

市售口香糖及糖果中二氧化鈦微粒之奈米性檢驗研究

張詠聖 廖家鼎 曾素香 周秀冠 陳惠芳

食品藥物管理署研究檢驗組

摘要

本研究針對市售口香糖及糖果進行奈米性檢測方法之開發及市售產品調查。結果發現7件市售口香糖及2件市售糖果，平均粒徑介於183至325 nm之間，表面電荷則介於-5至-56 mV之間。表面積介於5.28至8.18 m²/g之間。經由穿透式電子顯微鏡確認，9件市售產品中之TiO₂微粒以橢圓形及方形為主，有聚集的情形發生，其顆粒平均粒徑介於69至237 nm之間，而其元素組成皆以鈦為最主要元素。此外TiO₂聚集程度主要以2至5顆的TiO₂聚集顆粒為主，佔32.2%，聚集後的平均粒徑為417.7 ± 242.1 nm。另，發現9件市售口香糖及糖果其粒徑不到歐盟所規範的奈米尺寸(1-100 nm)，但也達接近的「次微米」等級。

關鍵詞：二氧化鈦、奈米性、粒徑

前言

二氧化鈦(titanium dioxide, TiO₂)，主要是用來作為白色色素，因為其亮度及折射率高且抗變色。每年全球二氧化鈦的使用量大約有數百萬噸。近70%的二氧化鈦當作油漆的顏料，也可用於釉料、瓷器、塑料、食品色素、藥品、化妝品及牙膏等產品。目前許多硬糖及口香糖皆添加二氧化鈦作為白色色素，因其具有高亮度、抗變色之特性。其他二氧化鈦使用包括抗微生物應用、空氣與水淨化的催化劑及醫療應用。近年來，TiO₂奈米材料極受關注，在2005年，奈米二氧化鈦在全球生產量估計約2,000噸，價值7,000萬元，大約1,300噸在個人護理產品，例如外用防曬乳及化粧品，到了2010年，生產量增加至5000噸，產量預計會繼續增加直到2025年，對奈米二氧化鈦的依賴必然更大。許多來源可能導致奈米二氧化鈦與人類接觸及進入環境(空氣、水或土壤間)⁽¹⁾。

食品級TiO₂(稱為E171)可作為合成形式的

銳鈦礦(anatase)、金紅石(rutile)及其他晶形。對於食品級TiO₂形式的大小或表面性能與混晶型TiO₂(P25)上的龐大的數據量相比，我們所知甚少，因此，每一年數百萬噸的TiO₂著色劑，檢測應著重於食品級二氧化鈦，而不是在許多環境、健康及安全測試⁽²⁾。

International Organization for Standardization (ISO)於2012年5月提出「ISO/DTR 13014：奈米技術-人造奈米物質在進行毒性評估時，所需要的物化特性分析」之標準導引⁽³⁾。為理解新穎物質對人類及環境的潛在健康風險，毒理學評估是一個重要步驟。奈米物質的發現提供了一個新興和未知的參數，在毒理學上必須儘快定義。ISO/DTR 13014可提供在毒物分析或製造奈米物件時，物理化學特性的最重要性。在進行毒性分析評估時，所需要的物化參數包括：

(一)粒徑大小及粒徑尺寸分布(Particle size & particle size distribution)：經分析有相同物理性質、化學性質的三維物質的三維尺寸

及三維物質顆粒大小的函數累積分布。

- (二) 聚集 / 團聚狀態 (Aggregation / agglomeration)：弱鍵結的粒子的聚合或團聚產生的外表和個體元素總合的表面。團聚意即一粒子有著強力的鍵結或是為混合的粒子。
- (三) 形狀(Shape)：三維粒子的幾何外部形狀。
- (四) 表面積/比表面積(Surface area/specific surface area)：三維粒子的外表面面積，若為多孔物質則需再計算孔內表面積。
- (五) 組成成份(Composition)：奈米物質的屬性成分和每一個具體組成的內容物。
- (六) 表面化學(Surface chemistry)：物質表面的化學特性。
- (七) 表面所帶電荷(Surface charge)：物質表面的電荷。
- (八) 溶解度/分散性(Solubility/dispersibility)：奈米物質在特定的條件下，且於特定溶劑中之最高可溶質量及物質和離散粒子狀態存在之程度。

ISO/DTR 13014針對各參數提供了一組相關的理化性質，以及相對應的描述，如相關性，測量值和測量方法，這些物化特性應該在毒理評估之前確定，以便建立奈米材質的性質和試驗結果之間的相關性⁽³⁾。解釋標準中所描述的這些關係將建立新奈米材質更有效的健康和安全風險特性的描述，這個導引對研究奈米材質的毒性效用可能會有所幫助。

本研究針對國內新興奈米食品市場進行調查，最常見的奈米相關食品為含有奈米化食品添加劑的產品，如奈米鈣、奈米鐵等。有文獻指出市售口香糖中添加之二氧化鈦多為奈米級二氧化鈦微粒，而口香糖是國人喜愛、普遍食用的產品，為了解市售口香糖中普遍添加的 TiO₂是否為奈米等級，本研究以口香糖及糖果中二氧化鈦為研究對象，進行奈米性八大參數檢測，盼能建立一些基礎資料，供行政單位將來訂定法規時之參考。

