

НАНОТЕХНОЛОГИИ В ОПТИКЕ И ЭЛЕКТРОНИКЕ

УДК 541.182 + 54-138 + 535-15 + 621.375.826 + 29.33.47

ИССЛЕДОВАНИЕ НАНООБЪЕКТОВ РАЗЛИЧНОЙ ПРИРОДЫ
МЕТОДОМ СУБМИЛЛИМЕТРОВОЙ ЛАЗЕРНОЙ АБЛЯЦИИ*А. С. Козлов¹, А. К. Петров¹, Н. А. Винокуров²

¹ Учреждение Российской академии наук
Институт химической кинетики и горения Сибирского отделения РАН,
630090, г. Новосибирск, ул. Академика Ржанова, 3
E-mail: petrov@kinetics.nsc.ru

² Учреждение Российской академии наук
Институт ядерной физики им. Г. И. Будкера Сибирского отделения РАН,
630090, г. Новосибирск, просп. Академика Лаврентьева, 11

Представлен обзор экспериментальных работ по развитию методов исследования фракционного состава нанобъектов различной природы, проводимых на физико-химической рабочей станции Новосибирского лазера на свободных электронах (ЛСЭ) с 2005 г. Обнаружено, что под воздействием субмиллиметрового излучения ЛСЭ происходит мягкая абляция биологических макромолекул. При этом молекулы оказываются в аэрозольной фазе отдельно, каждый тип молекул формирует собственную фракцию аэрозольных наночастиц без деструкции и денатурации и их размеры коррелируют с молекулярным весом. Предполагается, что метод субмиллиметровой лазерной абляции возможно использовать для определения размеров нанобъектов различного происхождения. На отдельных примерах обсуждаются результаты экспериментов с минеральными кластерами, нанопорошками, синтетическими и биологическими полимерами, проводимых с применением традиционных методов исследования фракционного состава наноразмерных материалов (атомно-силовая микроскопия, сканирующая электронная микроскопия, динамическое светорассеяние, рентгеновская дифрактометрия) и нового — анализа аэрозольных продуктов субмиллиметровой лазерной абляции. Показано, что субмиллиметровая лазерная абляция с последующей регистрацией аэрозольных продуктов современным аэрозольным оборудованием является универсальным, простым, быстрым и информативным методом и может существенно дополнить вышеупомянутые методы.

Ключевые слова: субмиллиметровое излучение, аэрозольные наночастицы, макромолекулы, лазер на свободных электронах.

Введение. История науки свидетельствует о том, что за появлением новых физических методов следуют открытия в смежных науках. Одно из последних открытий физиков — лазер на свободных электронах (ЛСЭ) — также, на наш взгляд, обещает стать эффективным инструментом исследований. На созданных на сегодняшний день ЛСЭ в различных лабораториях мира можно получать генерацию монохроматического излучения большой мощности в широком диапазоне длин волн от жёсткого ультрафиолета до субмиллиметрового с плавной перестройкой. Это позволяет селективно возбуждать различные молекулы в электронные, колебательные и вращательные состояния, что существенно увеличит возможности УФ- и ИК-фотохимии, даст возможность разделять изотопы, изомеры, очищать вещества от примесей и т. д. Но эти задачи уже ставились и решались

*Работа выполнена в рамках совместного конкурса научных проектов INTAS — СО РАН (грант № 06-1000013-8569) и при поддержке Интеграционных проектов Сибирского отделения РАН (гранты № 64/07, № 39/09 и № 52/09).

с использованием излучения классических лазеров, поэтому в данной работе представлены новые, неожиданные результаты экспериментов, проведённых в субмиллиметровом диапазоне генерации ЛСЭ.

Явление лазерной абляции находит широкое применение в науке, технике [1] и медицине [2]. Обычно речь идёт об использовании излучения с длиной волны короче 10 мкм, при этом происходит разрушение материала на молекулярном уровне. Применение субмиллиметрового излучения открывает новые перспективы в данной области. Субмиллиметровое излучение представляет собой область оптического спектра между дальним инфракрасным и микроволновым излучениями с длиной волны от 50 до 200 мкм ($200\text{--}50\text{ см}^{-1}$). Этот диапазон стал доступен исследователям благодаря появлению в последнее время новых мощных источников излучения. Одним из таких источников является созданный в Институте ядерной физики (ИЯФ) СО РАН лазер на свободных электронах, который способен генерировать монохроматическое излучение с длительностью импульса 30–100 пс, частотой повторения 2,8–11,2 МГц, перестраиваемой длиной волны от 40 до 240 мкм с относительной шириной линии излучения около 10^{-3} , средней мощностью до 400 Вт и мощностью в импульсе до 1 МВт [3].

После обнаружения явления мягкой неразрушающей абляции биологических макромолекул [4, 5] появилась идея разработки принципиально нового метода измерения размеров наночастиц и наносистем различной природы.

Суть мягкой неразрушающей абляции состоит в переносе макромолекул с твёрдой подложки или из раствора в аэрозольную фазу под действием субмиллиметрового лазерного излучения с сохранением их строения и свойств. Особенностью данного излучения является малая энергия кванта ($\sim 0,01\text{ эВ}$ ($0,3\text{ ккал/моль}$)), сравнимая с энергией водородных и ван-дер-ваальсовых связей, однако много меньшая энергии ковалентных связей. Таким образом, это излучение не способно одним квантом диссоциировать молекулы, что позволяет переносить их в аэрозольную фазу без нарушения первичной структуры. Эксперименты проводились на лиофилизатах и коллоидных растворах ДНК, белков и ферментов. Процесс перехода в аэрозольную фазу происходит без деструкции и денатурации молекул и с сохранением биологических свойств. При этом индивидуальная фракция макромолекул формирует индивидуальную фракцию аэрозольных частиц. Бинарные и более сложные смеси формируют соответственно две или несколько [6] фракций аэрозольных частиц размером, отвечающим молекулярному весу исходных компонентов. Это обстоятельство навело на мысль о создании нового универсального метода определения размеров наночастиц различного происхождения.

