

УДК 535.36, 543.424.2

## ВЛИЯНИЕ АКТИВНОЙ КИСЛОТНОСТИ КОЛЛОИДНОГО РАСТВОРА ДИОКСИДА ТИТАНА В ФОРМЕ АНАТАЗА НА АГРЕГАТИВНУЮ УСТОЙЧИВОСТЬ НАНОФРАКЦИИ

М. А. Шевченко<sup>1</sup>, С. Ф. Уманская<sup>1</sup>, В. С. Кривобок<sup>1</sup>, А. В. Колобов<sup>1</sup>,  
С. Е. Димитриева<sup>1,2</sup>, С. И. Ченцов<sup>1</sup>

*В зависимости от активной кислотности водного раствора исследована коллоидная устойчивость суспензии диоксида титана в форме анатаза (пищевая добавка E171), содержащей наночастицы со средним размером ~10 нм и ~200 нм. Показано, что стабильность наночастиц достигается в щелочной среде при  $pH > 9.6$ . Уменьшение  $pH$  от 9.6 до 6.2 (нейтральный) приводит к росту дзета-потенциала от  $-30$  мВ до  $-20$  мВ и сопровождается формированием наноагломератов размером ~20 нм с участием мелких частиц. В кислой среде с  $pH \sim 2.6$  (желудок человека) значение дзета-потенциала увеличивается до  $+10$  мВ и сопровождается укрупнением мелких агломератов до 50–60 нм. При этом увеличение среднего размера до ~40 нм наблюдается уже в течении ~2 минут. Обнаруженная быстрая агломерация должна снижать вероятность проникновения нанопракции E171 через клеточные мембраны в желудке человека. Однако проникающая способность нанопракции E171 существенно возрастает в тонком кишечнике, где происходит основное всасывание пищи и среда близка к нейтральной  $pH \sim 8$ .*

**Ключевые слова:** диоксид титана, динамическое рассеяние света, комбинационное рассеяние света.

<sup>1</sup> ФИАН, 119991 Россия, Москва, Ленинский пр-т, 53; e-mail: kolob7040@gmail.com.

<sup>2</sup> 2МГУТУ им. К. Г. Разумовского, 109004 Россия, Москва, ул. Земляной Вал, 73.

Кристаллический диоксид титана ( $\text{TiO}_2$ ) в форме анатаза или рутила повсеместно применяется в пищевой, фармацевтической, косметической промышленности, и для большинства применений адекватной замены данного материала пока не существует. В частности,  $\text{TiO}_2$  используется в качестве белого красителя E171 в составе рыбной, молочной, кондитерской продукции, а также в оболочках и капсулах биологически активных добавок к пище. В то же время, последние эксперименты, проведенные с использованием лабораторных животных, указывают на то, что  $\text{TiO}_2$  в наноформе является высокотоксичным, причем степень токсичности и характер воздействия зависят от размера наночастиц (НЧ) [1, 2]. До недавнего времени считалось, что наиболее опасными считаются частицы в форме анатаза размером  $\sim 10$  нм и менее [2–5]. Это, в первую очередь, связывалось с их способностью проникать через клеточные мембраны и накапливаться в организме. Также недавно было установлено, что крупные агломераты НЧ, размером  $\sim 100$  нм, могут быть не менее токсичными, чем мелкие [6]. Тем не менее, механизм воздействия таких агломератов НЧ до конца не изучен ввиду их неспособности проникать через клеточные мембраны. Особенностью стандартных микропорошков  $\text{TiO}_2$  является то, что размер их частиц не регулируется и не контролируется международной нормативной базой, при том, что в них возможно содержание частиц в токсичной наноформе [7]. Поступление высокотоксичных НЧ анатазной фазы в организм, в том числе пероральным путем, следует признать высоко вероятным [8].

