectrometer // Aerosol Sci. Technol. Taylor & Francis Group, 1990. Vol. 13, № 2. P. 230–240.
 94. Wiedensohler A. An approximation of the bipolar charge distribution for particles in the submicron size range // J. Aerosol Sci. Pergamon, 1988. Vol. 19, № 3. P. 387–389.
 95. Thornton M.J. The application of the Coulter counter to problems in the size analysis of insoluble drugs // J. Pharm. Pharmacol. 1963. Vol. 15, № 11. P. 742–752.
 96. DeBlois R.W., Bean C.P. Counting and sizing of submicron particles by the

- resistive pulse technique // *Rev. Sci. Instrum.* 1970. Vol. 41, № 7. P. 909–916.
97. Graham M.D. The Coulter Principle: Foundation of an industry // *JALA - J. Assoc. Lab. Autom.* 2003. Vol. 8, № 6. P. 72–81.
98. Princen L.H., Kwolek W.F. Coincidence Corrections for Particle Size Determinations with the Coulter Counter // *Rev. Sci. Instrum.* 1965. Vol. 36. P. 646–653.
99. Wales M., Wilson J.N. Theory of Coincidence in Coulter Particle Counters // *Rev. Sci. Instrum.* 1961. Vol. 32, № 10. P. 1132–1136.
100. Carr B., Wright M. Nanoparticle Tracking Analysis // *Innov. Pharm. Technol.* 2012. Vol. 44, № 26. P. 38–40.
101. Malloy A., Carr B. Nanoparticle tracking analysis - The halo system // *Part. Part. Syst. Charact.* 2006. Vol. 23, № 2. P. 197–204.
102. Yguerabide J., Yguerabide E.E. Light-Scattering Submmicroscopic Particles as Highly Fluorescent Analogs and their Use as Tracer Labels in Clinical and Biological Applications - Experimental Characterization // *Anal. Biochem.* 1998. Vol. 262, № 2. P. 137–156.
103. Brown S.C. et al. Toward advancing nano-object count metrology: A best practice framework // *Environ. Health Perspect.* 2013. Vol. 121, № 11–12. P. 1282–1291.
104. Filipe V., Hawe A., Jiskoot W. Critical evaluation of nanoparticle tracking analysis (NTA) by NanoSight for the measurement of nanoparticles and protein aggregates // *Pharm. Res.* 2010. Vol. 27, № 5. P. 796–810.
105. De Temmerman P.J. et al. Size measurement uncertainties of near-monodisperse, near-spherical nanoparticles using transmission electron microscopy and particle-tracking analysis // *J. Nanoparticle Res.* 2014. Vol. 16, № 10.
106. Gallego-Urrea J.A. et al. Measurements of nanoparticle number concentrations and size distributions in contrasting aquatic environments using nanoparticle tracking analysis // *Environ. Chem.* 2010. Vol. 7, № 1. P.

- 67–81.
107. Cölfen H. Analytical ultracentrifugation // *Macromol. Biosci.* 2010. Vol. 10, № 7. P. 687–688.
 108. Cole J.L. et al. Analytical Ultracentrifugation: Sedimentation Velocity and Sedimentation Equilibrium // *Methods Cell Biol.* 2008. Vol. 84, № 07. P. 143–179.
 109. Laue T.M., Stafford W.F., Stafford III W.F. Modern applications of analytical ultracentrifugation. // *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 1999. Vol. 28. P. 75–100.
 110. Planken K.L., Cölfen H. Analytical ultracentrifugation of colloids // *Nanoscale.* 2010. Vol. 2, № 10. P. 1849.
 111. Lechner M.D. Influence of Mie scattering on nanoparticles with different particle sizes and shapes: Photometry and analytical ultracentrifugation with absorption optics // *J. Serb. Chem. Soc.* 2005. Vol. 70, № 3. P. 361–369.
 112. Вайнштейн Б.К. Структурная электронография. Москва: Издательство Академии Наук СССР, 1956.
 113. Treacy M.M.J., Howie A. Contrast Effects in the Transmission Electron-Microscopy of Supported Crystalline Catalyst Particles // *J. Catal.* 1980. Vol. 63, № 1. P. 265–269.
 114. Хирш П., Хови А., Николсон Р. Электронная микроскопия тонких кристаллов. Москва: Мир, 1968.
 115. Pennycook S.J. Z-Contrast Transmission Electron Microscopy: Direct Atomic Imaging of Materials // *Annu. Rev. Mater. Sci. Annual Reviews* 4139 El Camino Way, P.O. Box 10139, Palo Alto, CA 94303-0139, USA, 1992. Vol. 22, № 1. P. 171–195.
 116. Wall J. et al. Scanning transmission electron microscopy at high resolution // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1974. Vol. 71, № 1. P. 1–5.
 117. Crewe A.V., Wall J., Langmore J. Visibility of single atoms // *Science* (80-). 1970. Vol. 168, № 3937. P. 1338–1340.
 118. Pennycook S.J. Z-contrast stem for materials science // *Ultramicroscopy.*

