

ПОЛИМЕРНЫЕ, БИООРГАНИЧЕСКИЕ И ГИБРИДНЫЕ НАНОМАТЕРИАЛЫ

УДК 544.77+537.9+537.533

ИССЛЕДОВАНИЕ 3D-СТРУКТУРЫ ГИДРОГЕЛЯ С НАНОЧАСТИЦАМИ ЗОЛОТА МЕТОДОМ КРИОГЕННОЙ ЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ

© 2022 г. А. А. Михуткин^{1,*}, Р. А. Камышинский^{1,2}, Н. М. Кузнецов¹,
П. В. Лебедев-Степанов^{2,3}, А. С. Степко², А. Л. Васильев^{1,2,**}

¹ Национальный исследовательский центр “Курчатовский институт”, Москва, Россия

² Институт кристаллографии им. А.В. Шубникова ФНИЦ “Кристаллография и фотоника” РАН, Москва, Россия

³ Национальный исследовательский ядерный университет МИФИ, Москва, Россия

*E-mail: alex.mikhutkin@gmail.com

**E-mail: a.vasiliev56@gmail.com

Поступила в редакцию 30.11.2021 г.

После доработки 24.02.2022 г.

Принята к публикации 26.02.2022 г.

Методом дегидратации из раствора (переход “золь-гель”) получен гидрогель с наночастицами золота, стабилизированными в цитратном буфере. Морфологические характеристики гидрогеля исследованы методами криогенной просвечивающей электронной микроскопии, в частности “крио-электронной томографии”. Изучена пространственная структура гидрогеля в трех измерениях. Определены размерные параметры наночастиц, расстояния до ближайших соседей. Выявлено, что большинство наночастиц находится в связанном состоянии, в процессе формирования гидрогеля образуют кластеры.

DOI: 10.56304/S1992722322030116

ВВЕДЕНИЕ

Исследования в области функциональных материалов и устройств, сформированных на основе упорядоченных микро- и наноструктурированных покрытий, продолжают расширяться в виду их необычайно широкого потенциала практического применения. Одним из перспективных направлений является создание однородных упорядоченных слоев наночастиц (НЧ) различной природы. Так, покрытия на основе углерода и металлических НЧ на подложках с атомным упорядочением находят применение в электронно-вакуумной технике [1]. Ранее было показано, что работа выхода электрона с поверхности НЧ может быть на порядок меньше по сравнению с макроповерхностью [2, 3].

НЧ золота обладают набором уникальных свойств, таких как размерные электронные, магнитные и оптические свойства (квантовый размерный эффект), и этим привлекают внимание исследователей из различных областей. За счет простоты получения и контроля размеров частиц, а также стабильности растворов НЧ Au находят применение в нанотехнологиях, катализе, биологии, в создании различных материалов, например полимерных нанокомпозитов и др. [4]. При формировании покрытий важно контролировать распределение НЧ на поверхности подложки. Од-

ним из эффективных способов получения таких покрытий является метод нанесения тонких пленок из растворов методом центрифугирования (*spin-coating*) [5]. С точки зрения получения требуемой микро- и наноструктуры немаловажным фактором в процессе формирования покрытия становятся реологические свойства раствора, определяемые не только концентрацией и природой коллоидных частиц, но и присутствием стабилизирующих добавок, поверхностно-активных веществ (ПАВ), а также процессами агломерации НЧ.

Определение морфологических параметров дисперсных систем имеет первостепенное значение, поскольку именно они определяют многие физические и химические свойства и, как следствие, области применения. В исследовательской практике микроскопические методы исследования получили самое широкое распространение. Большое разнообразие современных типов микроскопов – оптических, электронных, зондовых – позволяет с высокой точностью определять размеры частиц в широком размерном диапазоне, описывать морфологию, исследовать структуру и строение. Классические методы просвечивающей электронной и атомно-силовой микроскопии (ПЭМ и АСМ соответственно) позволяют установить структуру сухих пленок, состоящих из

НЧ, но не дают информации о трехмерной структурной организации частиц в растворе. Отдельные попытки установить структурные параметры по косвенным данным предпринимались ранее. Так, в [6] проведены экспериментальные исследования влияния режима осаждения на размер НЧ Au и их агрегатов, полученных методом конденсации в нейтральной жидкости, с помощью измерений диаметров Ферета по ПЭМ-изображениям. Однако, судя по всему, при анализе не разделяли отдельные НЧ и агрегаты, а среднее число НЧ в агрегате оценивали косвенно, исходя из предположения пропорциональности диаметра Ферета числу частиц, что для других методов осаждения НЧ может быть неверно. Поэтому необходимо исследовать структурную организацию НЧ в растворе не только по косвенным данным — а именно по характеристикам, полученным от изготовителя, или на основании микроскопических исследований сформированных пленок. Безусловно, наиболее полную информацию можно получить только напрямую — путем анализа микроструктуры гидрогеля.