Определение фракционного состава нанопорошков, нанокolloидов и биологических макромолекул представляет огромный научный и практический интерес. Традиционно используемыми для этого методами являются рентгеновское рассеяние, электронная микроскопия и масс-спектрометрия, что долго, дорого и не всегда однозначно. Мы предлагаем применять мягкую лазерную абляцию для неразрушающего переноса нанодисперсной системы в газовую фазу с последующим её анализом с помощью традиционной аэрозольной аппаратуры. В представленной работе для определения дисперсного состава продуктов абляции в диапазоне диаметров частиц 3–250 нм использовалась автоматическая диффузионная батарея с конденсационным счётчиком частиц [7], а в качестве источника излучения — ЛСЭ Сибирского центра фотохимических исследований [3]. Все эксперименты проводились на длине волны $130 \pm 2\text{ мкм}$.

В целях демонстрации возможностей предлагаемого метода результаты исследования образцов, полученные методом мягкой абляции, были сопоставлены с результатами исследования этих же систем широко используемыми методами — динамическим светорассеянием (ДСР) (фотонно-корреляционной спектроскопией), рентгеновской порошковой дифрактометрией, сканирующей электронной, а также атомно-силовой микроскопией.

Технология эксперимента и пробоподготовка. Определение дисперсного состава исследуемых объектов традиционными методами осуществлялось с помощью сканирующего электронного микроскопа S-4800 фирмы "Hitachi" (Япония) и атомно-силового микроскопа Nanoscope V фирмы "Veeco Instruments" (США) (полуконтактный режим).

Измерение размеров частиц методом ДСР в жидкости осуществлялось согласно методике, изложенной в работе [8]. При использовании ДСР и микроскопии проводилась интенсивная пробоподготовка. Перед исследованием образцы переводились в разбавленный раствор с концентрацией 0,01–1 мг/мл с добавлением додецила сульфата натрия (СДС). Для удаления агрегатов частиц применялось интенсивное ультразвуковое воздействие на раствор с последующей фильтрацией через мембрану с диаметром пор 0,8 мкм. Сигнал рассеяния измерялся на длине волны 488 нм на углах 90 и 140° при последовательных разбавлениях исследуемого раствора. Кроме того, для атомно-силовой и сканирующей электронной микроскопии подготовленные растворы дополнительно подвергались лиофильной сушке непосредственно на микроскопических подложках.

Для уверенности в отсутствии значительного влияния пробоподготовки образцы исследовались на всех её стадиях. Все эксперименты происходили при комнатной температуре.

При анализе методом субмиллиметровой лазерной абляции образец помещался в горизонтальную кювету (рис. 1), куда с избытком, необходимым для исключения попадания аэрозоля снаружи, подавался фильтрованный газообразный азот. Перед началом работы обязательно проверялась аэрозольная чистота всего воздушного тракта. Необходимая для начала абляции плотность мощности излучения на поверхности образца устанавливалась посредством перемещения образца по фокальной оси секторного зеркала с фокусным расстоянием $f = 10$ см и в среднем составляла 10 Вт/см². Перед проведением этой процедуры пробоподготовка фактически отсутствовала, образцы размещались на подложке из алюминиевой фольги с добавлением деионизованной воды (~50 весовых процентов). Время экспозиции при этом составляло 3–10 с. Полученный в результате аэрозоль уносился потоком азота в буферную ёмкость объёмом 25 л для стабилизации счётной концентрации частиц, откуда затем подавался на диффузионный спектрометр аэрозолей (ДСА) для анализа дисперсного состава. Время единичного измерения составляло 4 мин. Измерения проводились сериями по четыре, после чего распределения усреднялись по размерам. Облучение чистой подложки не приводило к образованию частиц. Общее число испытаний каждого образца составило 30. При этом среднеквадратичное отклонение среднего размера частиц не превышало 15 %.

Использование диффузионной батареи в качестве классификатора аэрозольных частиц приводит к ряду естественных ограничений. При восстановлении распределений диффу-

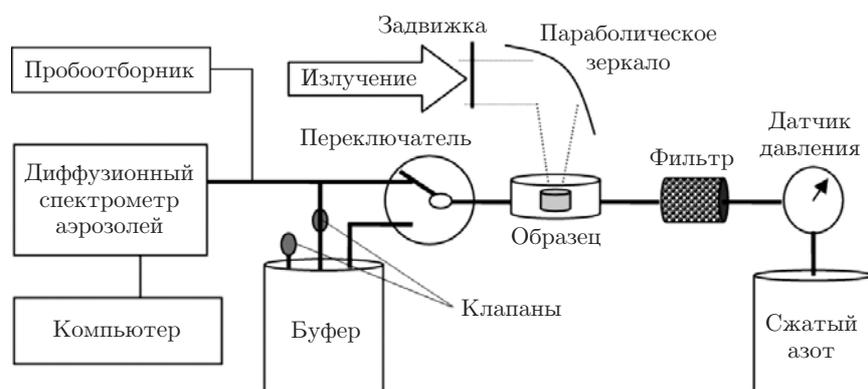


Рис. 1. Схема экспериментальной установки

зионной батареи учитывается лишь радиус частиц, следовательно, частицам, отличным по форме от сферической, в распределении по размерам будет сопоставлен размер сферы с таким же коэффициентом диффузии. Другое ограничение связано с временем проведения измерения. Действительно, каналы диффузионной батареи сканируются последовательно. Подразумевается, что в процессе сканирования остаются неизменными как счётная концентрация аэрозоля, так и его дисперсный состав. Для выполнения последнего условия принимаются специальные меры. Общая концентрация анализируемого аэрозоля устанавливается не выше 10^4 см^{-3} , что даёт уверенность в незначительной эволюции распределения частиц за время измерения. Достигается это ограничением времени экспозиции при абляции образца и постоянным контролем счётной концентрации частиц в буферной (накопительной) ёмкости. Стабилизация счётной концентрации частиц осуществляется посредством использования накопительной ёмкости. При расходе анализируемого газа в 1 л/мин характерное время изменения концентрации в ёмкости составляет около 30 мин, что при времени измерения в 4 мин даёт неплохой стабилизирующий эффект. Также следует отметить, что коэффициент диффузии не зависит от плотности материала частиц.

