



纳米科学技术大系
纳米安全性丛书

纳米毒理学 与安全性研究方法

张智勇 等 编著 柴之芳 审校



科学出版社
www.sciencep.com

TB383
Z258

38

纳米科学技术大系
纳米安全性丛书

纳米毒理学与安全性研究方法

张智勇 等 编著

柴之芳 审校

TB383
Z258

d

科学出版社

北京

内 容 简 介

本书从纳米毒理学与安全性研究中的材料表征技术、前处理方法、生物样品中纳米材料的检测技术、动物实验、细胞实验和分子水平的研究几个方面对现有的资料进行总结,探讨纳米材料与常规材料毒理学研究方法的差异,提出了纳米毒理研究中应注意的问题。这对于规范目前的纳米毒理学研究、制定纳米材料安全性评价标准具有参考价值。

本书的主要读者对象是从事纳米毒理学、纳米生物效应研究和纳米技术相关标准制定的研究生和科研工作者。

图书在版编目(CIP)数据

纳米毒理学与安全性研究方法/张智勇等编著. —北京:科学出版社,2010
(纳米科学技术大系/白春礼总编·纳米安全性丛书/赵宇亮主编)
ISBN 978-7-03-026200-4

I. 纳… II. 张… III. 纳米材料:生物材料-毒理学②纳米材料-安全性-研究方法 IV. ①TB383②R99

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2009) 第 226882 号

责任编辑:杨震 刘冉 张淑晓 / 责任校对:郑金红
责任印制:钱玉芬 / 封面设计:王浩

科学出版社 出版

北京东黄城根北街16号

邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

中国科学院印刷厂 印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2010年1月第一版 开本:B5(720×1000)

2010年1月第一次印刷 印张:13 3/4

印数:1—2 500 字数:254 000

定价:58.00元

(如有印装质量问题,我社负责调换)

《纳米科学技术大系》序

在新兴前沿领域的快速发展过程中，及时整理、归纳、出版前沿科学的系统性专著，一直是发达国家在国家层面上推动科学与技术发展的重要手段，是一个国家保持科学技术的领先权和引领作用的重要策略之一。

科学技术的发展和应用，离不开知识的传播：我们从事科学研究，得到了“数据”（论文），这只是“信息”。将相关的大量信息进行整理、分析、形成体系并实践，才变成“知识”。信息和知识如果不能交流，就没有用处，所以需要“传播”（出版），这样才能被更多的人“应用”，被更有效地应用，被更准确地应用，知识才能产生更大的社会效益，国家才能在越来越高的水平上发展。所以，数据→信息→知识→传播→应用→效益→发展，这是科学技术推动社会发展的基本流程。其中，知识的传播，无疑具有桥梁的作用。

整个 20 世纪，我国在及时地编辑、归纳、出版各个领域的科学技术前沿的系列专著方面，已经大大地落后于科技发达国家，其中的原因有许多，我认为更主要的是缘于科学文化的习惯不同：中国科学家不习惯去花时间整理和梳理自己所从事的研究领域的知识，将其变成具有系统性的知识结构。所以，很多学科领域的第一本原创性“教科书”，大都来自欧美国家。当然，真正优秀的著作不仅需要花时间和精力，更重要的是要有自己的学术思想和对这个学科领域的充分把握和高度概况的学术能力。

纳米科技已经成为 21 世纪前沿科学技术的代表领域之一。其对经济和社会发展所产生的潜在影响，已经成为全球关注的焦点。国际纯粹与应用化学联合会（IUPAC）会刊在 2006 年 12 月评论：“现在的发达国家如果不发展纳米科技，今后必将沦为第三世界发展中国家。”因此，世界各国，尤其是科技强国都将发展纳米科技作为国家战略。

兴起于 20 世纪后期的纳米科技，给我国提供了与科技发达国家同步发展的良好机遇。目前，各国政府都在加大力度出版纳米科技领域的教材、专著以及科普读物。在我国，纳米科技领域尚没有一套能够系统、科学地展现纳米科学技术各个方面前沿进展的系统性专著。因此，国家纳米科学中心与科学出版社共同发起并组织出版《纳米科学技术大系》，力求体现本领域出版读物的科学性、准确性和系统性，全面科学地阐述纳米科学技术前沿、基础和应用。本套丛书的出版以高质量、科学性、准确性、系统性、实用性为目标，将涵盖纳米科学技术的所有领域，全面介绍国内外纳米科学技术发展的前沿知识；并长期组织专家撰写、