К современным методам исследования нативной структуры в растворе относятся методы статического и динамического рассеяния света, а также малоуглового рентгеновского рассеяния (МУРР). Методы рассеяния света дают информацию о среднем гидродинамическом размере кластеров в растворе, но не позволяют детально исследовать их структуру. Метод МУРР хорошо зарекомендовал себя при исследовании объектов различной природы, например самоорганизации полимерных и белковых молекул в растворе [7], а также углеродных наноструктур — наноалмазов детонационного синтеза [8, 9]. На основании данных МУРР с помощью моделирования можно восстановить форму частиц и, зная химическое строение молекул, соотнести ее с “тонкой” структурой или конформацией [10]. Тем не менее рассматриваемые методы имеют ограничения и зачастую не могут корректно учесть анизометрию (отклонение от сферической формы) частиц. Метод МУРР ограничен размером исследуемых структур и удобен при анализе нанообъектов. Кроме того, метод чувствителен к полидисперсности частиц и при низкой концентрации исследуемых растворов требует высокого рентгеновского контраста и интенсивности источника излучения [11]. Таким образом, задача определения микроструктуры гидрогеля путем визуализации НЧ в жидкой фазе остается крайне актуальной.

Криогенная просвечивающая электронная микроскопия (крио-ПЭМ) является уникальным структурным методом, позволяющим исследовать нативную структуру белковых объектов в растворе. Метод заключается в быстрой заморозке образца с помощью жидкого этана и последующей визуализации макромолекул в криогенном

просвечивающем электронном микроскопе (Крио-ПЭМ) [12]. Особенность процедуры пробоподготовки заключается в быстрой скорости охлаждения образца, достаточной для образования аморфного льда, что, с одной стороны, не вызывает нарушения структуры макромолекул, а с другой, не формирует дифракционный контраст от кристаллов льда, “затмевающий” изображения макромолекул. Несмотря на то что метод широко применяется для анализа нативной структуры биологических объектов, исследования свойств растворов неорганических НЧ криогенными методами в научной печати являются единичными [13, 14]. Вместе с тем такие исследования позволили бы установить истинную структуру коллоидных растворов, в том числе включающих в себя сложные добавки и буферы, служащие для стабилизации и предотвращения коагуляции. Часто концентрация НЧ в гидрогелях достаточно мала, а малая концентрация существенно затрудняет определение трехмерных микроструктурных параметров образцов. Поэтому концентрацию НЧ в работе увеличили, в результате получили высококонцентрированный образец — гидрогель, исследование которого не только обеспечило необходимую статистику, но и позволило изучить процессы кластеризации в подобных системах, развернув предлагаемую методику обработки и анализа в полной мере. В данной работе метод крио-ПЭМ, в частности криоэлектронной томографии (крио-ЭТ), применен для анализа трехмерной структурной организации гидрогеля НЧ золота.

ПРИБОРЫ, МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования выбран стабилизированный гидрозоль НЧ Au в цитратном буфере (Sigma Aldrich, США). Заявленный производителем размер частиц (*core size*) составляет 4–7 нм при среднем гидродинамическом диаметре 14–25 нм. Содержание частиц в растворе составляло $(4.92–6.01) \times 10^{13}$ шт. в мл, что соответствует концентрации ~0.01 мас. % (принимая плотность золота 19.32 г/мл).

ПЭМ гидрозоля. Для ПЭМ-исследований гидрозоль наносили на медные сетки, покрытые углеродной пленкой (Lacey), после чего исследовали в микроскопе Osiris (Thermo Fisher Scientific, США). Исследования гидрозоля методом ПЭМ показали низкую концентрацию НЧ Au в растворе, которая не позволяет провести достоверные микроструктурные оценки методом крио-ПЭМ. Для получения образца гидрогеля с большей концентрацией НЧ, позволяющей провести обработку изображений с целью восстановления 3D-микроструктуры объекта, были проведены следующие действия.