Минеральные кластеры и нанопорошки. В качестве образцов использовались коммерческие ультрадисперсные алмазоуглеродные и SiO_2 -порошки. Ультрадисперсный алмазоуглеродный порошок изготовлен на НПО «Алтай» (г. Бийск) методом детонации твёрдых взрывчатых веществ. Согласно данным производителя этот порошок содержит 40–60 массовых процентов ультрадисперсного алмаза. Размер частиц составляет 5–20 нм. Ультрадисперсный SiO_2 -порошок «Таркосил» был получен в ИЯФ СО РАН методом электронного удара. Средний размер частиц порошка 18–25 нм.

В ходе работ по абляции неорганических поглощающих образцов обнаружен эмпирический факт предотвращения спекания образца при добавлении к нему воды.

На настоящий момент физические механизмы мягкой абляции до конца не ясны. Один из предполагаемых механизмов — поглощение излучения ЛСЭ водой, в том числе в следовых количествах. Вода, присутствующая между частицами образца, сильно поглощает субмиллиметровое излучение, что ведёт к её импульсному испарению и выводу в газовую фазу части макромолекул образца вместе с водяными парами. Размер молекул воды существенно меньше порога регистрации оборудования, поэтому мы наблюдаем только молекулы образца в виде аэрозольных наночастиц. Прямые эксперименты на микровесах по сравнению скоростей испарения чистой воды под воздействием излучения ЛСЭ и термического нагрева показали, что лазерное испарение происходит в 50 раз быстрее. С этой позиции установленный эмпирический факт влияния воды на процесс абляции становится более понятным.

На рис. 2 и 3 представлено распределение по размерам частиц для ультрадисперсных алмазоуглеродного и SiO_2 -порошков, полученное различными методами измерения [9]. На рисунках указаны средние размеры основной по счётному количеству фракции частиц с указанием ширины их распределения. В основной фракции видно хорошее совпадение результатов и мягкой абляции, сканирующей электронной и атомно-силовой микроскопии, а в правой части графиков — комплексы крупных агрегатов частиц (средний размер 100 нм и более), зарегистрированные методами мягкой абляции и ДСР. На рис. 3 в левой части графика также видна низкомолекулярная фракция, которую удалось зафиксировать только с помощью метода мягкой абляции.

В обоих случаях метод ДСР смог обнаружить лишь комплексы из агрегированных частиц, несмотря на попытки их дезагрегации ультразвуком. Это следует отнести к особенностям данного метода, так как уровень сигнала в нём сильно зависит от размера частиц. Таким образом, низкомолекулярные фракции могли остаться невидимыми в присутствии массивных агрегатов.

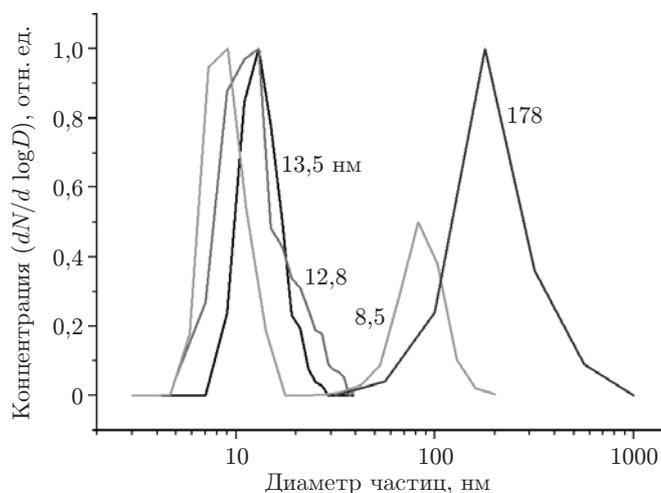


Рис. 2. Распределение по размерам частиц алмазоуглеродного порошка, полученное с помощью методов сканирующей электронной микроскопии (13,5 нм), атомно-силовой микроскопии (12,8 нм), субмиллиметровой лазерной абляции (8,5 нм) и динамического светорассеяния (178 нм)

Сравнение результатов, полученных четырьмя независимыми методами, даёт надежду, что мы установили реальный фракционный состав порошков даже несмотря на различие в технологии подготовки образцов. Положительной стороной метода субмиллиметровой лазерной абляции является минимум пробоподготовки. При этом в аэрозольной фазе могут оказаться только частицы исходного вещества. Низкая энергия кванта использованного излучения не позволяет разрушать материал, что ранее было подтверждено экспериментами на таких «нежных» биологических структурах, как ферменты и ДНК.

Дополнительно следует отметить, что исследование образцов методами микроскопии и светорассеяния состоит из длительных и трудоёмких циклов пробоподготовки, измерения и анализа полученных результатов, в то время как разовое определение фракционного состава этих же образцов посредством анализа аэрозольных продуктов субмиллиметровой

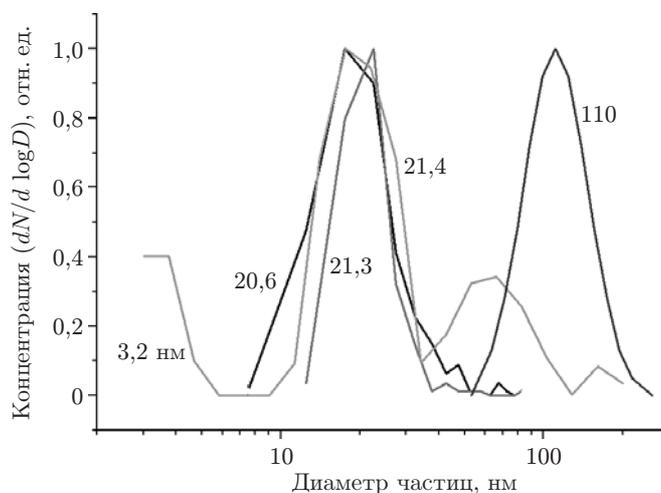


Рис. 3. Распределение по размерам частиц нанодисперсного порошка SiO_2 , полученное с помощью сканирующей электронной микроскопии (20,6 нм), атомно-силовой микроскопии (21,3 нм), субмиллиметровой лазерной абляции (3,2; 21,4 нм) и динамического светорассеяния (110 нм)