编辑出版下去。为我国纳米科技各个相关基础学科和技术领域的科技工作者和研究生、本科生等，提供一套重要的参考资料。

这是我们努力实践“科学发展观”思想的一次创新，也是一件利国利民、对国家科学技术发展具有重要意义的大事。感谢科学出版社给我们提供的这个平台，这不仅有助于我国在科研一线工作的高水平科学家逐渐增强归纳、整理和传播知识的主动性（这也是科学研究回馈和服务社会的重要内涵之一），而且有助于培养我国各个领域的人士对前沿科学技术发展的敏感性和兴趣爱好，为提高全民科学素养做出贡献。

我代表《纳米科学技术大系》编委会，感谢为此付出辛勤劳动的作者、编委会委员和出版社的所有同仁们。

同时希望您，尊贵的读者，如获此书，开卷有益！

白春礼

中国科学院常务副院长

国家纳米科技指导协调小组首席科学家

二〇〇九年四月于北京

《纳米安全性丛书》序

我国科学家的高水平研究成果，大部分发表在国外的影响力学术刊物上。长期以来，最新知识总是在精通英语的发达国家首先传播，被他们的企业优先应用，率先开发出高性能、更安全的新产品，迅速占领不发达的国家（如我国）的市场。我们之所以总是不得不跟踪别人的技术，自己缺乏技术创新能力，这是最重要的原因之一。在全球化的国际竞争中，这种局面不改变，中国的产业界和学术界将永远处于劣势地位。如何改变这种现状，是我们这个被叫做“科学家”的群体，应该承担的社会责任。

由于我们的母语不是英语，要求中国的企业家、负责产品设计和技术开发的研究人员以及科技管理部门和政策制定部门的政府工作人员，及时跟踪阅读国际学术刊物的相关英语论文，不是一个很现实的解决方案。因此，如果各个领域都有人组织专家，及时收集整理、归纳分析该领域的最新研究成果，不断编写出版有系统、成体系的中文书籍，把最新知识提供给国内的需求者，如教育工作者、在学的研究生、大学生、中学生、产业界的新产品研发者、政府管理人员、政策制定和执行人员、科学普及者、基础科研人员、技术研发人员等，就会大大缩短有效利用最新科学研究成果来发展先进技术的周期，有助于我们抢占先机，在全球化的国际竞争中，占据有利地位。

这套《纳米安全性丛书》，就是基于这个想法的一次尝试。

从国家利益来讲，基础研究不仅需要国际公认的高水平学术刊物发表高质量研究论文，也应该为国内纳税人及时提供系统的知识财富，尤其是便于那些国际化程度还不很高的大量中国企业尽早使用。

因此，我们在完成国家“973”项目研究的同时，组织全国十余个研究机构的一线科研人员负责收集整理国内外陆续发表的与纳米安全性相关的最新资料，近百人参与了这套（10本）纳米安全系列中文书籍的编写工作。我们希望这套丛书能够为读者提供最为广泛的纳米材料的毒理学知识和安全性应用的基础知识，包含了在我国大规模生产和使用的纳米材料、生产规模还不小但是安全性争议很大的纳米材料、自然界没有而是完全人造的纳米材料等。

纳米产品和纳米技术的安全性问题正在成为发达国家限制“市场准入”的策略。中国能否抢先制定、提出各种纳米材料和产品的安全指标，事关巨大国家利益。要实现这一点，就必须率先获取充分的基础研究数据，培养和建立我国在纳米安全领域的高水平专业队伍。我们希望这套资料，能够为保障国家纳米科技整

体发展所需的安全性和国际竞争力做出贡献。

经过四年多的努力，春天的播种在秋天里有了收获，现在把它们献与国内读者，供研究生、本科生、与纳米药物安全性相关领域的科研人员，尤其是纳米产品研发生产的相关企业管理人员、纳米医药销售及使用人员以及政府药品监督管理部门等使用。

感谢国家科技部及时部署的纳米安全性“973”项目(No. 2006CB705600)的支持！感谢“973”项目专家组的智慧和指导！感谢《纳米科学技术大系》提供的这个优秀的平台！感谢《纳米安全性丛书》编委会专家和丛书编写老师、同学们的长期坚持和努力！感谢科学出版社林鹏总编、杨震编辑和张淑晓编辑的辛勤劳动！同时敬请相关专家及广大读者批评指正，并将这套丛书广泛应用于您的基础科研、产品研发和市场开发等工作中。这套丛书将供国家部门、国内纳米企业和纳米研究者使用，为我国相关政策法规的制定提供科学依据的同时，也为建立国家的纳米安全性数据库奠定基础，为我国纳米技术产业的可持续发展做出贡献。