材料與方法

一、材料

由賣場購物通路購買市售9件標示含二氧化鈦口香糖及2件標示含二氧化鈦糖果，分別給予編號G1-G7及C1-C2。

二、試藥與試劑

去離子水、0.5%六偏磷酸鈉溶液及無水乙醇。

三、儀器設備

- (一) 動態光散射儀(Zetasizer Naon ZS, Malvern, England)
- (二) 穿透式電子顯微鏡(JEM-2100, JEOL, Japan)
- (三) 雙槍聚焦粒子束及掃瞄式電子顯微鏡系統 (FEI NOVA-600, FEI, USA)
- (四) 比表面積與孔洞分佈測量儀(Tristar 3000, Micrometry, USA)
- (五) 樣品真空除氣裝置(Vac Prep 601, Micrometry, USA)
- (六) 新型濕式及乾式微晶片電子顯微鏡樣品槽 (K-Kit Transmission Electron Microscope, MA-tek, Taiwan)
- (七) 微量分注器(Pipetman, Gilson, USA)
- (八) 倒立式光學顯微鏡(Inverted Microscope, Laica DMIL, Germany)
- (九) 離心機(Centrifuge, Eppendorf 5702, USA)
- (十) 超音波震盪器(Ultrasonicator, VCX-600, Sonics&Materials Inc., Connecticut, USA)
- (十一) 旋渦混合器(Vortex-Genie 2 mixer, Scientific Industries, Inc., USA)
- (十二) 奈米粒子追蹤分析系統(LM14, Nanosight, UK)

四、市售口香糖及糖果中二氧化鈦微粒之純化分離方法

口香糖及糖果中二氧化鈦微粒之純化分離方法參考Chen (2012)等人的方法並加以修改。

將口香糖或糖果置入50 mL離心管中，加入去離子水15 mL，振盪搖晃5分鐘溶解口香糖基質外部糖衣後，以5000 rpm離心20分鐘，去除口香糖基質及上清液，接著以去離子水10 mL清洗沉澱物，再以丙酮10 mL清洗沉澱物兩次，最後以酒精10 mL清洗沉澱物。每個清洗步驟完成後，以5000 rpm離心20分鐘，去除上清液後再進行下一個清洗步驟。將得到的沉澱物自然乾燥後，以能量光譜散射儀進行元素分析，藉以確認純化分離出的沉澱物顆粒中是否含有鈦元素存在(圖一)⁽²⁾。

五、市售口香糖及糖果中二氧化鈦微粒之動態光散射儀粒徑量測

精稱二氧化鈦樣品0.3 g，加入預以0.2 μm 濾膜過濾之0.5%六偏磷酸鈉水溶液30 mL，混合均勻後靜置30分鐘，取出中間層懸浮液10 mL(避開上層泡沫)，以1500 rpm轉速離心，取1 mL加入樣品槽，經超音波振盪300秒，確實擦拭樣品槽透光面後置入動態光散射儀進行量

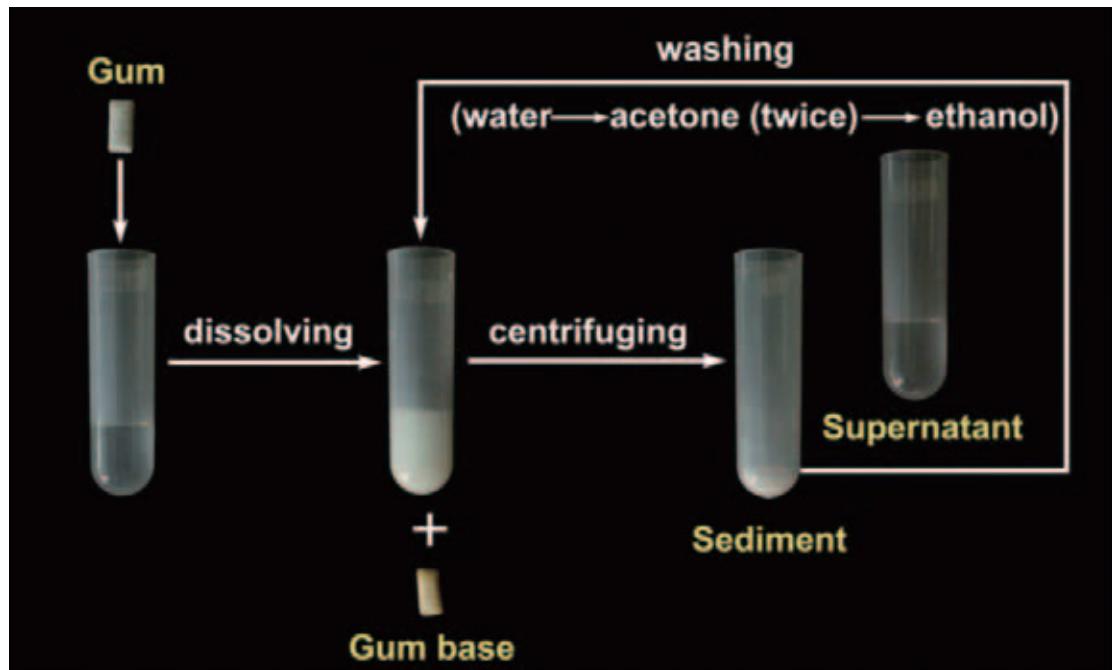
測，過程中避免氣泡產生。動態光散射儀平衡時間150秒，平衡溫度25°C，量測角度173°，六偏磷酸鈉溶液之pH值為7，量測過程與結果必須符合儀器內部的品質評估系統(quality report system)，單一樣品重複量測6次，取其平均值為量測結果。