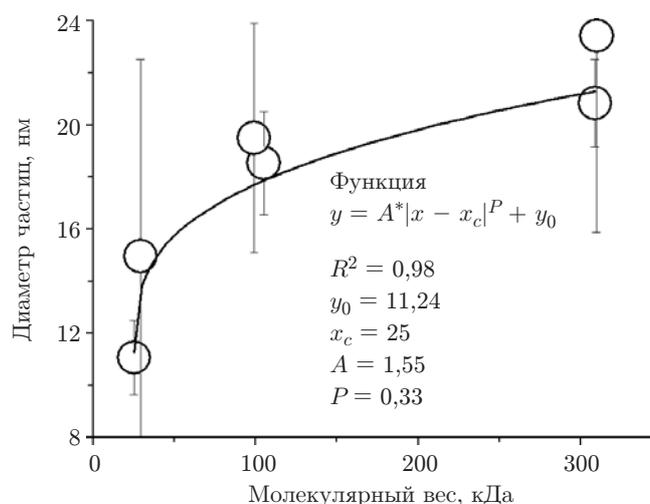


Рис. 4. Зависимость среднего размера аэрозоля ПВИ после абляции (кружки) от исходного молекулярного веса полимера

лазерной абляции составило около 30 мин. Кроме того, наш метод позволяет не только устанавливать размеры частиц в смеси, но и с хорошей точностью определять счётную концентрацию фракций.

Аналогичные результаты имеем для синтетических минеральных кластеров [5], частиц коллоидного золота, окисей алюминия и кремния.

Синтетические полимеры и композитные наночастицы. Для исследования возможности контроля процесса полимеризации с помощью мягкой абляции проводилось сопоставление среднего размера образующихся при абляции частиц с молекулярными массами исходных веществ. В работе использовались: поливинилимидазол (ПВИ) (молекулярные веса 25, 29, 99, 105, 309, 310 кДа) и полиакриловая кислота (ПАК) (молекулярные веса 200, 600 и 2000 кДа). На рис. 4 приведена зависимость среднего размера молекул ПВИ в виде аэрозоля от молекулярного веса полимера [5].

Зависимость размера полимерных частиц ПАК в виде аэрозоля от их молекулярного веса показана на рис. 5.

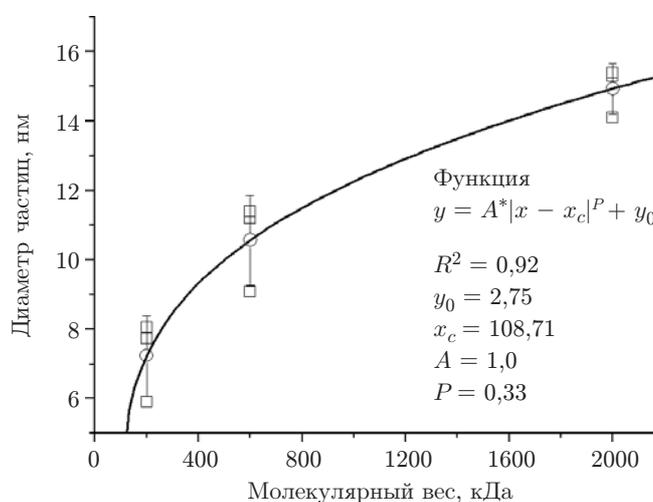


Рис. 5. Зависимость среднего размера аэрозоля ПАК после абляции (кружки и квадраты) от исходного молекулярного веса полимера

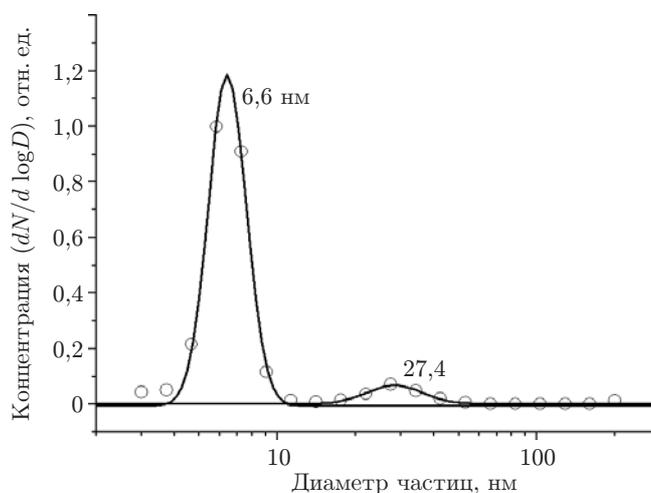


Рис. 6. Результаты абляции смеси из ПВИ различных молекулярных весов

Все полученные значения размеров частиц лежат в пределах точности измерения на экспериментальной кривой, что соответствует выполнению соотношения $(d_1/d_2)^3 = M_1/M_2$, т. е. масса пропорциональна кубу диаметра. Этот факт свидетельствует о том, что при абляции полимер не подвергся разрушению на части различного размера. Аналогичные зависимости получены для полидиметилсилоксана, полиэтилена и ряда других полимеров.

Абляции подвергались также смеси из полимера различных молекулярных весов. На рис. 6 показан образец, представляющий собой смесь из ПВИ с молекулярными весами 29 и 310 кДа. В результате образец сформировал бимодальное распределение. Полученные моды соответствуют размерам $\sim 6,6$ и $\sim 27,4$ нм, что хорошо соответствует полученным размерам для чистых полимеров тех же весов.