赵宇亮

《纳米安全性丛书》编委会

中国科学院纳米生物效应与安全性重点实验室

高能物理研究所

国家纳米科学中心

二〇〇九年十二月北京

前 言

纳米科技是 20 世纪末才逐步发展起来的新兴科学领域，它的迅猛发展将在 21 世纪促使几乎所有工业领域产生一场革命性的变化。纳米材料是未来社会发展极为重要的物质基础，许多科技新领域的突破迫切需要纳米材料和纳米科技的支撑，传统产业的技术提升也急需纳米材料和纳米技术的支持。

随着纳米材料的广泛应用，各种形式的纳米材料已经开始以不同的途径应用于生产和生活。与此同时，纳米技术的安全性问题也引起了各国政府、研究机构和公众的广泛关注。由于小尺寸效应、量子效应和巨大比表面积等，纳米材料具有特殊的物理化学性质。在进入人体后，它们与人体之间的相互作用可能与化学成分相同的常规物质有很大不同，某些纳米材料可能包含人类尚未充分了解的全生物效应作用机制。特别是那些与人体和生命直接相关的材料，错误的使用可能对人类健康造成不利影响。因此，必须开展纳米毒理学与安全性研究，以趋利避害，科学地、负责任地发展纳米科技。目前，纳米毒理学与安全性已经成为多个领域的研究热点，相关报道大量涌现。然而，这些研究结果存在相互矛盾、难以重复等问题，其主要原因是研究方法不标准、不统一、不规范。这一新兴的研究领域急需规范研究方法，统一判定标准，以适应当前研究工作的要求。

目前国际上已有几篇期刊论文讨论了纳米毒理学与安全性的研究方法，两本纳米毒理学的书籍也有相关的章节，但受篇幅所限，并非系统、全面的总结。本书从纳米材料的表征与前处理方法，纳米材料的体内检测技术，动物整体、细胞和分子水平的纳米毒理学研究方法几个方面对现有的资料进行总结，探讨了纳米材料与常规材料毒理学研究方法的差异，旨在规范相关研究方法。对一些可用于纳米毒理学与安全性研究但目前未见相关报道的方法，亦进行了介绍。

本书由中国科学院纳米生物效应与安全性重点实验室的成员编著，参加撰写的有马宇辉（第 1、2 章）、张智勇（第 3 章）、何潇（第 4 章）、白伟（第 5、6 章）。柴之芳院士审阅全书并提出修改意见。

目 录

《纳米科学技术大系》序

《纳米安全性丛书》序

前言

| | |
|-----------------------|----|
| 第 1 章 纳米材料的表征 | 1 |
| 1.1 纳米材料的粒度分析 | 1 |
| 1.1.1 电镜观察法 | 3 |
| 1.1.2 离心沉降法 | 4 |
| 1.1.3 激光粒度分析法 | 4 |
| 1.1.4 比表面积法 | 6 |
| 1.1.5 X 射线衍射法 | 8 |
| 1.1.6 小角 X 射线散射法 | 8 |
| 1.1.7 拉曼散射法 | 10 |
| 1.2 纳米材料的形貌分析 | 11 |
| 1.2.1 扫描电子显微镜 | 12 |
| 1.2.2 扫描探针显微镜 | 13 |
| 1.3 纳米材料的成分分析 | 16 |
| 1.3.1 原子吸收光谱法 | 17 |
| 1.3.2 电感耦合等离子体发射光谱法 | 18 |
| 1.3.3 电感耦合等离子体质谱分析 | 18 |
| 1.3.4 中子活化分析 | 20 |
| 1.3.5 X 射线荧光光谱分析方法 | 20 |
| 1.3.6 表面与微区成分分析方法 | 21 |
| 1.4 纳米材料的结构分析 | 23 |
| 1.4.1 X 射线衍射物相结构分析 | 23 |
| 1.4.2 X 射线吸收精细结构分析 | 24 |
| 1.5 纳米材料的表面与界面分析 | 26 |
| 1.5.1 X 射线光电子能谱分析 | 27 |
| 1.5.2 俄歇电子能谱分析 | 29 |
| 1.6 生物环境中纳米材料的表征 | 29 |
| 1.6.1 生物环境中纳米材料的尺寸和形貌 | 30 |