六、穿透式電子顯微鏡(TEM)量測

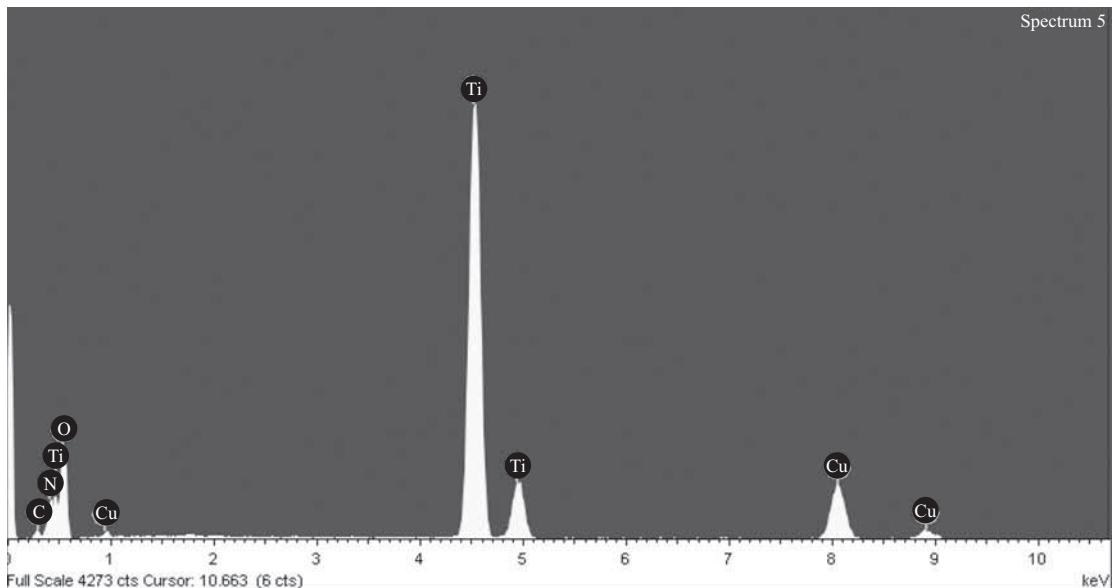
將鍍碳銅網置於樣品載台上，使奈米顆粒溶液(量測粒徑之濃度再稀釋1,000倍)充分混合分散於無水乙醇中後滴於鍍碳銅網上，以濾紙吸除多餘乙醇，於室溫下風乾後送入穿透式電子顯微鏡之真空樣品槽進行電子束成像。加速電壓為80 kV，以照相系統擷取影像。藉此確認奈米懸浮液之粒徑大小，並觀察顯微結構。

七、比表面積與孔洞分佈測量儀量測

在樣品管套上恆溫套(isothermal jacket)、杜爾瓶蓋、連接螺帽、金屬圈、O型環，依序鎖上連接配件，並重複以上步驟，將三個樣品



圖一、市售口香糖及糖果中二氧化鈦之純化分離方法流程⁽²⁾



圖二、市售口香糖中二氧化鈦之能量散射光譜儀(EDS)分析圖譜

管皆連接到TriStar 3000表面積孔洞分析儀上。用液態氮倒到杜爾瓶中至八分滿，利用量液尺測量液面，再補充液態氮至液面高度剛好超過液面指示標記，接著進行分析。

八、新型溼式及乾式微晶片電子顯微鏡樣品槽聚集程度量測

使用專利微晶片樣品槽技術製備複雜溶液環境樣品之電子顯微鏡試片，用於觀測成分顆粒在其溶液環境下之聚集/凝集狀態。使用 $2.0\text{ }\mu\text{m}$ 微晶片樣品槽取樣樣品溶液進行樣品製備用於觀察粒徑小於 $2,000$ 奈米的成分顆粒型態。試片在真空環境下乾燥以利進行電子顯微鏡觀測，樣品滴乾在銅網上用於利用元素光譜分析成分顆粒組成。使用Image J影像軟體進行成分顆粒與其聚集/凝集狀態分析(顆粒粒徑 = [長 + 寬]/2)。每一微晶片試片統計4-10張隨機選取的影像($4.0\text{ }\mu\text{m} \times 5.4\text{ }\mu\text{m}$)中全部觀測到的顆粒，每一樣品分析200顆以上之微粒。