Несмотря на значительное количество работ, демонстрирующих токсичность НЧ  $\text{TiO}_2$ , в современной литературе практически отсутствуют данные о том, какие процессы происходят с НЧ при их попадании в пищеварительную систему человека. В то же время, при различных значениях  $pH$  и/или ионной силы среды, в которой находятся частицы, происходит изменение их электростатического взаимодействия. Это может приводить как к распаду агломератов НЧ, что вызовет изменение механизмов воздействия НЧ на организм, так и, наоборот, к формированию агломератов большого размера и/или агломерации наночастиц на поверхности более крупных кристаллов. В последнем случае токсичность должна уменьшаться, если размер частиц составляет  $\sim 1$  мкм или больше.

В частности, значение  $pH$  в человеческом желудке составляет 2–3. В то же время для нейтральной среды, например, молока, значение  $pH$  порядка 6–7. Это означает, что при попадании в желудок агрегативная устойчивость пищевой добавки  $\text{TiO}_2$ , содержащейся в молоке (E171), может претерпевать изменения, как в сторону увеличения токсичности, так и в сторону ее снижения. В данной работе показано, что при изменении  $pH$

от 6.2 до 2.6 НЧ  $\text{TiO}_2$  демонстрируют быструю агломерацию – в течении нескольких минут после изменения активной кислотности средний размер более мелкой фракции быстро увеличивается, что уменьшает вероятность проникновения НЧ через клеточные мембраны в желудке человека. При этом, вероятность проникновения НЧ через клеточные мембраны может снова возрасти в тонком кишечнике, где  $pH \sim 8$ .