| | |
|---------------------------------|-----------|
| 1.6.2 生物环境中纳米材料的表面修饰与溶解 | 32 |
| 参考文献 | 34 |
| 第2章 纳米材料的前处理方法 | 37 |
| 2.1 纳米材料的表面修饰 | 37 |
| 2.1.1 富勒烯的表面修饰 | 37 |
| 2.1.2 碳纳米管的表面修饰 | 39 |
| 2.1.3 量子点 | 41 |
| 2.2 碳纳米材料的分散方法 | 42 |
| 2.2.1 富勒烯的分散 | 42 |
| 2.2.2 碳纳米管的分散 | 47 |
| 2.3 纳米金属粉体和金属氧化物的分散方法 | 50 |
| 2.3.1 物理分散 | 51 |
| 2.3.2 化学分散 | 53 |
| 参考文献 | 57 |
| 第3章 生物样品中纳米材料的检测技术 | 61 |
| 3.1 透射电镜 | 61 |
| 3.2 荧光分析技术 | 62 |
| 3.3 同位素示踪技术 | 66 |
| 3.3.1 碳纳米材料的放射性标记 | 68 |
| 3.3.2 碳纳米材料的稳定同位素标记 | 73 |
| 3.3.3 金属和金属氧化物纳米颗粒的放射性标记 | 73 |
| 3.4 无机元素分析方法 | 75 |
| 3.4.1 电感耦合等离子体质谱法 | 76 |
| 3.4.2 同步辐射 X 射线荧光分析 | 78 |
| 3.5 其他分析方法 | 80 |
| 参考文献 | 81 |
| 第4章 动物实验 | 85 |
| 4.1 急性毒性实验 | 89 |
| 4.1.1 经呼吸道染毒 | 90 |
| 4.1.2 经口染毒 | 100 |
| 4.1.3 经皮肤染毒 | 106 |
| 4.1.4 经注射染毒 | 110 |
| 4.2 长期毒性实验 | 111 |
| 4.2.1 呼吸系统毒性 | 112 |
| 4.2.2 心血管系统毒性 | 115 |

| | | |
|------------|--------------------|------------|
| 4.2.3 | 中枢神经系统毒性 | 117 |
| 4.2.4 | 生殖/发育毒性与致畸效应 | 119 |
| 4.2.5 | 致癌效应 | 121 |
| 4.3 | 检测指标 | 123 |
| 4.3.1 | 基本指标 | 123 |
| 4.3.2 | 血液指标 | 123 |
| 4.3.3 | 尿液指标 | 125 |
| 4.3.4 | 肺部毒性指标 | 125 |
| 4.3.5 | 心血管系统毒性指标 | 125 |
| 4.3.6 | 肝脏毒性指标 | 126 |
| 4.3.7 | 肾脏毒性指标 | 126 |
| 4.3.8 | 神经毒性指标 | 126 |
| 4.3.9 | 生殖/发育毒性指标 | 126 |
| 4.3.10 | 致癌性指标 | 127 |
| | 参考文献 | 127 |
| 第5章 | 细胞毒理学研究方法 | 132 |
| 5.1 | 细胞毒性检测 | 132 |
| 5.1.1 | 细胞形态学观察 | 133 |
| 5.1.2 | 细胞生长状态的观察 | 140 |
| 5.1.3 | 细胞活性的检测 | 140 |
| 5.2 | 流式细胞仪分析技术 | 143 |
| 5.2.1 | 流式细胞仪的工作原理 | 143 |
| 5.2.2 | 流式细胞术在生物学中的应用 | 144 |
| 5.2.3 | 流式细胞术在毒理学研究中的应用 | 144 |
| 5.2.4 | 流式细胞术在纳米生物效应研究中的应用 | 147 |
| 5.3 | 免疫细胞化学 | 148 |
| 5.3.1 | 免疫荧光细胞化学 | 149 |
| 5.3.2 | 免疫酶细胞化学 | 150 |
| 5.3.3 | 免疫金银法 | 152 |
| 5.3.4 | 铁蛋白标记法 | 153 |
| 5.3.5 | 亲和免疫细胞化学技术 | 154 |
| 5.4 | 纳米颗粒对细胞生物效应的特殊考虑 | 154 |
| 5.4.1 | 纳米颗粒能否进入细胞内部 | 154 |
| 5.4.2 | 纳米颗粒团聚对其生物学效应的影响 | 155 |
| 5.4.3 | 纳米颗粒溶解性对其毒性的影响 | 155 |