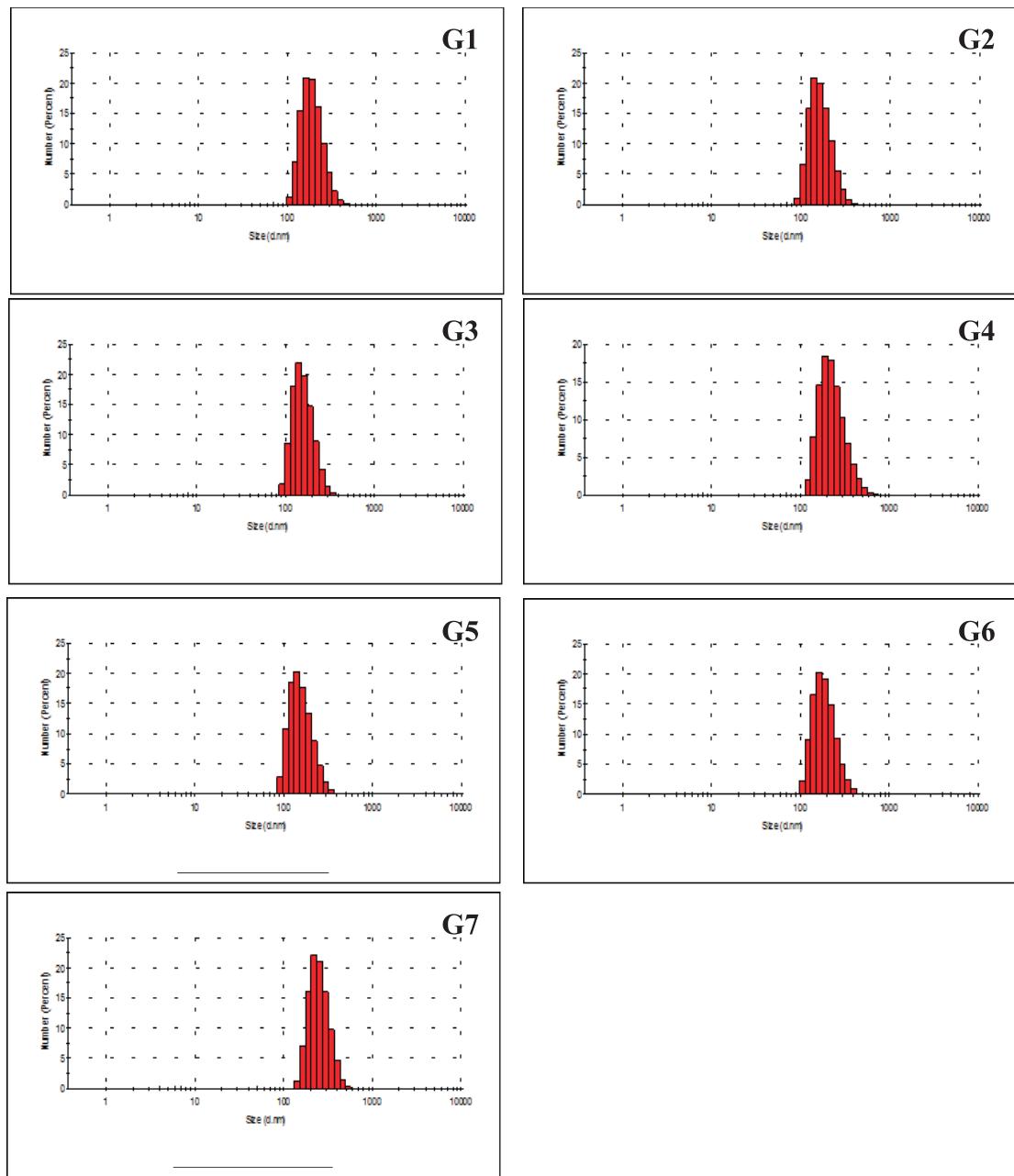
九、市售口香糖及糖果中二氧化鈦微粒之奈米粒子追蹤分析

精稱各廠牌二氧化鈦樣品 0.3 g ，加入預以 $0.2\text{ }\mu\text{m}$ 濾膜過濾 0.5% 六偏磷酸鈉溶液 30 mL ，振盪搖晃均勻後，以去離子水稀釋至適合倍數進行量測，使用 1 mL 注射針筒注入LM14，過程應避免氣泡產生。平衡溫度 25°C ，溶液黏度 0.89 cp ，單一樣品量測60秒鐘。

結果與討論

一、粒徑大小及粒徑尺寸分布

於市售口香糖及糖果中的二氧化鈦純化微粒添加 0.5% 六偏磷酸鈉溶液靜置 0.5 小時後，以 1500 rpm 低速離心 20 分鐘後進行動態光散射儀量測。7件口香糖產品中的二氧化鈦粒徑分別為 215 ± 2.7 、 196 ± 1.3 、 183.8 ± 1.6 、 282 ± 3.6 、 192.4 ± 0.5 、 219.3 ± 1.6 及 $324.8 \pm 25.8\text{ nm}$ (圖三)； $1-100\text{ nm}$ 粒子百分比分別為 1.3 、 7.7 、 10.4 、 0 、 13.6 、 2.2 及 0% (表一)，平均分散係數(polydisperse-index, PDI)在 0.119 ± 0.02 左右。2件糖果產品中的二氧化鈦粒徑分別為 $210.3 \pm 33.1\text{ nm}$ 及 $225.2 \pm 1.9\text{ nm}$ (圖四)； $1-100\text{ nm}$ 粒子百分比分別為 25.5% 及 3.1% (表一)，平均PDI在 0.229 ± 0.03 左右。