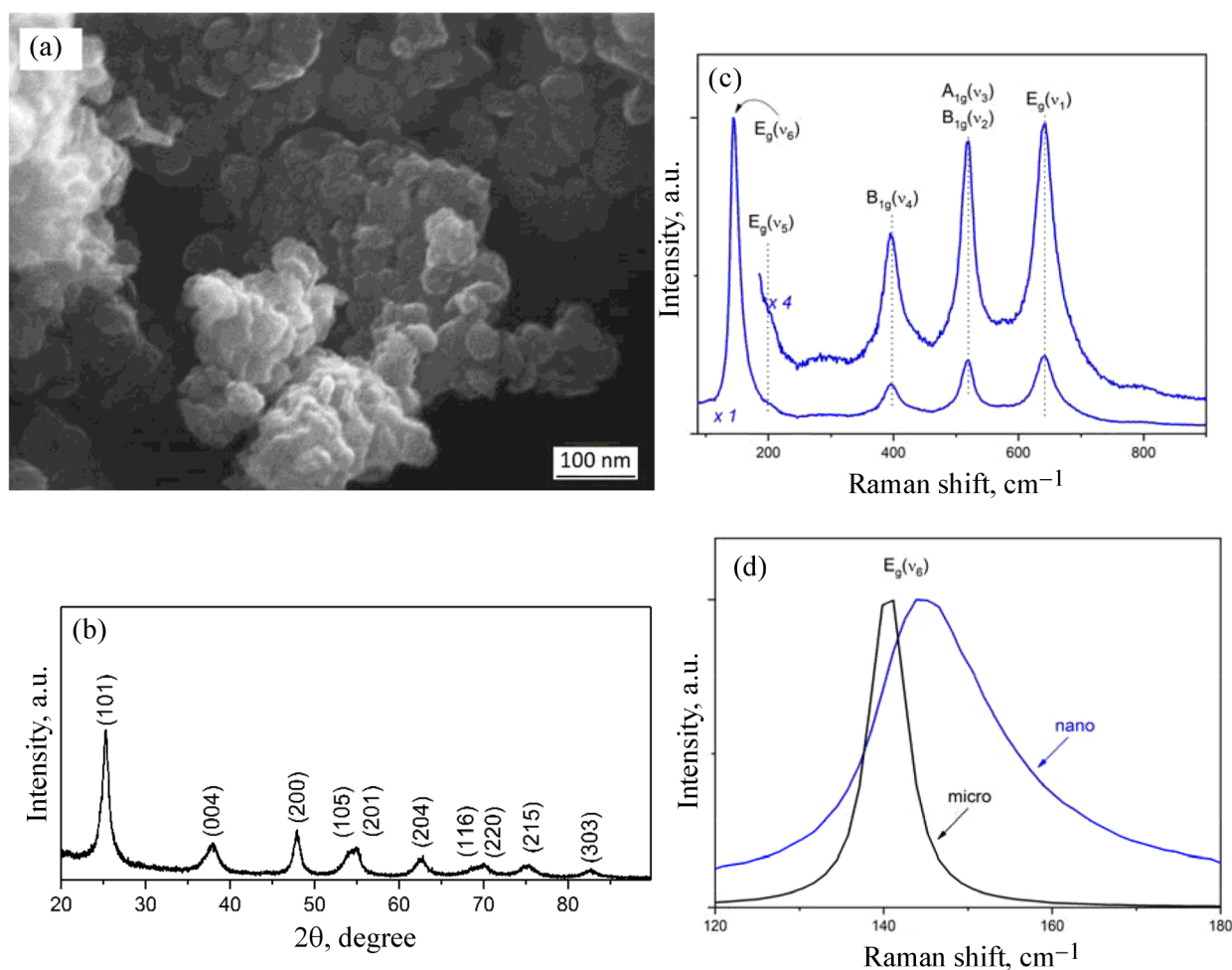


Рис. 1: Структурные свойства нанопорошка  $\text{TiO}_2$ . (a) Фотографии, полученные с помощью электронного микроскопа. (b) Рентгеновские дифрактограммы с обозначением рефлексов тетрагональной фазы анатаза. (c) Спектры комбинационного рассеяния света, записанные при температуре 77 К. (d) Фрагмент спектров КРС в области  $E_g(v_6)$  фононной моды. Фрагмент спектра КРС микрокристалла анатазной фазы приведен для сравнения.

В данной работе мы имитировали поведение токсичной нанодисперсии добавлением в коммерчески доступную пищевую добавку E171 (Evonik Degussa GmbH), которая представляет собой порошок  $\text{TiO}_2$  в форме анатаза с характерным размером кристаллов 1–20 мкм, НЧ анатазной фазы размером  $\sim 6$ –12 нм, полученных жидкофазным методом. При таких размерах НЧ анатазная фаза  $\text{TiO}_2$  является высокотоксичной. В форме порошка частицы демонстрировали склонность к формированию агломератов, см. рис. 1(a).

Рис. 1(b) иллюстрирует рентгеновские дифрактограммы для выбранного нанопорошка, полученные с использованием дифрактометра Panalytical Expert Pro MRD. Как видно из рисунка, наблюдаются только уширенные рефлексы тетрагональной фазы анатаза. Измерения полуширины отдельных рефлексов и аппроксимация рентгеновских кривых позволяют утверждать, что средний размер нанокристаллов порядка  $\sim 10$  нм. На рис. 1(c) приведены спектры комбинационного рассеяния света (КРС) в выбранном нанопорошке  $\text{TiO}_2$ , полученные при облучении кристаллов излучением с длиной волны 472 нм. Измерения проводились при температуре 77 К, спектральное разрешение лабораторного спектрографа составляло  $1 \text{ см}^{-1}$ . В спектрах как микро, так и нано-фракции доминирует линия, соответствующая моде  $E_g(\nu_6)$ , которая включает в себя растяжение O–Ti–O связи вдоль оси  $a$  решётки анатаза [9]. Положение линии  $E_g(\nu_6)$  для микрокристаллов  $\text{TiO}_2$  составляет  $140 \text{ см}^{-1}$ , в то время как для нано-фракции линия  $E_g(\nu_6)$  сдвинута в длинноволновую область за счет размерных эффектов [10, 11]. Детали этого эффекта показаны на рис. 1(d). Сдвиг и уширение линии  $E_g(\nu_6)$  на  $\sim 5 \text{ см}^{-1}$  позволяют независимо оценить средний размер кристаллических зерен в нанопорошке  $\text{TiO}_2$ , который составляет  $\sim 6$ –10 нм. В более высокочастотной области регистрируются линия  $E_g(\nu_5)$  в районе  $196 \text{ см}^{-1}$  и триплет  $395 \text{ см}^{-1}$ ,  $514 \text{ см}^{-1}$  и  $637 \text{ см}^{-1}$ , отвечающий модам  $B_{1g}(\nu_4)$ , смеси мод  $A_{1g}(\nu_3)$  и  $B_{1g}(\nu_2)$  и моде  $E_g(\nu_1)$ , соответственно. Все описанные линии являются характерными для спектров КРС анатазной фазы  $\text{TiO}_2$  [9, 12]. Признаков других фаз  $\text{TiO}_2$  в нанопорошке не регистрируется.