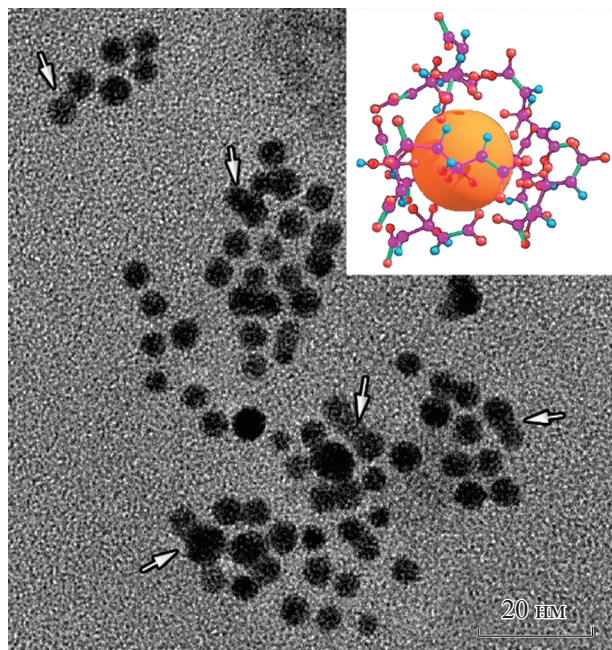


Рис. 1. Светлопольное ПЭМ-изображение частиц, осажденных на сетку из гидрозоля; на вставке – схематическое изображение наночастицы Au в окружении цитратной оболочки. Стрелками показаны “слипшиеся” наночастицы.

Подготовка образца гидрогеля для крио-ПЭМ. Для получения более высокой концентрации НЧ Au 1 мл раствора выпаривали при температуре 85°C в течение 2 ч до получения гидрогеля. Полученный коллоидный раствор использовали для дальнейшего анализа методом крио-ПЭМ. С помощью микропипетки 3 мкл раствора НЧ Au в цитратном буфере наносили на медную сетку, покрытую ультратонким сплошным слоем аморфного углерода. Далее с помощью автоматизированной системы Vitrobot Mark IV (Thermo Fisher Scientific, США) сетку с нанесенным образцом в течение 2.5 с подвергали одновременному двустороннему сжатию фильтровальной бумагой для удаления излишков жидкости, после чего образцы гидрогеля витрифицировали – замораживали быстрым погружением сетки в жидкий этан, предварительно охлажденный до температуры жидкого азота. В процессе эксперимента влажность в камере системы Vitrobot Mark IV составляла 95–100%, температура – 4°C.

Криогенная просвечивающая электронная микроскопия. Исследование проводили в Крио-ПЭМ Titan Krios 60-300 TEM/STEM (Thermo Fisher Scientific, США), оснащенный высокочувствительным детектором электронов Falcon II (Thermo Fisher Scientific, США) и корректором сферических aberrаций (Image corrector, CEOS, Германия), при ускоряющем напряжении 300 кВ. Изображения получены с помощью программно-

го обеспечения EPU (Thermo Fisher Scientific, США) в режиме малых доз, что позволило минимизировать радиационные повреждения.

Экспериментальные данные крио-ЭТ получали с использованием программного обеспечения Tomography (Thermo Fisher Scientific, США) при увеличении $\times 18000$ (размер пикселя 3.7 Å) и дефокусировке – 6 мкм. Томографическая серия, состоящая из 61 изображения, получена при наклоне образца от -60° до 60° с угловым шагом в 2° . Суммарное значение дозы электронов, прошедших через единицу площади образца за время экспозиции, не превышало ~ 100 э/Å².

Обработка экспериментальных данных крио-ЭТ. На первом этапе проводили преобразование угловой серии исходных двумерных изображений в реконструированный 3D-массив (стек томограмм) с использованием программного обеспечения Inspect3D (Thermo Fisher Scientific, США). Для исправления нежелательных сдвигов, возникающих в процессе получения экспериментальных данных, проводили выравнивание стека (Stack Alignment) путем кросс-корреляционного сопоставления изображений, предварительно подвергнутых специальной обработке и фильтрации (растяжение изображений пропорционально углу наклона, фильтры низких и высоких частот, окно Ханнинга, краевое сглаживание) для улучшения точности обнаружения положения кросс-корреляционного пика, далее проводили коррекцию оси наклона. Томографическое восстановление данных осуществляли методом одновременной итерационной реконструкции (SIRT, Simultaneous Iterative Reconstruction Technique) в 100 итераций.