| | |
|--------------------------------|------------|
| 参考文献 | 156 |
| 第 6 章 分子毒理学研究方法 | 161 |
| 6.1 单细胞凝胶电泳技术 | 161 |
| 6.1.1 SCGE 检测原理及基本实验过程 | 161 |
| 6.1.2 SCGE 实验中的注意事项 | 165 |
| 6.1.3 SCGE 在毒理学中的应用 | 166 |
| 6.1.4 SCGE 在纳米生物效应研究中的应用 | 167 |
| 6.2 荧光原位杂交技术 | 168 |
| 6.2.1 FISH 技术的基本过程 | 169 |
| 6.2.2 FISH 技术的注意事项 | 172 |
| 6.2.3 FISH 技术在毒理学中的应用 | 172 |
| 6.3 PCR-SSCP 技术 | 174 |
| 6.3.1 PCR-SSCP 技术在毒理学中的应用 | 175 |
| 6.3.2 PCR-SSCP 技术在纳米生物效应研究中的应用 | 176 |
| 6.4 mRNA 差异显示 PCR 技术 | 176 |
| 6.4.1 mRNA 差异显示 PCR 技术基本原理 | 176 |
| 6.4.2 mRNA 差异显示 PCR 技术的基本过程 | 177 |
| 6.4.3 mRNA 差异显示 PCR 技术在毒理学中的应用 | 177 |
| 6.5 基因芯片技术 | 180 |
| 6.5.1 基因芯片的技术原理和分类 | 180 |
| 6.5.2 基因芯片的基本操作过程 | 182 |
| 6.5.3 基因芯片技术在毒理学中的应用 | 183 |
| 6.5.4 基因芯片在纳米生物效应研究中的应用 | 187 |
| 6.6 蛋白质组学 | 187 |
| 6.7 代谢组学 | 190 |
| 6.7.1 代谢组学的概念 | 191 |
| 6.7.2 代谢组学研究方法 | 191 |
| 6.7.3 代谢组学在毒理学中的实际应用 | 192 |
| 6.7.4 代谢组学在纳米生物效应研究中的应用 | 194 |
| 参考文献 | 194 |

第 1 章 纳米材料的表征

纳米材料是纳米科学与技术的基础和主要研究内容，也是材料科学领域发展起来的一个新兴研究方向。纳米材料由于具有高比表面积、高导电性、高硬度、高磁化率、高催化活性等优良的物理化学性质，不仅在材料科学领域得到青睐，而且在自然科学的其他领域，如生物医学、化工和电子学等方面也受到极大关注。随着纳米材料的广泛应用，人们不可避免地会越来越多地与之接触，但目前对纳米材料本身的毒性及其与生物体之间的相互作用还不甚了解，这就使得纳米材料安全性研究变得日益迫切起来。

为了更好地了解纳米材料的生物效应以及作用机制，需要对纳米材料的物理化学特性进行详尽的表征。现在已经发展了许多方法来研究纳米颗粒在生物体环境之外的尺寸、形貌和表面特征等性质。但是，在体内环境中研究这些特征则要困难得多。进入生物体的纳米材料可能发生团聚、解离、吸附等变化，会受到生物体清除、防御和免疫反应行为的干扰，情况变得更加复杂，经常会出现假象。目前相关学者一致认为，毒理学家应该与熟知纳米材料特性的物理学家、化学家联合起来，制定一系列关于纳米材料特性表征的指导方针和操作规程。

许多情况下，纳米材料分析中遇到的问题来源于尺寸与结构的不均匀性以及单个小尺寸材料可控操作上的困难。针对不同的体系，需要选择适用的结构分析与性能研究方法。本章对纳米材料已有的一些分析和表征技术进行了归纳和总结，主要从纳米材料的粒度分析、形貌分析、成分分析、结构分析以及表面与界面分析等方面进行系统的介绍。

1.1 纳米材料的粒度分析

纳米材料的粒径大小和粒径分布与小尺寸效应密切相关，也是最重要的指标之一，对其的表征是必不可少的。一般固体材料颗粒大小可以用颗粒粒度概念来表述。但由于颗粒形状的复杂性，很难直接用单一尺度来描述颗粒大小，因此常用等效粒度的概念来描述颗粒的大小。纳米颗粒一般指一次颗粒，它的结构可以为晶态、非晶态和准晶态。在晶态的情况下，纳米颗粒可以为多晶体，当粒径小到一定值后则为单晶体。只有当纳米微粒为单晶体时，其粒径才与晶粒尺寸相同。球形颗粒尺寸（粒径）即指其直径；不规则颗粒尺寸的定义常为等当直径，如体积等当直径、投影面积直径等^[1]。