圖三、7件市售口香糖中二氧化鈦之粒徑分布圖

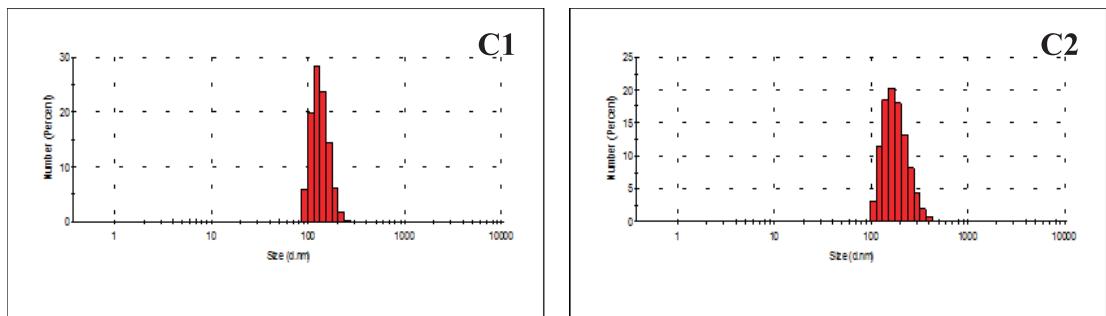
於市售口香糖及糖果中的二氧化鈦純化微粒以0.5%六偏磷酸鈉水溶液稀釋至1,000倍後，進行奈米粒子追蹤分析系統量測。7件口香糖產品中的二氧化鈦粒徑分別為 173 ± 70 、 222 ± 91 、 293 ± 81 、 222 ± 95 、 167 ± 60 、

191 ± 78 及 243 ± 93 nm；1-100 nm粒子百分比分別為26.0、15.4、2.1、14.5、22.9、20.4及11.5%。2件糖果產品中的二氧化鈦粒徑分別為 248 ± 80 nm及 153 ± 63 nm；1-100 nm粒子百分比分別為4.8及32.2%。

表一、9件市售口香糖及糖果中二氧化鈦之奈米性檢測

	粒徑			表面電荷 (n=6)	組成成分	表面積 (n=3)	顆粒形態
	平均粒徑 (n=6)	1-100 nm粒子 (%)	產品標示				
G1	215.0 nm	1.3	TiO ₂	-35.3 mV	Ti, C, O	7.8 m ² /g	橢圓形及方形
G2	196.0 nm	7.7	TiO ₂	-37.5 mV	Ti, C, O	8.1 m ² /g	橢圓形及方形
G3	183.8 nm	10.4	TiO ₂	-35.2 mV	Ti, C, O	6.9 m ² /g	橢圓形及方形
G4	282.0 nm	0.0	TiO ₂	-31.2 mV	Ti, C, O	5.9 m ² /g	橢圓形及方形
G5	192.4 nm	13.6	TiO ₂	-56.5 mV	Ti, C, O	6.0 m ² /g	橢圓形及方形
G6	219.3 nm	2.2	TiO ₂	-42.0 mV	Ti, C, O	6.6 m ² /g	橢圓形及方形
G7	324.8 nm	0.0	TiO ₂	-5.7 mV	Ti, C, O	5.2 m ² /g	橢圓形及方形
C1	210.3 nm	25.5	TiO ₂	-36.8 mV	Ti, C, O	7.4 m ² /g	橢圓形及方形
C2	225.3 nm	3.1	TiO ₂	-26.4 mV	Ti, C, O	6.4 m ² /g	橢圓形及方形

註：G：表口香糖；C：表糖果



圖四、2件市售糖果中二氧化鈦之粒徑分布圖

Chen (2012)等人的研究中，使用NTA量測6件口香糖中二氧化鈦粒徑範圍從80至160 nm，而口香糖中主要為小於200 nm的二氧化鈦顆粒，百分比61-92%，本次研究中所量測到的二氧化鈦粒徑範圍在153至324 nm，和Chen (2012)所量測的粒徑範圍相近。

二、表面所帶電荷

於市售口香糖及糖果中的二氧化鈦純化微粒添加0.5%六偏磷酸鈉溶液靜置0.5小時後，以1500 rpm低速離心20分鐘後進行動態光散射儀量測。7件口香糖產品中的二氧化鈦表面電荷分別為-35.3 ± 2.3、-37.5 ± 2.4、-35.2 ± 4.8、-31.2 ± 2.2、-56.5 ± 2.3、-42 ± 2.4及-5.7 ±