Методом мягкой лазерной абляции в сочетании с аэрозольной спектрометрией установлена структура композитных наночастиц, моделирующих везикулы транспорта кремния в диатомовых водорослях [10]. На рис. 7 представлена эволюция распределения по размерам молекул поливиниламина с увеличением степени полимеризации. Показано, что стабильные в растворе частицы радиусом 20–100 нм, образовавшиеся при конденсации кремниевой кислоты в присутствии поливиниламина, содержат кремнезёмные фрагменты радиусом 1–4 нм, стабилизированные цепями органического полимера. Полученные результаты свидетельствуют об уникальных возможностях лазерной абляции для исследования структуры композитных наночастиц.

Облучение полимерных материалов синхротронным излучением (СИ) при проведении рентгеновской литографии ориентировано на изменение молекулярной массы, от величины которой зависят многие их химические, механические и теплофизические свойства. Рентгенорезисты, используемые в рентгенолитографии, как правило, представляют собой углеводородные полимеры, характеризующиеся сравнительно низкими величинами коэффициентов теплопроводности и удельной теплоёмкости.

Нами проведено обследование необлучённых, облучённых и прошедших температурный отжиг образцов полиметилметакрилата (ПММА) с экспозиционными дозами в интервале от 0 до 8 кДж/см³, соответствующем самому крутому (при определённых условиях проявления) участку (в интервале доз $D \approx 4\text{--}8$ кДж/см³) характеристической кривой, представляющему наибольший интерес для LIGA-технологии [11].

При экспозиции образцов излучением ЛСЭ происходила неразрушающая исходные молекулы вещества абляция. Вылетающие с поверхности образца фрагменты увлекались

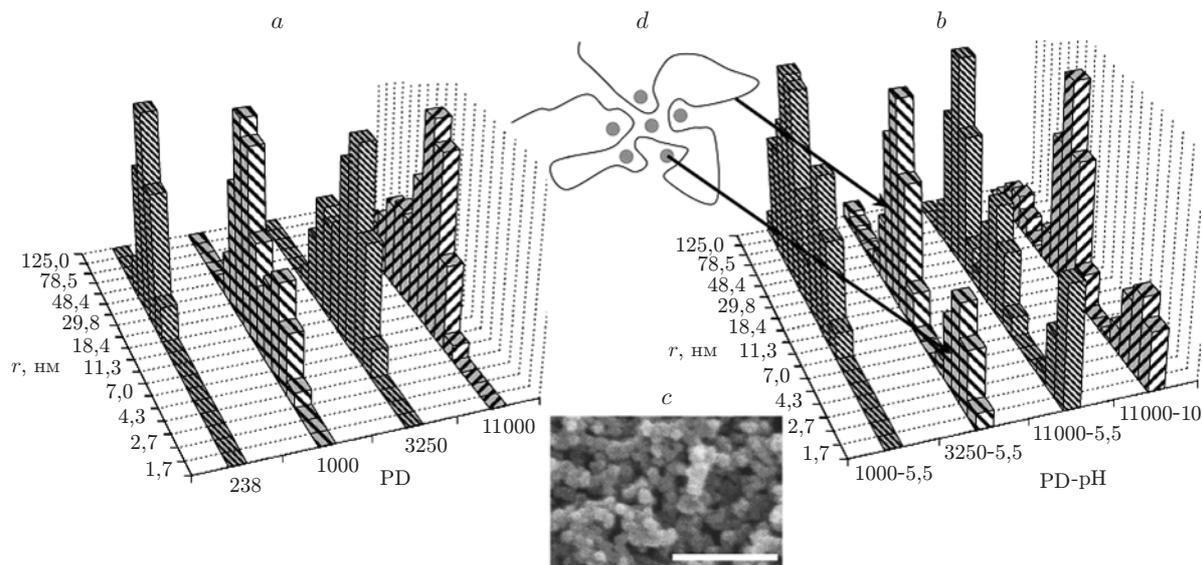


Рис. 7. Исследование формирования композитных кремний-полимерных наночастиц: распределение по размерам частиц, полученных при абляции образцов ПВА различной степени полимеризации (PD), (a), и композитных частиц, образовавшихся при эквимольном соотношении ПВА/кремниевая кислота и различных значениях pH, (b); микрофотография композитного осадка в этой системе при эквимольном соотношении компонентов и pH = 10, масштаб 1 мкм (c); схема строения композитных наночастиц (d)

потоком азота и регистрировались ДСА, автоматически определяющим значения концентраций частиц, характеризующихся определёнными размерами, при этом отношение возведённых в куб любых двух рядом расположенных размеров регистрации (т. е. соответствующих им объёмов частиц) равно примерно 2.

На рис. 8 приведены нормированные графики усреднённых распределений молекул в виде аэрозоля, образовавшихся вследствие абляции образцов органического стекла с экспозиционными дозами 0, 4 и 6 кДж/см³. Эти графики можно рассматривать как распределение частиц в зависимости от их молекулярной массы, где каждое следующее значение массы отличается от предыдущего примерно в 2 раза. Следует отметить, что ДСА регистрирует распределение молекул в соответствии с коэффициентом диффузии, эквивалентным молекулам с шарообразной формой. При этом исходный ПММА относится к линейным полимерам и форма его длинноцепных молекул в общем случае не является ни строго линейной, ни шарообразной и для облучённого полимера более соответствует последней по мере роста экспозиционной дозы. Как известно, длины одинарной и двойной связей между атомами углерода в углеводородных цепях составляют 0,154 и 0,134 нм соответственно, а углы между направлениями любой пары связей одинаковы и равны 109°28', из чего следует, что молекула ПММА с линейным размером 3 нм (нижняя граница регистрации ДСА) должна содержать минимум 24 мономера, т. е. иметь степень полимеризации $n \geq 24$ и молекулярную массу $M \approx 2400$. Таким образом, представленные на рисунке графики характеризуют распределение в исследуемых образцах только высокомолекулярных фракций и их поведение свидетельствует о том, что в экспозиционном интервале ($D = 4-6$ кДж/см³) с ростом дозы происходит увеличение среднечисловой молекулярной массы с $M'_R (D = 4 \text{ кДж/см}^3) \approx 6,9 \cdot 10^7$ до $M'_R (D = 6 \text{ кДж/см}^3) \approx 9,14 \cdot 10^7$. Наблюдаемое в необлучённом образце существенное количество низкомолекулярных соединений (значительная величина концентрации частиц с размерами <3 нм) объясняется технологией