粉体材料的颗粒大小分布很广，按尺寸可以将粉体材料分为纳米颗粒、超微颗粒、微粒、细粒、粗粒、粒状物等种类，如图 1.1 所示。纳米材料研究的粒度分布范围主要在 1~500 nm，而经常遇到的则是纳米尺度（1~100 nm）的超细微粒。

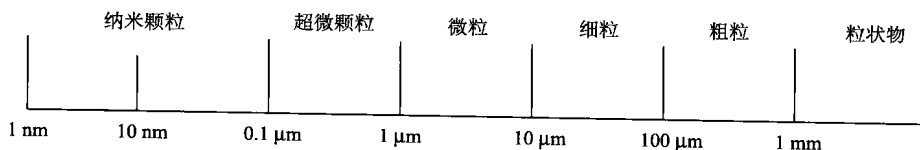


图 1.1 粉体材料颗粒度的划分和尺度范围

分析纳米材料粒度的困难在于纳米颗粒之间具有很强的自吸附特征，因此极易团聚，单分散体系非常少见，两者差异较大。对于纳米材料体系的粒度分析，首先需要分清分析的是颗粒的一次粒度还是二次粒度。在考虑到纳米颗粒的易团聚性质时，也应考虑团聚的纳米颗粒是否容易再分散。一次粒度的分析主要采用电镜直接观测，二次粒度的分析方法有三种典型的方法：高速离心沉降法、激光粒度分析法和电超声粒度分析法。激光粒度分析法按其分析粒度的范围不同，又划分为光衍射法和动态光散射法。光衍射法主要针对微米、亚微米级颗粒；光散射法则主要针对纳米、亚微米级颗粒。对纳米颗粒的二次粒度分析一般利用激光粒度分析法的动态光散射法。电超声粒度分析法是新出现的粒度分析方法，主要针对高浓度体系的粒度分析。同时，还可以通过一些其他的手段，如测量比表面积、X 射线衍射等方法间接得到纳米材料的粒度大小。

目前，对纳米材料进行粒度分析的方法很多，将各种方法汇总，如表 1.1 所示^[2]，并给出了各种方法的优缺点以及在毒理学研究中暴露介质（生物体液和气溶胶）的适用性。

表 1.1 常用颗粒粒度测量方法及特点

| 测量方法 | 测量范围 | 优点 | 缺点 | 是否可用于暴露介质 | |
|-----------------|-------------|---------------|----------------|-----------|-----|
| | | | | 生物体液 | 气溶胶 |
| 离心沉降法 | 5 nm~10 μm | 利于研究尺寸分布较宽的颗粒 | 烦琐，费时 | 是 | 否 |
| 激光衍射/静态光散射法 | 40 nm~3 μm | 动态范围宽，湿法或干法测量 | 假设为球形，颗粒形状影响未知 | 是 | 否 |
| 动态光散射法 (DLS) | 4 nm~6 μm | 宏观方法，可测表面电位 | 粒径分布宽时可信度低 | 是 | 不一定 |
| 静电低压撞击器法 (ELPI) | 20 nm~10 μm | 测量空气动力学直径 | 低压干法，适用于少量样品 | 否 | 是 |

续表

| 测量方法 | 测量范围 | 优点 | 缺点 | 是否可用于暴露介质 | |
|-------------------|---|-------------------|------------------|-----------|-----|
| | | | | 生物体液 | 气溶胶 |
| 扫描电子显微镜 (SEM) | 50 nm~1 cm | 应用广,成像范围大 | 高真空制样复杂 | 不一定 | 否 |
| 透射电子显微镜 (TEM) | 5 nm~500 μm | 分辨率高,成像质量好 | 高真空,对样品有破坏性 | 不一定 | 否 |
| 原子力显微镜 (AFM) | 1 nm~8 mm | 高分辨力和三维成像能力 | 只能观察表面,针尖可能引起假象 | 否 | 否 |
| 尺寸排阻色谱法 (SEC) | 1 nm~2 μm | 高分辨率,样品体积小 | 分析速度慢,需要标准物 | 是 | 否 |
| 时间飞行质谱法 (TOF) | 1 nm~3 μm (100 Da 至 100 MDa 以上) | 与激光烧蚀联用可分析颗粒的化学组成 | 制样复杂,昂贵,需要多种测量手段 | 否 | 是 |
| 电超声法 | 0.3 nm~5 μm | 高浓度体系适用 | 样品浓度高,分辨率低 | 是 | 否 |
| 非对称流分离法 | 2 nm~200 μm | 对尺寸分布的分辨率高 | 需要与其他技术(如光散射法)联用 | 是 | 否 |
| 比表面积法 (BET, 滴定) | 5 nm~10 μm | 直观且大多数体系适用 | 假设粒子为单分散且无孔的球形 | 仅滴定法是 | 是 |
| 小角 X 射线散射法 (SAXS) | 300 nm~1 mm | 操作简单,可真实反应粒度分布 | 假设粒子为单一材质且无孔的球形 | 是 | 是 |