Дальнейшую обработку томографического стека (размер $188 \times 202 \times 116$ нм) проводили в программном пакете Avizo (Thermo Fisher Scientific, США). Был получен массив бинарных данных, на основе которого генерировали поверхностную модель исследуемых частиц и вычисляли следующие параметры:

– V – объем частицы;

– D_{Eq} – эквивалентный диаметр. Используется для корректной оценки размеров частиц, имеющих неправильную форму. В трехмерном случае эквивалентным диаметром является диаметр сферы того же объема:

$$D_{Eq} = \sqrt[3]{\frac{6V}{\pi}};$$

– NC – количество соседних частиц. Число объектов, расположенных на расстоянии, равном среднему эквивалентному радиусу частицы;

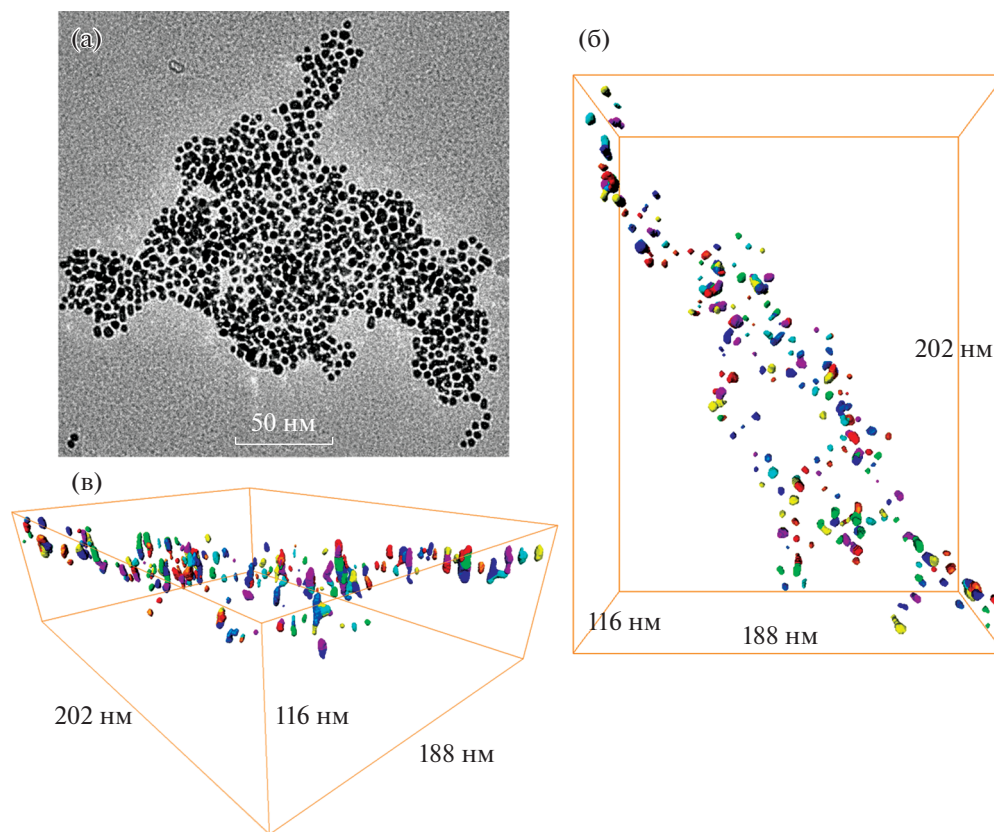


Рис. 2. Крио-ПЭМ-изображение наночастиц Au, полученное без наклона держателя образца (а); 3D-реконструкция наночастиц золота в гидрогеле по данным крио-ЭТ в разных проекциях (б, в).