Таким образом, отобранный для исследований порошок представляет собой  $\text{TiO}_2$  в форме анатаза и не содержит заметных включений других фаз. Характерный размер кристаллических зерен составляет  $\sim 6$ –12 нм.

Распределение частиц по размерам при различных значениях  $pH$  раствора, предварительно в течение 10 минут обработанного ультразвуком [13], определялись методом динамического рассеяния света (ДРС) с помощью Photocor Compact-Z. Изменение  $pH$  производилось добавлением в бидистиллированную воду HCl и NaOH и контролиро-

валось  $pH$ -метром. Все измерения проводились при температуре 23 °С. Концентрация измеряемого образца в водной суспензии составляла 100 мг/л, что приблизительно соответствует содержанию E171 в восстановленных молочных продуктах. Следует отметить, что при такой концентрации можно, по-видимому, пренебречь артефактными пиками распределения, связанными с пересечением отдельными частицами границ объема рассеяния [14].

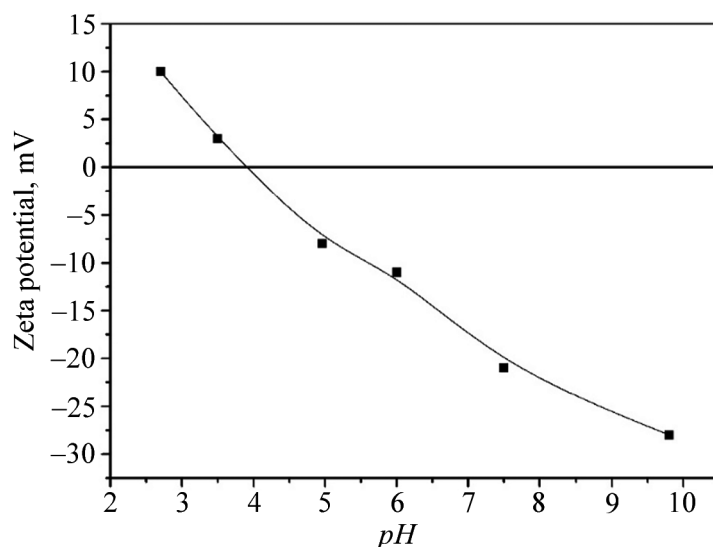


Рис. 2: Зависимость дзета-потенциала водной суспензии нанодисперсии  $TiO_2$  от  $pH$ .

Устойчивость коллоидной системы частиц, как правило, определяется дзета-потенциалом, который представляет собой разность потенциалов между неподвижным слоем жидкости, окружающим частицу, и дисперсионной средой. Коллоидная система считается устойчивой, если абсолютное значение дзета-потенциала превышает 30 мВ. Зависимость дзета-потенциала полученных водных растворов от значения  $pH$  показана на рис. 2. Измерения дзета-потенциала также проводились на Photocor Compact-Z.

Как видно из рис. 2, в нейтральной водной суспензии  $TiO_2$  ( $pH = 6.2$ ) значение потенциала составляло  $-20$  мВ. Наиболее нестабильным водный раствор является при  $pH \sim 3.5$ , при котором значение потенциала приближается к нулю (изоэлектрическая точка). При уменьшении  $pH$  от 3.5 до 2.6 наблюдался рост дзета-потенциала до  $+10$  мВ. Это означает, что при попадании продуктов с нейтральным  $pH$  в желудок человека значение дзета-потенциала проходит через нуль. Отметим, что устойчивость водного раствора, соответствующая дзета-потенциалу  $-30$  мВ, достигается в щелочной среде при  $pH \sim 9.6$ .