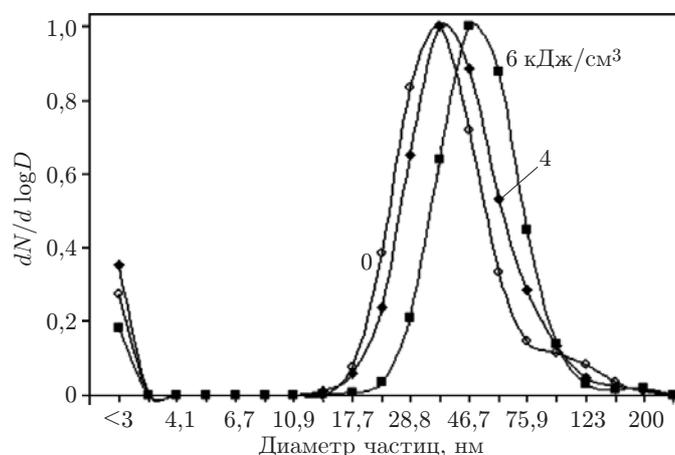


Рис. 8. Усреднённое размерное распределение молекул в виде аэрозоля, образовавшихся вследствие абляции образцов ПММА с экспозиционными дозами 0, 4 и 6 кДж/см³

изготовления листового органического стекла, производимого блочной полимеризацией и содержащего пластификаторы и фракции полимера с короткими цепочками.

Известно, что полимерным материалам свойственна полимолекулярность (полимер представляет собой смесь макромолекул различной длины), характеризующаяся усреднённой величиной молекулярной массы и некоторым масс-спектральным распределением, как правило, с явно выраженным максимумом. Однако в данном случае описание молекулярного состава облучённого ПММА через среднечисловую молекулярную массу неправомерно, поскольку мы имеем дело с двумя параллельно идущими при облучении процессами: это «измельчение» полимерных цепей и образование клубкообразных макромолекул, зародышевые центры которых возникают спонтанным образом в силу предпочтительного отделения от полимерной цепи эфирных групп, что позволяет соседним цепочкам объединяться. В результате образуются клубкообразные молекулы с множеством внутренних связей, вследствие чего даже многочисленные разрывы полимерной цепи в глубине клубка не приводят к возникновению новых молекул.

Биологические макромолекулы. Для изучения эффекта абляции под действием излучения ЛСЭ использованы следующие препараты: ДНК фага λ и плазмиды pEGFP (фирма «Сибэнзим» (г. Новосибирск)), полилизина, лизоцима и пероксидазы хрена (фирма «Sigma» (Германия)).

В качестве первого объекта исследования выбрана ДНК фага λ , водный раствор которой пипеткой наносили на пористую подложку из силуфола. Образец высушивали и подвергали воздействию излучения средней плотности мощности 10 Вт/см². В контрольных экспериментах при облучении чистой подложки не было обнаружено абляции каких-либо частиц. При использовании подложки с нанесённой на неё ДНК фага λ размером 48 тысяч нуклеотидных пар (тнп) зарегистрированы частицы размером 70 нм. В следующем эксперименте применяли смесь ДНК фага λ и ДНК плазмиды pBScript (3,6 тнп). Под воздействием излучения с теми же параметрами была проведена абляция этой смеси и зарегистрированы частицы размером 70 и 7 нм соответственно (рис. 9) [4, 5]. Из графиков на рисунке видно, что размеры регистрируемых при абляции частиц представлены только двумя модами (7 и 70 нм), отличающимися по размеру на порядок, что примерно согласуется с отношением размеров исходных молекул. Наличие двух фракций также свидетельствует о том, что в аэрозольной фазе молекулы оказались разделены. Отсутствие частиц других размеров указывает на отсутствие деструкции молекул под действием использованного излучения. Таким образом, впервые проведена мягкая неразрушающая абляция

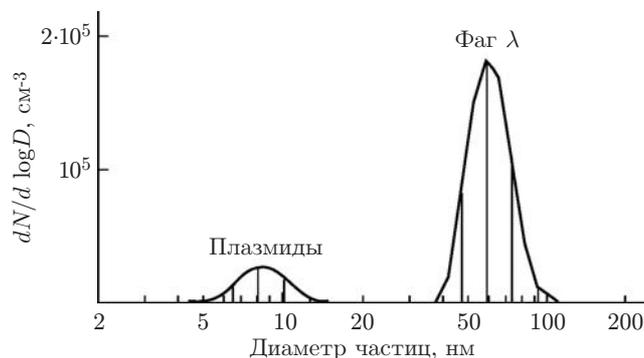


Рис. 9. Распределение по размерам аэрозольных частиц, образующихся в результате мягкой абляции кольцевой ДНК плазмиды pBScript и ДНК фага λ

биологических макромолекул под действием субмиллиметрового излучения.

В следующих экспериментах при тех же параметрах излучения проведена абляция белков: лизоцима и пероксидазы хрена [5]. Каждый из них образовывал аэрозольные частицы одного характерного размера, что коррелирует с отношением их молекулярных масс: 60 нм ($\sim 14,2$ кДа) для лизоцима и 100 нм (~ 44 кДа) для пероксидазы (рис. 10).

Отсутствие мелких фрагментов в аэрозолях различных биомолекул, полученных в серии экспериментов, а также корреляция соотношения размеров частиц и их молекулярных масс (для белков) и длин молекул (для ДНК) свидетельствует об отсутствии деструкции этих молекул.

Для проверки сохранения ферментативной активности пероксидазы хрена после абляции использовался метод гистохимической окраски, предложенный фирмой "BioRad" (США). Пероксидаза хрена является ферментом обширного семейства растительных пероксидаз, её функция — конверсия H_2O_2 в H_2O . Следует отметить, что пероксидаза хрена представляет собой одну полипептидную цепь, ассоциированную с гемом, который и является активным центром фермента. Белок, подвергнутый лазерной абляции и собранный на фильтровальную мембрану, окрасился, т. е. не денатурировал и сохранил ферментативную активность [4]. Таким образом, впервые показана возможность мягкой лазерной абляции белковых молекул при сохранении их функциональной активности, что также свидетельствует об удержании гема, входящего в активный центр.