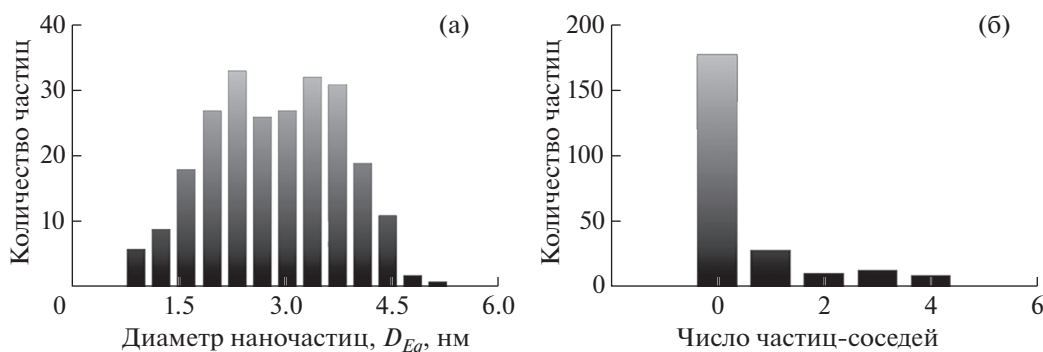


Рис. 3. Гистограммы распределения частиц по размерам (D_{Eq}) (а) и количества соседей у каждой частицы на расстоянии среднего эквивалентного радиуса частицы – 1.5 нм от ее границы (NC) (б).

– при варьировании задаваемого расстояния позволяет оценить разброс расстояний между соседними частицами $Dist$;

– PC – количество частиц в кластере;

– R_V – соотношение объема отдельных частиц к объему кластеров.

Параметры V , D_{Eq} , NC , а также $Dist$ оценивали разделением кластеров на массив отдельных частиц. Параметры PC , R_V , а также $Dist$ и V подсчитывали

исходя из предположения наличия в образце двух классов объектов – кластеров и отдельных частиц. Разделение осуществляли автоматизированным способом путем анализа формы объектов (т.е. по коэффициенту формы, служащему мерой сферичности объектов, исходя из предположения, что форма кластеров обычно заметно отличается от сферической). Более подробно методика анализа будет представлена отдельно.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Образец гидрозоля был исследован ранее методами динамического рассеяния света, спектрофотометрии, ротационной вискозиметрии, АСМ и ПЭМ [15]. В гидрозоле частицы золота стабилизированы в цитратном буфере и за счет присутствия ПАВ и низкой концентрации существуют преимущественно в виде индивидуальных частиц (рис. 1, вставка). Но при высушивании на электронно-микроскопической сетке может происходить “слипание”, которое наблюдается на ПЭМ-изображениях (рис. 1). Безусловно, такое “слипание” препятствует анализу морфологических параметров частиц. Тем не менее ПЭМ-исследования гидрозоля показали, что распределение по размерам несколько шире заявленного производителем и находится в пределах 2.5–8 нм (без учета “слипшихся” частиц).

При выпаривании воды из гидрозоля происходит коагуляция НЧ, и наблюдается образование гидрогеля. Проведенные исследования показали изменения, произошедшие в процессе формирования гидрогеля.

На рис. 2а представлено Криво-ПЭМ-изображение НЧ Au, полученное без наклона держателя образца. Другие изображения уже с разным углом наклона использовали для 3D-реконструкции фрагмента гидрогеля. Результаты реконструкции в виде двух проекций 3D-модели приведены на рис. 2б, 2в. Обработка данных крио-ЭТ показала, что в гидрогеле присутствуют как индивидуальные НЧ Au, так и кластеры, состоящие из “слипшихся” частиц. При обработке результатов разделение на индивидуальные НЧ и кластеры провели на основании анализа морфологии частиц. Индивидуальные частицы, как правило, имели округлую форму, а морфология кластеров значительно отличалась от сферической. Предполагается, что двойникование, типичное для НЧ Au, не вызывает отклонений морфологии от округлой. Обработка результатов 3D-реконструкции показала, что эквивалентный диаметр разделенных частиц лежит в пределах до 5 нм (рис. 3, табл. 1). Наличие частиц размером до 2 нм в распределении по эквивалентным диаметрам связано с некоторым ухудшением пространственного разрешения при реконструкции, прежде всего при сегментировании и бинаризации, связанной с дифракционным контрастом от кристаллических НЧ Au с двойниками и разно ориентированными доменами, делящими частицы по контрасту, поэтому в настоящем исследовании искусственно ограничили размер частиц диаметром 2 нм.