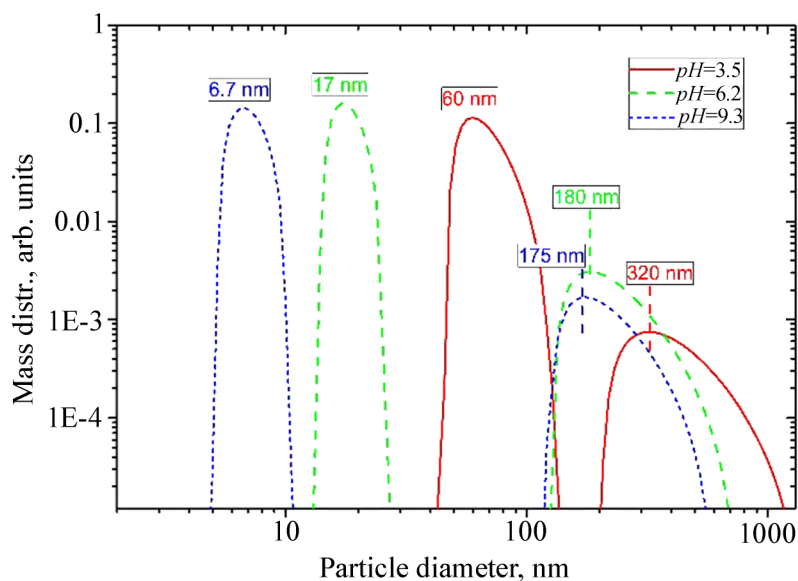


Рис. 3: Распределение по размерам водной суспензии наночастиц  $\text{TiO}_2$  при различной активной кислотности водного раствора.

На рис. 3 показаны распределения по размерам, полученные для нанопорошка  $\text{TiO}_2$  при разных значениях активной кислотности. Из корреляционной функции, измеренной коррелятором прибора Photocor Compact-Z, с помощью программы DynaLS были получены распределения интенсивности рассеянного света по размерам НЧ. Распределение по массе было получено пересчетом из распределения интенсивности с помощью теории Ми. Встроенный в DynaLS и другие аналогичные программы алгоритм такого пересчета основан на предположении о зависимости интенсивности рассеяния от радиуса частицы как  $r^k$ , где  $k = 6$  для мелких и  $k = 5$  для крупных частиц, и дает лишь качественную оценку. Поэтому для перехода от распределения по интенсивности к распределению по массе использовалась теория Ми в предположении, что плотность и показатель преломления всех частиц равен показателю преломления  $\text{TiO}_2$ . Измерения сигнала ДРС проводились после выстаивания раствора в течение двух часов. Как видно из рисунка, при  $pH = 9.6$  доминируют частицы диаметром 6.7 нм, что согласуется со средним размером кристаллических зерен, измеренным с помощью спектроскопии КРС и рентгеноструктурного анализа. Это подтверждает сделанный вывод о том, что при  $pH = 9.6$  коллоидная система наночастиц является агрегативно устойчивой. Также наблюдаются крупные частицы размером  $\sim 180$  нм. Т.е. распределение частиц является бимодальным, что характерно для многих коллоидных систем [15]. Уменьшение  $pH$  до

6.2 слабо сказывается на крупных частицах, но приводит к заметному укрупнению мелких. Это означает, что в нейтральных растворах токсичные наночастицы существуют в форме агломератов диаметром  $\sim 20$  нм. Наконец, при уменьшении  $pH$  до 3.5 (соответствует нулю дзета-потенциала) наблюдается резкое укрупнение как мелких, так и крупных агломератов. Измеренная взаимосвязь между значениями дзета-потенциала и распределениями частиц по размерам показывает, что агрегативная устойчивость водных суспензий нанодисперсии диоксида титана определяется ионно-электростатическим фактором в согласии с теорией ДЛФО [16].