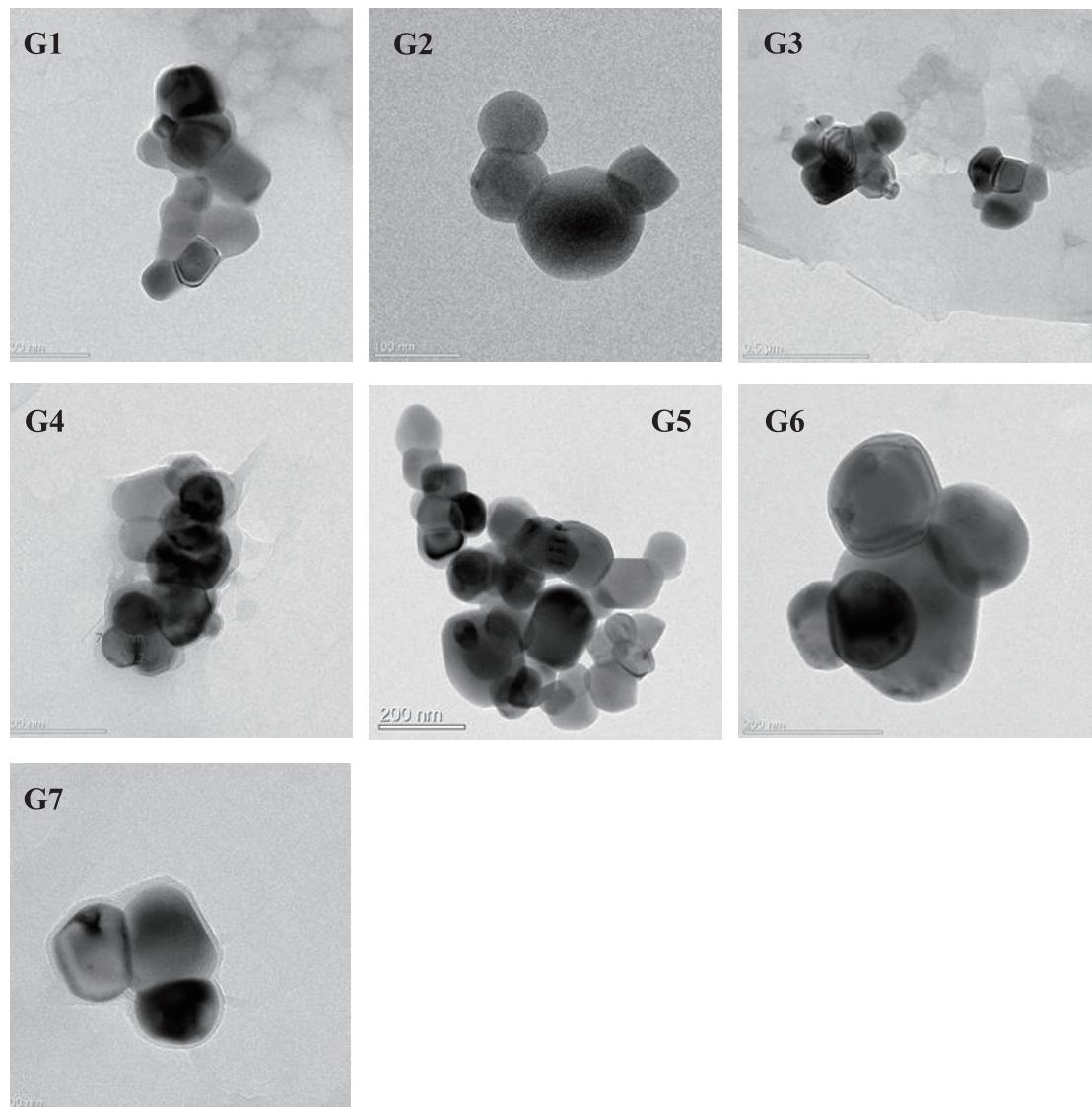
0.8 mV。2件糖果產品中的二氧化鈦表面電荷分別為-36.8 ± 2.2 mV及-26.4 ± 1.8 mV(表一)。以上結果中9件口香糖及糖果產品除了2件表面電荷在-30.0 mV以下，其他件口香糖及糖果產品之表面電荷均大於-30.0 mV，顯示口香糖及糖果產品中二氧化鈦在0.5%六偏磷酸鈉水溶液中相當穩定。此結果也與Chen (2012)等人所量測的表面電荷結果相似，其6件表面電荷分別為-42.6、-38.1、-38.9、-35.6、-24.4及-21.4 mV。

三、市售產品中二氧化鈦之型態觀察及組成分分析

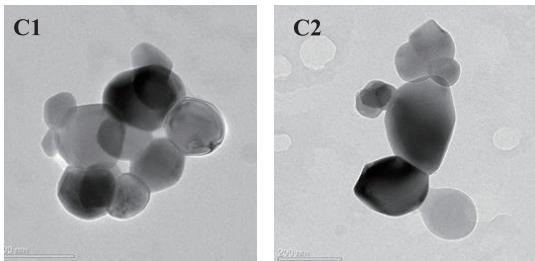
穿透式電子顯微鏡(TEM)可同時分析材

料型態、晶體結構及組成成分。以TEM觀察市售口香糖及糖果中之二氧化鈦純化微粒型態(圖五及圖六)。以穿透式電子顯微鏡進行觀察，其樣品製備只需將樣品滴於TEM專用之200 mesh鍍碳銅網上，待其樣品自然乾燥，即可進行顯微觀察，樣品之結構不易受到外力而改變。由圖五及圖六結果顯示，於穿透式顯微鏡觀察下可以發現9件口香糖及糖果中單一顆