1989. Vol. 30, № 1–2. P. 58–69.
119. Pennycook S.J., Jesson D.E. High-resolution incoherent imaging of crystals // Phys. Rev. Lett. 1990. Vol. 64, № 8. P. 938–941.
120. Pennycook S.J., Jesson D.E. High-resolution Z-contrast imaging of crystals // Ultramicroscopy. 1991. Vol. 37, № 1–4. P. 14–38.
121. Pennycook S.J., Nellist P.D. Z-contrast scanning transmission electron microscopy // Impact Electron Scanning Probe Microsc. Mater. Res. 1999. P. p161-208.
122. Molina S.I. et al. Column-by-column compositional mapping by Z-contrast imaging // Ultramicroscopy. 2009. Vol. 109, № 2. P. 172–176.
123. Flynn C., Turner S. of the Transmission of Supported for Characterization. 1974. Vol. 248. P. 233–248.
124. Hall C., Hines R. Electron microscope contrast of small atom clusters // Philos. Mag. 1970. Vol. 8086, № August. P. 37–41.
125. 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.
126. Otsu N. A Threshold Selection Method from Gray-Level Histograms // IEEE Trans. Syst. Man. Cybern. 1979. Vol. 9, № 1. P. 62–66.
127. Roseman A.M. Particle finding in electron micrographs using a fast local correlation algorithm // Ultramicroscopy. 2003. Vol. 94, № 3–4. P. 225–236.
128. Fisker R. et al. Estimation of Nanoparticle Size Distributions by Image Analysis // J. Nanoparticle Res. 2000. Vol. 2, № 3. P. 267–277.
129. Mondini S. et al. Pebbles and PebbleJuggler: software for accurate, unbiased, and fast measurement and analysis of nanoparticle morphology from transmission electron microscopy (TEM) micrographs // Nanoscale. 2012. Vol. 4, № 17. P. 5356.
130. Ballard D.H. Generalizing the Hough transform to detect arbitrary shapes // Pattern Recognit. 1981. Vol. 13, № 2. P. 111–122.
131. Yuen H. et al. Comparative study of Hough Transform methods for circle

- finding // *Image Vis. Comput.* 1990. Vol. 8, № 1. P. 71–77.
132. Stadelmann P. JEMS [Electronic resource] // Stadelmann, P. (2017). Java Electron Microscopy Software (JEMS), demo-(student) version. Available at. URL: <http://www.jems-saas.ch>.
133. Sternberg S.R. *Biomedical Image Processing // Computer* (Long. Beach. Calif). 1983. Vol. 16, № 1. P. 22–34.
134. Schneider C.A., Rasband W.S., Eliceiri K.W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis // *Nat. Methods*. Nature Publishing Group, 2012. Vol. 9, № 7. P. 671–675.
135. Schindelin J. et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis // *Nat. Methods*. 2012. Vol. 9, № 7. P. 676–682.
136. Nelder J.A., Mead R. A Simplex Method for Function Minimization // *Comput. J.* 1965. Vol. 7, № 4. P. 308–313.
137. Рыжиков Ю.И. *Вычислительные методы*. БХВ-Петерб. Санкт-Петербург, 2007.
138. 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.
139. 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.
140. 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.
141. You J.O., Auguste D.T. Feedback-regulated paclitaxel delivery based on poly(N,N-dimethylaminoethyl methacrylate-co-2-hydroxyethyl methacrylate) nanoparticles // *Biomaterials*. 2008. Vol. 29, № 12. P. 1950–1957.
142. Andreeva L.N. et al. Conformation properties of poly(N,N-dimethylaminoethyl methacrylate) macromolecules in various solvents //