下面详细介绍几种常用的纳米材料粒径分析方法。

1.1.1 电镜观察法

电镜法观察纳米材料的粒度是目前比较成熟的方法,也是纳米材料研究最常用的方法。它不仅可以分析纳米颗粒大小,也可以对颗粒大小的分布进行分析,还可以得到颗粒形貌数据。一般采用扫描电子显微镜 (scanning electron microscopy, SEM) 和透射电子显微镜 (transmission electron microscopy, TEM), 其主要原理是基于电子与物质的相互作用,通过溶液分散制样或直接制样的方式把纳米材料样品分散在样品台或者铜网上,然后通过电镜放大观察和照相。

普通扫描电镜分辨率在 6 nm 左右,成像立体感强,一般只能提供微米或亚微米的形貌信息。透射电镜分辨率达 0.3 nm,晶格分辨率达到 0.1~0.2 nm,可以根据像的衬度来估计颗粒的厚度,是空心还是实心,通过观察颗粒的表面复型了解颗粒表面的细节特征。高分辨电镜还可以研究纳米材料的微观结构结晶情况,得到原子级的形貌图像。用电镜测量粒径首先应尽量多拍摄有代表性的纳米微粒形貌像,然后由这些电镜照片来测量粒径。用这种方法可以观察到纳米颗粒的平均直径和粒径分布,是一种颗粒度观察测定的绝对方法,具有高可靠性和直

观性。电镜观察法的缺点是用于观察的粉末极少,使得测量结果缺乏统计性,很难代表实际样品颗粒的分布状态,对一些在强电子束轰击下不稳定甚至分解的微纳颗粒、制样困难的生物颗粒、微乳等样品则很难得到准确的结果。在自然状态下,因为纳米颗粒的比表面积大,颗粒之间普遍存在范德瓦耳斯力和库仑力,极易团聚,难以得到纳米一次颗粒。

制样是电镜分析的关键因素之一,纳米颗粒的分散状况直接影响测量结果的准确性,样品的代表性在很大程度上取决于颗粒尺寸分布是否均匀、杂质颗粒是否干扰等。因此,需要选用合适的分散剂和适当的操作方法对颗粒进行分散。

1.1.2 离心沉降法

沉降法粒度分析是通过颗粒在液体中的沉降速度来测量粒度分布的方法。其中适合纳米颗粒度分析的主要是离心沉降法,这也是早期实验室中的常用方法。

颗粒分散在介质中,会由于重力或者离心力作用发生沉降,沉降速度与颗粒大小和质量有关。颗粒大的沉降速度快,颗粒小的沉降速度慢,在介质中形成一种分布。沉降速度与粒径之间的关系服从 Stokes 定律。较小的颗粒沉降速度很慢,常用离心的方法来加快颗粒的沉降速度。离心沉降方式是用来测量超细样品的,由于介质的黏度、外界的振动、环境温度波动所引起的对流等影响,超细颗粒的布朗运动以及再凝聚,测量的粒子也可能不是球形等原因,离心沉降法存在着检测速度慢(尤其对小粒子)、重复性差、对非球形粒子误差大、不适用于混合物料、动态范围窄等缺点。