С некоторой вероятностью можно предположить, что для объектов одной природы (полимеров, белков, ДНК и др.) размеру частиц в аэрозольной фазе можно сопоставить длину полимерной цепи объекта, по которой определяется масса, подвижность и пр. В

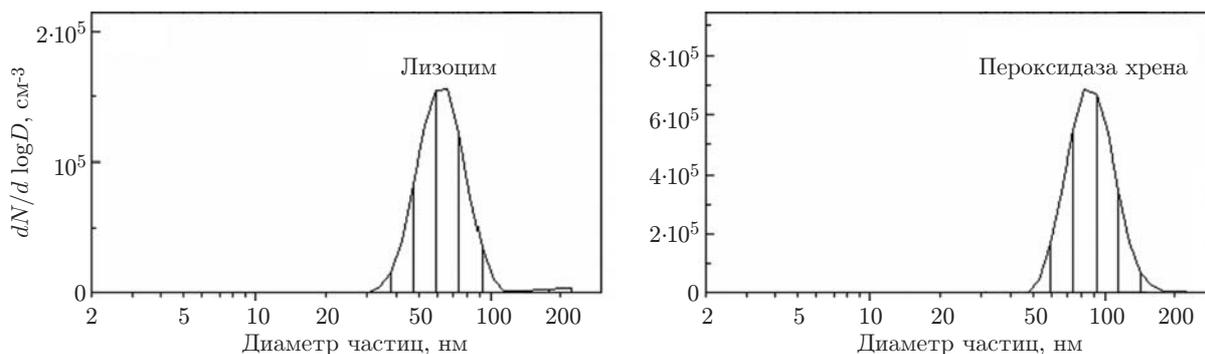


Рис. 10. Распределение по размерам аэрозольных частиц, образующихся в результате мягкой абляции лизоцима и пероксидазы хрена

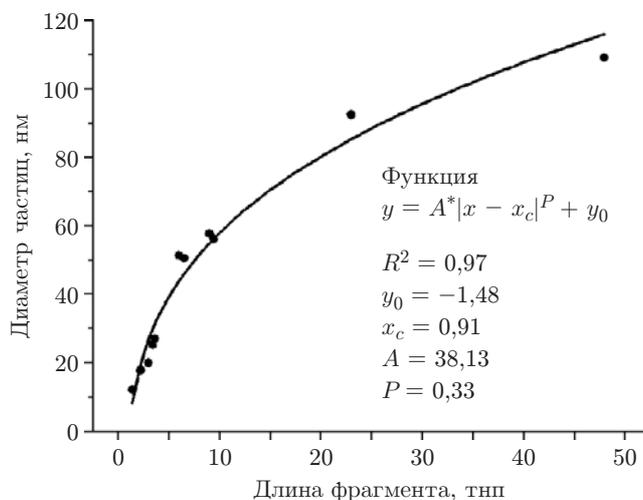


Рис. 11. Зависимость размеров фракций от длин фрагментов ДНК λ -hind

дальнейшем, имея множество градуировочных кривых для различных классов объектов, можно будет, измеряя размер какого-либо нового вещества, предсказать его молекулярные свойства. Для проверки этого предположения мы провели исследование зависимости размера аэрозольных фрагментов гидролизата ДНК фага λ -hind от длины их цепи (рис. 11).

При сопоставлении измеренного диффузионного размера частиц каждой фракции с их массой выяснилось, что каждой индивидуальной фракции соответствует только один размер. Это свидетельствует о неразрушении образца в ходе эксперимента.

С ростом массы увеличивался и размер, а полученную зависимость размеров от масс (см. рис. 11) можно аппроксимировать функцией, пропорциональной корню кубическому из диаметра. Если представить исследуемые частицы шариками с линейно изменяющейся или постоянной плотностью, такая аппроксимация является естественной. Фрагменты в аэрозольной фазе вполне могут иметь форму, близкую к шарообразной, так как ДНК склонна сворачиваться (третичная структура ДНК). Такие исследования необходимо продолжить на сериях близких по свойствам олигонуклеотидов и белков.

Одним из наиболее понятных с практической точки зрения экспериментов, проводящихся в нашем Центре, является исследование дисперсного состава вакцин. Данный объект зачастую представляет собой достаточно требовательную к условиям производства,

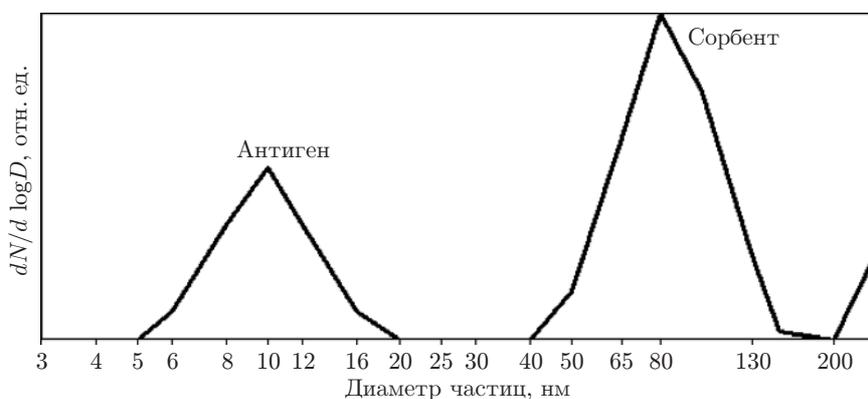


Рис. 12. Фракционный состав вакцины от гепатита В (лазерная абляция): фракция 10 нм — поверхностный антиген вируса, 80 нм — носитель (окись алюминия)