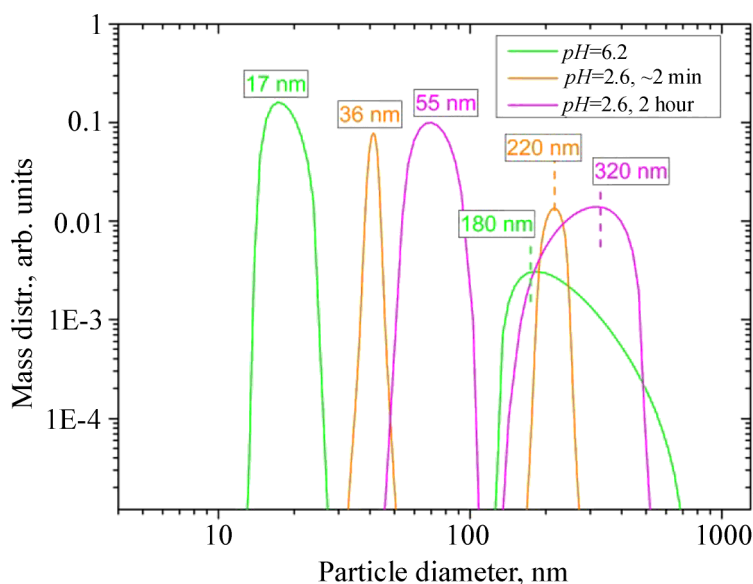


Рис. 4: Типичная эволюция распределения наночастиц по размерам при изменении активной кислотности водной суспензии наночастиц  $TiO_2$  от  $pH = 6.2$  до  $pH = 2.6$ .

Рис. 4 демонстрирует динамику распределения размера нанодисперсии  $TiO_2$  при снижении  $pH$  раствора от 6.2 до 2.6. После снижения  $pH$  в суспензии происходят структурные изменения, приводящие к укрупнению более мелких агломератов, что хорошо видно по смещению соответствующего пика распределения. Причем основные изменения проходят в течении нескольких минут. В частности, в течении двух минут средний размер мелких агломератов возрастает примерно вдвое. При дальнейшем выстаивании наблюдаются лишь медленные изменения – через два часа после увеличения  $pH$  еще в  $\sim 1.5$  раза увеличивается средний размер мелких агломератов и происходит незначительное смещение центра тяжести распределения в сторону крупных частиц. Обнаруженная “быстрая” динамика связана, по-видимому, с тем, что при изменении  $pH$  от

нейтрального до кислого, соответствующего человеческому желудку, дзета-потенциал проходит через изоэлектрическую точку. В итоге, при  $pH = 2.6$  в коллоидной системе сохраняется заметная доля мелких НЧ.

Таким образом, исследована агрегация частиц нано- и субмикронного размеров, содержащихся в пищевой добавке E171, при ее попадании в кислотную среду с  $pH$ , соответствующем желудку человека. Для этого проведен анализ агрегации наночастиц  $TiO_2$  (анатаз) размером  $\sim 10$  нм и  $\sim 200$  нм при увеличении/уменьшении активной кислотности водного раствора. Показано, что стабильность суспензии наночастиц достигается при  $pH \sim 9.6$ . Уменьшение  $pH$  от 9.6 до 6.2 (нейтральный) приводит к увеличению дзета-потенциала от  $-30$  до  $-20$  мЭВ и сопровождается формированием наноагломератов размером  $\sim 20$  нм. По мере дальнейшего смещения  $pH$  до значения  $\sim 2.6$ , соответствующего желудку человека, дзета-потенциал увеличивается до  $+10$  мВ. Это сопровождается укрупнением наноагломератов, причем наиболее существенное увеличение среднего размера наноагломератов до  $\sim 40$  нм наблюдается в течение нескольких минут после увеличения кислотности. Полученные данные указывают на то, что нанодисперсия быстро агрегируется в кислой среде с  $pH$ , соответствующем человеческому желудку. Однако ее дальнейший переход вместе с пищей в тонкий кишечник, где уровень  $pH \sim 8$ , может снова приводить к появлению наноагломератов характеризующихся сравнительно высокой проникающей способностью через клеточные мембраны. Проникающая способность может также возрастать при употреблении E171 в сочетании с продуктами, уменьшающими активную кислотность, такими, в частности, как большинство свежих овощей и фруктов.