粒的二氧化鈦形狀皆為方形或橢圓形，也有聚集的現象產生，其粒徑範圍分布為G1: 85.45-197.58 nm、G2: 76.89-152.97 nm、G3: 79.24-152.14 nm、G4: 80.24-160.52 nm、G5: 86.96-185.75 nm、G6: 117.02-236.45 nm及G7: 76.29-112.44 nm(圖五)；C1: 83.69-155.52 nm和C2: 87.44-191.92 nm(圖六)。以能量散射光譜儀(energy dispersive spectrometer, EDS)分析市售



圖五、7件市售口香糖中二氧化鈦之穿透式電子顯微鏡(TEM)影像。
(□ : 200nm)



圖六、2件市售糖果中二氧化鈦之穿透式電子顯微鏡(TEM)影像。(□ : 200nm)

口香糖及糖果中二氧化鈦純化微粒化學組成元素。結果顯示經EDS分析後，口香糖及糖果中二氧化鈦純化微粒可以得到鈦、氧、碳等元素，其中以鈦元素佔大部份，可見市售口香糖及糖果中二氧化鈦是由鈦元素成份所組成(圖二)。

Chen (2012)等人利用TEM所量測到的二氧化鈦顆粒徑範圍為40至300 nm，而本研究使用TEM所量測到9件市售口香糖及糖果產品的粒徑介於76至236 nm，也與文獻結果相似。

四、市售產品中二氧化鈦之表面積量測

歐盟EFSA於2011年9月提出針對奈米物質進行全盤風險評估的概念，其中將工程化奈米(engineered nanoscale materials, ENM)定義為人類製造之單一或多個維度或內部結構介於1到100奈米之物質或至少有50%的粒子有一維介於1到100 nm，以及其具有特定的表面積(大於 $60 \text{ m}^2/\text{cm}^3$)，但小於1 nm粒子的材料除外。表面積量測所使用的是氮氣吸附法，此測定技術是在真空與接近液態氮沸點的溫度下進行，並利用Brunauer-Emmett-Teller (BET)吸附方程式進行計算二氧化鈦純化微粒表面積。結果顯示，9件市售口香糖及糖果中二氧化鈦純化微粒之表面積分別為G1:7.8、G2:8.1、G3:6.9、G4:5.9、G5:6.0、G6:6.6、G7:5.2 m^2/g 、C1:7.4、C2:6.4 m^2/g (表一)。以TEM進行型態觀測時發現口香糖及糖果中二氧化鈦純化微粒均有大面積的大顆粒聚集，且大顆粒聚集會覆蓋小顆粒子，推測可能因此造成氮氣吸附在

二氧化鈦顆粒上的吸附量較少的原因。

五、市售產品中二氧化鈦之聚集程度

聚集程度的量測是利用新型濕式及乾式微晶片樣品槽電子顯微鏡，此項技術是由國家衛生研究院與閔康科技股份有限公司共同研發完成，可應用於觀測奈米產品中個別成分奈米顆粒之種類、形狀分佈、粒徑分布、顆粒聚集/團聚狀態及顆粒濃度。本次聚集程度是使用K kit/TEM液態樣品電子顯微鏡進行量測。

量測前需進行樣品前製備，將二氧化鈦純化微粒粉末20 mg懸浮分散於去離子水1 mL中並劇烈振盪1分鐘，使二氧化鈦水溶液分散均勻，直接將樣品注入K-kit，在K-kit中乾燥成膜處理，再置於TEM中觀察。進行量測聚集程度之前，先以EDS分析純化分離後的顆粒是否為二氧化鈦，結果顯示二氧化鈦純化微粒中同樣含有鈦元素的存在。利用TEM觀察二氧化鈦顆粒的情形，在計數總共288顆二氧化鈦顆粒後，二氧化鈦的平均直徑為 $124.0 \pm 52.8 \text{ nm}$ ，其中小於100 nm以下的奈米二氧化鈦粒子數百分比為39.9%(表二)，其長寬比(aspect ratio)為 1.18 ± 0.13 ，顯示二氧化鈦顆粒的形狀