纳米颗粒极易团聚,市售的纳米颗粒的粒径分布往往较宽。采用不同的离心力沉降,剔除用超声无法散开的和较大的颗粒,可筛选粒径分布较窄的纳米颗粒,这也是区别不同粒径纳米颗粒常用的方法。如采用系列分步离心方法可获得四种不同粒径的纳米二氧化铈^[3]。第 I 部分直径为 20~50 nm,是将产物在 45 g, 173 g, 1110 g, 3500 g, 128000 g, 10000 g (Sigma 3K30) 分别离心 5 min 后得到的上清液。第 II 部分 (40~80 nm) 和第 III 部分 (80~150 nm) 由 CeO₂ 纳米颗粒在 700℃ 煅烧 16 h 后再进行分散和超声制得。其中在 4000 g (Sigma 3K30) 离心 5 h 后得到的上清液为第 II 部分;在 3000 g 和 2500 g 连续离心后得到的剩余物再分散,经 500 g 离心后得到的上清液为第 III 部分。将 CeO₂ 纳米颗粒在 1000℃ 煅烧 16 h 后,在球形研磨机中研磨 2 h,加入柠檬酸来稳定超声时的分散液,再用 0.02 mol/L 的柠檬酸溶液清洗除去研磨剂,然后在 50 g 下离心得到第 IV 部分的悬浮液。各部分尺寸和电镜照片如图 1.2 所示。

1.1.3 激光粒度分析法

激光粒度分析方法是近年来发展起来的一种高效快速的测定粒度分布的方

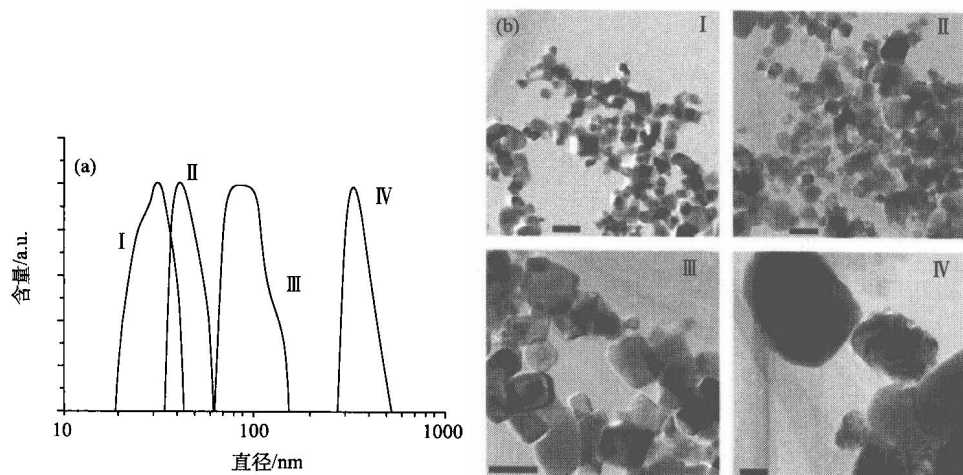


图 1.2 通过分步离心方法获得化学组成相同、尺寸不同的纳米 CeO_2 颗粒^[3]

(a) 各组分粒径分布在 20~500 nm 之间；(b) 各相应尺寸组分的电镜照片

法，目前已经得到广泛应用。这种方法具有测量精度高、速度快、重复性好、可测粒径范围广、可进行非接触测量等优点。

1. 静态光散射法

在静态光散射 (static light scattering) 粒度分析法中，当颗粒粒度大于光波波长时，可用夫琅禾费 (Fraunhofer) 衍射测量前向小角区域散射光强度分布来确定颗粒粒度。当粒子尺寸与光波波长相近时，要用米氏 (Mie) 散射理论进行修正，并利用角谱分析法。1976 年，Swithenbank 等发展了基于夫琅禾费衍射理论的激光微粒测量方法，其原理是激光通过被测颗粒将出现夫琅禾费衍射，不同粒径的颗粒产生的衍射光随角度的分布不同，根据激光通过颗粒后的衍射能量分布以及相应的衍射角，可以计算出颗粒样品的粒径分布^[4]。

来自 He-Ne 激光器中的一束窄光束经扩束后，平行地照射在颗粒槽中的被测颗粒群上，由颗粒群产生的衍射光经聚焦透镜会聚后在其焦平面上形成衍射图，利用位于焦平面上的一种特制的环形光电探测器进行信号的光电变换，然后将来自光电探测器的信号放大、A/D 变换、数据采集送入到计算机中，采用预先编制的优化程序将计算值与实测值相比较，即可快速反推出颗粒群的尺寸分布。值得注意的是，只有被测颗粒粒径大于激光光波波长才能处理成夫琅禾费衍射。虽然现在夫琅禾费衍射粒度仪能测定亚微米级颗粒粒度，但是由于存在多重衍射等问题，测量结果误差较大。