В целом, полученные результаты указывают на то, что при изучении воздействия E171 на организм человека следует принимать во внимание процессы, связанные с изменением активной кислотности в пищеварительной системе человека. В дальнейшем планируется изучение кинетических зависимостей изменения агрегации наночастиц диоксида титана при изменении  $pH$  и при их взаимодействии с макромолекулами пищи.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (Грант “Микромир” # 19-05-50145). Работа выполнена при поддержке РФФИ (гранты 19-02-00750-а, 19-02-00440-а и 20-52-00002-Бел\_а) и БРФФИ (грант Ф20Р-013).

#### ЛИТЕРАТУРА

- [1] X. Chen, Y. Zhu, K. Yang, et al., Environ. Pollut. **247**, 421 (2019).  
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.01.022>.



- [2] C. Xue, J. Wu, F. Lan, et al., J. Nanosci. Nanotech. **10**, 8500 (2010). <https://doi.org/10.1166/jnn.2010.2682>.
- [3] S. A. Ferraro, M. G. Domingo, A. Etcheverrito, et al., J. Trace. Elem. Med. Biol. **57**, No. 126413, (2020). <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2019.126413>.
- [4] K. Krüger, K. Schrader and M. Klempt, Nanomaterials **7**(4), 79 (2017). <https://doi.org/10.3390/nano7040079>.
- [5] F. Li, Z. Liang, X. Zheng, et al., Aquat. Toxicol. **158**, 1 (2015). <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.10.014>.
- [6] Sivakumar Murugadoss, Frederic Brassinne, Noham Sebaihi, et al., Particle and Fibre Toxicology **17**, 1 (2020). <https://doi.org/10.1186/s12989-020-00341-7>.
- [7] R. J. B. Peters, H. Bouwmeester, S. Gottardo, et al., Trends Food Sci. Tech. **54**, 155 (2016). <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.06.008>.
- [8] G. J. Nohynek, J. Lademann, C. Ribaud and M. S. Roberts, Crit. Rev. Toxicol. **37**, 251 (2007). <https://doi.org/10.1080/10408440601177780>.
- [9] S. K. Mukherjee and D. Mergel, J. Appl. Phys. **114**, No. 013501, (2013). <https://doi.org/10.1063/1.4811682>.
- [10] W. F. Zhang Y. L. He, M. S. Zhang, et al., J. Phys. D: Appl. Phys. **33**, No. 912, (2000). <https://doi.org/10.1088/0022-3727/33/8/305>.
- [11] K. R. Zhu, M. S. Zhang, Q. Chen, and Z. Yin, Phys. Lett. A **340**, 220 (2005). <https://doi.org/10.1016/j.physleta.2005.04.008>.
- [12] T. Ohsaka, F. Izumi and Y. Fujiki, J. Raman Spectrosc. **7**, 321 (1978). <https://doi.org/10.1002/jrs.1250070606>.
- [13] И. С. Бурханов, Л. Л. Чайков, Н. А. Булычев, М. А. Казарян, Краткие сообщения по физике ФИАН **41**(10), 38 (2014). <https://doi.org/10.3103/S1068335614100054>.
- [14] М. Н. Кириченко, А. Т. Саноева, Л. Л. Чайков, Краткие сообщения по физике ФИАН **43**(8), 32 (2016). <https://doi.org/10.3103/S1068335616080066>.
- [15] M. N. Kirichenko, L. L. Chaikov, A. V. Shkirin, et al., Physics of Wave Phenomena **28**(2), 150 (2020). <https://doi.org/10.3103/S1541308X20020077>.
- [16] Б. В. Дерягин, Н. В. Чураев, В. М. Муллер, *Поверхностные силы* (М., Наука, 1985). <https://doi.org/10.1002/bbpc.198800264>.

Поступила в редакцию 27 апреля 2021 г.

После доработки 8 июля 2021 г.

Принята к публикации 9 июля 2021 г.