Гистограмма, представленная на рис. 3а, показывает, что распределение частиц по размерам бимодально. Средний эквивалентный диаметр частиц составил 3 нм. Этот результат близок к расчетам, проведенным по двумерным ПЭМ-изображениям.

Таблица 1. Морфологические параметры наночастиц золота в гидрогеле

Параметры	Среднее	Минимум	Максимум	Медиана
D_{Eq} , нм	3.0	1.0	5.5	3.1
V , нм ³	18.8	0.4	87.3	15.7
NC	1.0	0.0	5.0	0.6

Метод 3D-реконструкции позволил оценить параметры ближнего порядка, а именно количество частиц на расстоянии среднего эквивалентного радиуса от границы (т.е. 1.5 нм). Оказалось,

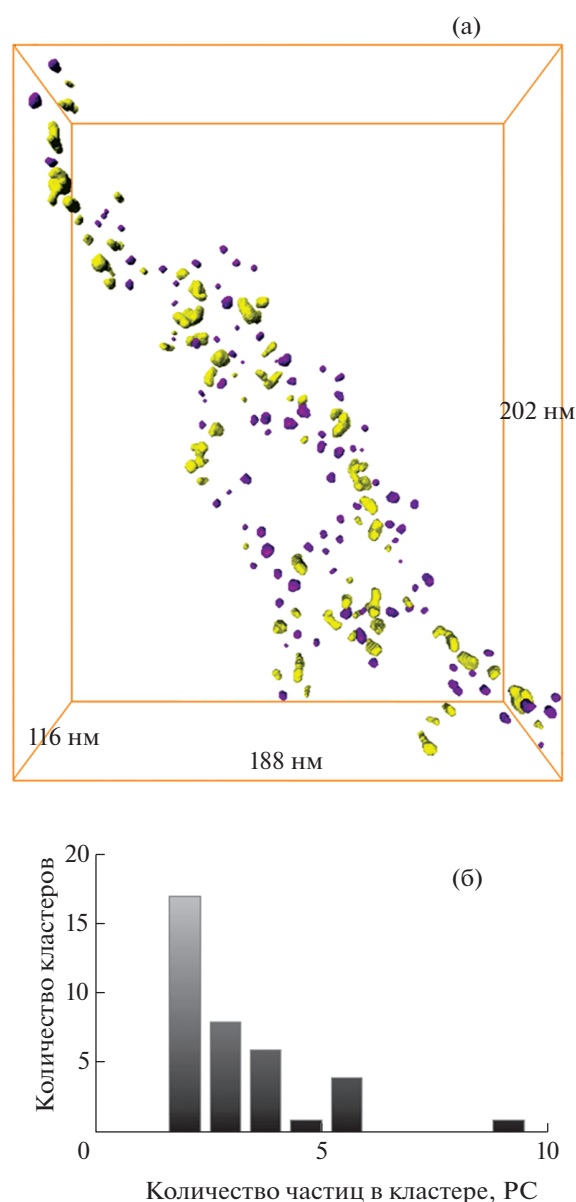


Рис. 4. Анализ структурной организации отдельных частиц и кластеров: а – 3D-реконструкция (отдельные частицы и кластеры показаны разным тоном); б – гистограмма распределения количества частиц в кластере (PC).

что разброс количества частиц составляет от 0 до 5 (рис. 3б, табл. 1). Максимальное расстояние между соседними частицами – 8.4 нм. Отметим, что число соседних частиц при аналогичных расчетах по двумерным Крио-ПЭМ-изображениям существенно больше, что говорит о заметном искажении результатов при оценке по 2D-проекции.