- Russ. J. Appl. Chem. 2012. Vol. 85, № 3. P. 417–425.
143. Andreeva L.N. et al. Conformational and dynamic characteristics of copolymers of N,N-dimethylaminoethyl methacrylate and 2-deoxy-2-methacrylamido-D-glucose // Polym. Sci. Ser. A. 2014. Vol. 56, № 4. P. 405–413.
 144. Cortez-Lemus N.A., Licea-Claverie A. RAFT synthesis of poly(2-dimethylaminoethyl methacrylate) three-arm star polymers for the preparation of gold nanoparticles // Polym. Bull. 2014. Vol. 71, № 7. P. 1757–1772.
 145. Yasuda H. et al. Ultrathin coating by plasma polymerization applied to corneal contact lens // J. Biomed. Mater. Res. 1975. Vol. 9, № 6. P. 629–643.
 146. 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.
 147. Nazarova O. V. et al. Copolymers of 2-Deoxy-2-Methacrylamido-D-Glucose with Aminoacrylates and Allylamine Hydrochloride // J. Carbohydr. Chem. 2009. Vol. 28, № 1. P. 39–52.
 148. Darroudi M. et al. Effect of accelerator in green synthesis of silver nanoparticles // Int. J. Mol. Sci. 2010. Vol. 11, № 10. P. 3898–3905.
 149. 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.
 150. Lima F.H.B., Sanches C.D., Ticianelli E.A. Physical Characterization and Electrochemical Activity of Bimetallic Platinum-Silver Particles for Oxygen Reduction in Alkaline Electrolyte // J. Electrochem. Soc. 2005. Vol. 152, № 7. P. A1466.
 151. Martinez-Castanon G.A. et al. Synthesis and antibacterial activity of silver nanoparticles with different sizes // J. Nanoparticle Res. 2008. Vol. 10, № 8. P. 1343–1348.

152. Wu C. et al. Reducing Ability and Mechanism for Polyvinylpyrrolidone (PVP) in Silver Nanoparticles Synthesis // *J. Nanosci. Nanotechnol.* 2010. Vol. 10, № 4. P. 2342–2347.
153. Voronov A. et al. Mechanism of silver ion reduction in concentrated solutions of amphiphilic invertible polyesters in nonpolar solvent at room temperature // *Langmuir.* 2008. Vol. 24, № 21. P. 12587–12594.
154. Khan Z. et al. Kinetics of silver nanoparticle growth in aqueous polymer solutions. 1st Nano Update. // *Arab. J. Chem.* King Saud University, 2012. Vol. 5, № 4. P. 453–459.
155. Wang H. et al. Mechanisms of PVP in the preparation of silver nanoparticles // *Mater. Chem. Phys.* 2005. Vol. 94, № 2–3. P. 449–453.
156. Donati I. et al. Polyol synthesis of silver nanoparticles: Mechanism of reduction by alditol bearing polysaccharides // *Biomacromolecules.* 2009. Vol. 10, № 2. P. 210–213.
157. Nekrasova T.N. et al. Optical and hydrodynamic properties of solutions of copolymers of N,N-dimethylaminoethyl methacrylate and 2-deoxy-2-methacrylamido-D-glucose that contain silver particles // *Polym. Sci. Ser. A.* 2015. Vol. 57, № 2. P. 103–114.
158. Копейкин В.В. et al. Синтез наночастиц селена в водных растворах поливинилпирролидона и морфологические характеристики образующихся нанокомпозитов // *Высокомолекулярные соединения. серия А.* 2003. Vol. 45, № 4. P. 615–622.
159. Konarev P. V et al. PRIMUS : a Windows PC-based system for small-angle scattering data analysis PRIMUS : a Windows PC-based system for small-angle scattering data analysis // *Primus.* 2003. Vol. 36. P. 1277–1282.
160. Shvedchenko D.O. et al. Mechanism of formation of silver nanoparticles in MAG–DMAEMA copolymer aqueous solutions // *J. Nanoparticle Res.* Springer Netherlands, 2015. Vol. 17, № 6. P. 275.