表二、新型濕式及乾式微晶片樣品槽電子顯微鏡量測二氧化鈦顆粒之粒徑分布百分比

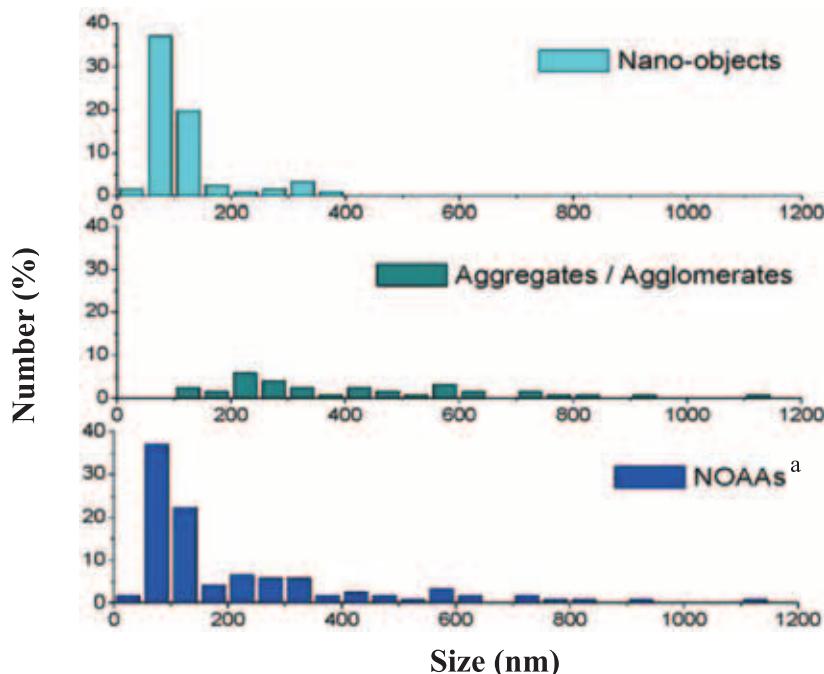
粒徑(nm)	微粒數量(%)
< 50	1.0
< 100	38.9
< 150	76.0
< 200	93.4

表三、新型濕式及乾式微晶片樣品槽電子顯微鏡量測二氧化鈦顆粒之長寬比分布

長寬比(nm)	微粒數量(%)
< 1.1	36.1
< 1.2	63.5
< 1.4	93.4
< 1.6	100.0

表四、新型濕式及乾式微晶片樣品槽電子顯微鏡量測二氧化鈦之聚集程度

微粒型態	平均粒徑(nm)	微粒百分比(%)	計數微粒數
奈米等級微粒	161.1 ± 68.5	67.8	82
聚集微粒	417.7 ± 242.1	23.2	39
奈米等級微粒+聚集微粒	213.3 ± 204.4	100.0	121



圖七、新型濕式微晶片樣品槽電子顯微鏡之二氧化鈦聚集程度

a. NOAAs: Nano-objects, and their aggregates and agglomerates.

接近於圓形(表三)；二氧化鈦顆粒經過K-kit/TEM 2 μm液態樣品槽處理後再以TEM觀察其聚集程度，由圖中可以分為初級顆粒(primary particle)及聚集/凝集顆粒.aggregate/agglomerate particles)，二氧化鈦之初級顆粒的粒徑大約在160 nm左右，與先前以DLS量測二氧化鈦之粒徑相對較小，而聚集/凝聚後二氧化鈦純化微粒的粒徑則在400 nm。經過K-kit/TEM 2 μm液態樣品槽處理後，計數共121顆二氧化鈦聚集顆粒，其中二氧化鈦的奈米顆粒有82顆，平均直徑為161.1 ± 68.5 nm；二氧化鈦聚集顆粒有39顆，平均直徑為417.7 ± 242.1 nm，經計算後二氧化鈦之聚集程度為32.2%。而奈米聚集顆

粒121顆中，平均聚集粒徑為213.3 ± 204.4 nm (表四及圖七)。

本研究可從市售口香糖及糖果中成功分離出二氧化鈦顆粒且完成ISO建議規範的奈米粒子量測參數。從結果可以得知市售口香糖及糖果中添加的二氧化鈦，雖然其粒徑不到歐盟所規範的奈米尺寸(1-100 nm)，但也達接近的「次微米」等級。

參考文獻

- Alex, W., Paul, W., Lars, F. and *et al.* 2012. Titanium dioxide nanoparticles in food and personal care products. Environ. Sci. Technol.

- 46: 2242-2250.
2. Xin-Xin, C., Bin, C., Yi-Xin, Y. and *et al.* 2012. Characterization and preliminary toxicity assay of nano-titanium dioxide additive in sugar-coated chewing gum. *Small* 9: 1765-1774.
 3. International Organization for Standardization (ISO). 2012. Executive Summary Nanotechnologies-Guidance on physico-chemical characterization of engineered nanoscale material for toxicological assessment. ISO/TR 13014. [http://www.iso.org/iso/catalogue_detail?csnumber=52334].

Physical-chemical Characterization of Titanium Dioxide Particles in Commercial Chewing Gum and Candies Products

YUN-SHEN CHANG, CHIA-DING LIAO, SU-HSIANG TSENG,
HSIU-KUAN CHOU AND HWEI-FANG CHENG

Division of Research and Analysis, TFDA

ABSTRACT

In this study, the physical-chemical characters of Titanium dioxide (TiO_2) in 9 commercial chewing gum and candies were investigated. The results showed that the average particle size of TiO_2 was from 183 to 325 nm, the surface area was from 5.28 to 8.18 m^2/g and the zeta potential was from -5 to -56 mV in 9 products signals were acquired by dynamic light scattering. Transmission electron microscope analysis showed that the shapes of TiO_2 in 9 products were mainly oval and square. Aggregated particles were found (mainly 2 to 5 units) and the amount of aggregated particles and their average size was 32.2% in average and 417.7 ± 242.1 nm, respectively. Energy dispersive spectrometer analysis indicated Titanium was the primary element of composition in particles.

Key words: titanium dioxide, physical-chemical characterization, particle size