Как отмечалось выше, с помощью критерия формы наряду с индивидуальными частицами были выделены кластеры (рис. 4а). Число частиц в кластере PC изменяется в пределах от 2 до 10 (рис. 4б), объем отдельных частиц – 23%, остальной объем (77%) занимают кластеры (соотношение объема отдельных частиц к объему кластеров $R_V = 0.29$). Таким образом, в процессе формирования гидрогеля произошло “слипание” индивидуальных НЧ золота с формированием кластеров. При рассмотрении отдельных частиц и кластеров (последние без разделения на составляющие частицы) соседние частицы наблюдаются на минимальном расстоянии 1.9 нм, превышающем средний эквивалентный радиус частицы, равный 1.5 нм. Таким образом, расстояния между соседними частицами/кластерами лежат в пределах от 1.9 до 8.4 нм.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Применение методов крио-ПЭМ, в частности крио-ЭТ с последующей 3D-реконструкцией образца, позволило определить морфологические параметры гидрогеля. Установлено, что распределение размеров отдельных НЧ золота бимодально и находится в пределах 2–5.5 нм в терминологии эквивалентных диаметров. Средний размер частиц ~3 нм. Также определены объемы частиц и расстояния до соседей. Расстояние между частицами, кластерами частиц составляет от 1.9 до 8.4 нм, что, как правило, превышает сумму их радиусов, что косвенно указывает на наличие связующих звеньев, состоящих из цитратного буфера, ПАВ и растворителя, поэтому исследуемая система имеет нанокompозитную гибридную структуру. Кластеры, сформированные в процессе подготовки гидрогеля, состоят из 2–10 агломерированных частиц. Показана эффективность методов криогенной электронной микроскопии, в частности крио-ЭТ, для анализа пространственной организации НЧ в жидких и вязких средах. За счет прямого выявления полноценной 3D-картины применение крио-ЭТ с комплексным анализом частиц и их кластеров позволяет получать более точную информацию по сравнению не только с данными производителя, но и с результатами, полученными другими методами, что открывает

новые перспективы в исследовании коллоидных растворов и выявлении взаимосвязи структура–свойства.

Работа выполнена при частичной поддержке Министерства науки и высшего образования в рамках выполнения работ по Государственному заданию ФНИЦ “Кристаллография и фотоника” РАН, а также при частичной поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 19-02-00937).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Xu N.S., Huq S.E.* // Mater. Sci. Eng. 2005. V. 48. P. 47. <https://doi.org/10.1016/j.mser.2004.12.001>
2. *Лебедев-Степанов П.В., Дидейкин А.Т., Чвалун С.Н. и др.* // Кристаллография. 2019. Т. 64. № 5. С. 801.
3. *Лебедев-Степанов П.В., Дидейкин А.Т., Чвалун С.Н. и др.* // Поверхность. Рентген., синхротр. и нейтр. исследования. 2018. № 2. С. 46.
4. *Daniel M.-C., Astruc D.* // Chem. Rev. 2004. V. 104. P. 293. <https://doi.org/10.1021/cr030698+>
5. *Cohen E., Lightfoot E.J.* Coating Processes. In Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology. New York: John Wiley & Sons, 2011. <https://doi.org/10.1002/0471238961.1921182203150805.a01.pub3>
6. *Рогов А.В., Фанченко С.С.* // Журн. техн. физики. 2012. Т. 82. № 2. С. 129.
7. *Razuvaeva E.V., Kulebyakina A.I., Streltsov D.R. et al.* // Langmuir. 2018. V. 34. P. 15470. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.8b03379>
8. *Ozerin A.N., Kurkin T.S., Ozerina L.A. et al.* // Crystallography Reports. 2008. V. 53. № 1. P. 60. <https://doi.org/10.1134/S1063774508010070>
9. *Kuznetsov N.M., Belousov S.I., Stolyarova D.Yu. et al.* // Diam. Relat. Mater. 2018. V. 83. P. 141. <https://doi.org/10.1016/j.diamond.2018.02.006>
10. *Shtykova E.V., Petoukhov M.V., Dadinova L.A. et al.* // J. Virology. 2019. V. 93. № 6. P. e01450-18. <https://doi.org/10.1128/JVI.01450-18>
11. *Свергун Д.И., Фейгин Л.А.* Рентгеновское и нейтронное малоугловое рассеяние. М.: Наука. Гл. ред. физ.-мат. лит., 1986. 280 с.
12. *Dubochet J., Knapek E.* // PLoS Biol. 2018. V. 16. № 4. P. e2005550. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2005550>
13. *Kuznetsov N.M., Belousov S.I., Bakirov A.V. et al.* // Carbon. 2020. V. 161. P. 486. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2020.01.054>
14. *Chang S.L.Y., Reineck P., Williams D. et al.* // Nanoscale. 2020. V. 12. P. 5363. <https://doi.org/10.1039/C9NR08984E>
15. *Камышинский Р.А., Кузнецов Н.М., Лебедев-Степанов П.В. и др.* // Кристаллография. 2021. Т. 66. № 4. С. 572. <https://doi.org/10.31857/S0023476121040093>