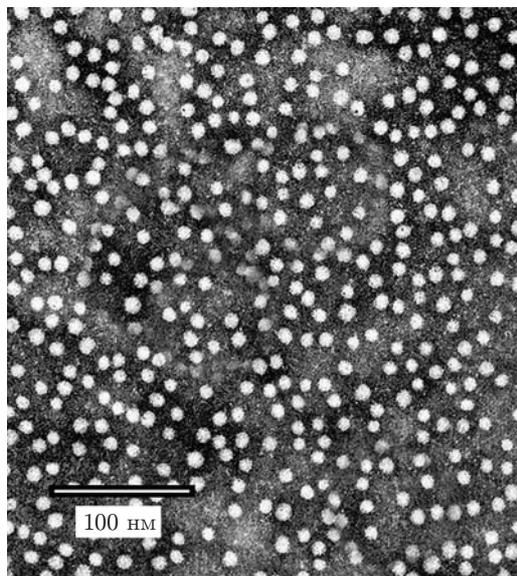


Рис. 13. Микрофотография поверхностного антигена HBsAg, полученная с помощью сканирующего электронного микроскопа

хранения и транспортировки нанодисперсную систему. Применение вакцин к людям обязывает осуществлять тщательный оперативный контроль их состояния на всех этапах. Эпизодический, выборочный контроль состояния вакцин как дисперсной системы может являться оперативным методом их проверки.

В традиционный состав жидких вакцин входят: биологический агент (макромолекулы, вызывающие в организме иммунную реакцию), носитель (обычно нейтральный для организма сорбент нанометрового размера) и химические вещества (стабилизаторы системы в целом). На первом этапе исследований использовались сертифицированные в стране вакцины от гепатита В, произведённые по единой технологии, включающие в состав нанокompозита поверхностный антиген вируса и носитель в виде окиси алюминия (рис. 12).

Приведённый результат хорошо подтверждается данными электронной микроскопии исследуемого объекта (рис. 13). Характерный размер молекул 10 нм.

Подобные исследования будут иметь продолжение в целях обнаружения изменений размеров и фракционного состава вакцин при их замораживании, нагреве, длительном хранении и т. д.

Заключение. Метод мягкой неразрушающей абляции под действием субмиллиметрового излучения ЛСЭ является эффективным средством для перевода макромолекул и кластеров с твёрдых подложек и из растворов в аэрозольную фазу с сохранением структурных и функциональных особенностей.

В сравнении с традиционными метод мягкой абляции продемонстрировал не только хорошее совпадение средних размеров частиц, но и оказался более информативным, позволив обнаружить наличие фракций частиц, не регистрируемых другими методами.

В настоящее время продолжается работа над совершенствованием и оптимизацией предлагаемого метода, расширением круга исследуемых образцов. Цель исследований — сделать этот подход универсальным, т. е. одинаково применимым в биологии, полимерной химии, а также в исследовании органических и неорганических кластеров различного происхождения. Сегодня эти исследования можно проводить только на Новосибирском ЛСЭ. Однако в ИЯФ СО РАН разработан проект [12] мощного компактного ЛСЭ, генерирующего излучение в диапазоне 100–250 мкм, размеры и стоимость которого будут на порядок

ниже существующего. Он может широко тиражироваться и использоваться в различных лабораториях России.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. **Luk'yanchuk B.** Laser cleaning. N. J.: World Scientific, 2002. P. 51–102.
2. **Vogel A., Venugopalan V.** Mechanisms of pulsed laser ablation of biological tissues // Chemical Rev. 2003. **103**, N 2. P. 577–644.
3. **Gavrilov N. G., Knyazev B. A., Kolobanov E. I. et al.** Status of the Novosibirsk high-power terahertz FEL // Nucl. Instrum. and Meth. Phys. Res. A. 2007. **575**, N 1/2. P. 54–57.
4. **Петров А. К., Козлов А. С., Тарабан М. Б. и др.** Мягкая абляция биологических объектов под воздействием субмиллиметрового излучения лазера на свободных электронах // ДАН. 2005. **404**, № 5. С. 1–3.
5. **Petrov A. K., Kozlov A. S., Malyshkin S. B. et al.** Nondestructive transfer of complex molecular systems of various origin into aerosol phase by means of submillimeter irradiation of free electron laser (FEL) of Siberian center for photochemical research // Nucl. Instrum. and Meth. Phys. Res. A. 2007. **575**, N 1/2. P. 68–71.
6. **Вагин М. С., Уницын А. С., Петров А. К. и др.** Исследование возможности определения масс биологических нанообъектов методом терагерцовой лазерной абляции // Вест. НГУ. Сер. Физика. 2009. **4**, № 3. С. 74–77.
7. **Ankilov A., Baklanov A., Colhoun M. et al.** Particle size dependent response of aerosol counters // Atmos. Res. 2002. **62**, N 3–4. P. 209–237.
8. **Aseyev V. O., Tenhu H., Klenin S. I.** Contraction of a polyelectrolyte upon dilution, light scattering studies on a polycation in basic and acidic water-acetone mixtures // Macromolecules. 1999. **32**, N 6. P. 1838–1846.
9. **Kozlov A. S., Petrov A. K., Kulipanov G. N., Aseyev V. O.** A novel method of probing the fractional composition of nanosystems // KONA Powder and Particle Journ. 2010. N 28. P. 219–226.
10. **Annenkov V. V., Danilovtseva E. N., Pal'shin V. A., Likhoshway Y. V.** Condensation of silicic acid in the presence of co(1-vinylimidazole — acrylic acid) // Adv. Sci. Lett. 2011. **4**, N 2. P. 616–621.
11. **Бобровникова О. Н., Генцелев А. Н., Гольденберг Б. Г. и др.** Формирование и исследование толстых резистивных слоев ПММА для LIGA-технологии // Поверхность. Рентгеновские, синхротронные и нейтронные исследования. 2005. № 9. С. 38–43.
12. **Miginsky S. V.** Compact submillimeter FEL project // Тез. докл. Междунар. симп. «Терагерцовое излучение: генерация и применение». Новосибирск: ИЯФ СО РАН, 2010. С. 72–73.

Поступила в редакцию 7 апреля 2011 г.