

纳米复合材料在食品包装中的应用及其安全评价

韩伟^{①②}, 于艳军^{①②}, 李宁涛^{①②}, 王利兵^{③*}

① 国家质量监督检验检疫总局危险品中心实验室, 天津 300042;

② 天津出入境检验检疫局工业产品安全技术中心, 天津 300042;

③ 湖南出入境检验检疫局, 长沙 410004

* 联系人, E-mail: wanglb@hnciq.gov.cn

2010-04-21 收稿, 2010-12-01 接受

国家质检公益性行业科研专项基金(2009424021)和国家科技支撑计划(2006BAK02A06)资助项目

摘要 纳米技术的迅速发展使得许多基于纳米材料(NMs)的产品走进了普通人们的消费行列之中. 其中, 以纳米技术与传统包装相结合的纳米复合包装在食品包装领域中得到了快速的发展, 在整个纳米技术的应用领域中处于领先地位, 有利地推动了纳米产业链的快速发展. 针对这种情况, 本文就近年来国内外纳米复合材料在食品包装中的应用, 以及纳米复合包装材料中 NMs 的检测和表征及其健康危害评估进行综述, 为我国相关的食品包装材料生产和经营企业, 消费者和政府相关管理部门提供有价值的参考.

关键词

食品
包装材料
纳米材料
复合材料
安全评价

近年来, 纳米技术在食品产业链中取得了快速的发展. 在食品加工过程中, 添加的纳米颗粒(NPs)以其尺寸小(≤ 100 nm), 比表面积大和表面活性高的特点, 可有效提高食品的口味, 改善食品的质地和颜色, 提高食品中营养成分被吸收的几率, 为人们的健康带来益处^[1~4]; 在食品包装行业, 纳米复合材料以其抗菌效果好、机械强度高、阻隔能力强的特点在现代食品包装市场上取得了快速发展^[5]. 纵观整个食品产业链, 纳米技术在包装上的应用要快于食品本身, 其原因就在于没有强有力的实验数据证明 NMs 是相对安全的前提下, 人们对直接添加在食品中的 NPs 的安全性仍然是心存疑虑的; 而且, 从技术角度来看, NMs 与塑料薄膜、玻璃、陶瓷、纸张等包装材料的复合要比食品中营养成分的纳米化, 营养成分传输工具的纳米化以及纳米传感器的生产和制造工艺成熟, 且易于工业化.

咨询公司 Helmut Kaiser 在 2007 年公布的一份市场调研报告中指出, 全球纳米复合食品包装材料的种类已经从 2003 年的不足 40 种发展到 2006 年的 400 余种, 预计在未来的 10 年内, 纳米复合包装材料将

会占到整个食品包装产值的四分之一, 销售额将达到 1000 亿美元(www.foodproductiondaily.com/Packaging/Future-nanopackaging-market-worth-billions-says-study). 纳米技术之所以能够在传统的食品包装产业中取得快速的发展, 主要原因是人们普遍认为 NMs 在传统包装材料中的复合“固定”将不会影响食品的质量安全. 然而, 理论和实验证明, NPs 在包装材料中有向食品迁移的动力和趋势^[6]; 同时, 来自美国、欧盟、日本、韩国和我国在内一系列的评估报告显示, NMs 具有一定的健康危害特性, 其危害程度、危害方式与其尺寸、形貌以及表面性质有关^[7]. 这些研究结果引发了人们对 NMs 安全性的担忧. 为此, 欧盟于 2008 年 11 月 16 日在比利时首都布鲁塞尔召开的 REACH 当局第六次会议上正式将 NMs 作为工业原料纳入监管范围, 并就如何监管 NMs 提出了可行性的指导原则^[8].

本文在总结有关纳米复合材料的文献、报告和网路资源的基础上, 就目前 NMs 在食品包装中的应用, 安全评价以及复合包装中 NPs 的检测技术和现阶段存在的问题进行总结, 为国内生产和经营纳米

英文版见: Han W, Yu Y J, Li N T, et al. Application and safety assessment for nano-composite materials in food packaging. Chinese Sci Bull, 2011, 56, doi: 10.1007/s11434-010-4326-6

复合包装材料的企业,使用纳米复合包装材料的消费者以及政府相关管理部门提供有价值的参考信息.

1 纳米复合材料在食品包装中的应用

从目前研究方向和市场应用来看,纳米复合食品包装材料出现了以纳米增强型食品包装材料,“智能”和“活性”包装材料以及纳米复合可降解包装材料为基础的新型包装材料,下面就这 3 种新技术的应用进展进行介绍.

1.1 纳米复合增强型包装材料

高的比表面积使得 NPs 在包装材料中只需要很小(约 5%, w/w)的比例就可以显著提高包装材料的物理机械性能,如塑料包装的柔韧性,气体阻隔性,温度和湿度稳定性,纸质包装的抗紫外线辐照,防火性能和抗拉伸性等. 2001 年, Kotsilkova 等人^[9]报道的蒙脱土(MMT)纳米复合包装材料就具有优良的耐热性能; 2002 年, Ray 小组^[10]报道的一种聚乳酸(PLA)-MMT 复合材料表现出优异的阻燃性能; 2003 年, Wang 等人^[11]报道的聚乙烯(PE)-MMT 和 PE-二氧化硅(SiO₂)复合包装材料显示了优异的抗拉伸性能; 同年, Wan 等人^[12]报道的聚氯乙烯(PVC)-MMT 纳米复合材料可有效提高食品包装材料的抗紫外线性能; 2005 年, Schartel 等^[13]报道的聚酰胺-多壁碳纳米管(MWNT)复合材料表现出优异的防火性能; 2006 年, Xu 等人^[14]报道的 MMT 复合聚合物材料具有优异的气体阻隔性能. 上述功能各异包装材料的开发引发了人们对纳米增强型高分子材料(nanoparticles reinforced polymers)的研究热潮,使得包装技术成为纳米材料应用领域中开展最早,应用最为成熟的一个领域^[15].

纳米复合增强型包装产品的开发主要利用了 NPs 尺寸小,表面活性高和无机材料惰性强特点.除了在原有基础上进行功能增强以外, NPs 还可以给食品包装材料带来新的功能,如抗菌活性等. 其中,应用最多的就是银纳米颗粒(Ag NPs)^[16~18]. 由于 Ag 具有抗菌和杀菌作用,因此国际上许多知名企业和公司开发和生产了含 Ag NPs 的食品包装产品. 表 1 列出了目前已经商品化的含 Ag NPs 的几种产品.

纳米 Ag 复合食品包装/接触材料可以通过抑制细菌和微生物生长来保证食品安全,延长食品的保质期. 例如,纳米 Ag 可以在烹饪炊具和餐具上以 NPs-聚合物涂层的形式得到应用,起到抗菌和杀菌的作用,如国内 Nano Care Technology 公司开发的厨具和餐具(www.nanocaretech.com/En_ArticleShow.asp?ArticleID=13), 韩国 A-DO 公司开发的食物案板等(www.adox.info/?doc=shop/list.php&ca_id=150110). 最近,英国利兹大学的科研人员发现了纳米氧化锌(ZnO)和氧化镁(MgO)的抗菌活性(www.foodproductiondaily.com/Packaging/Nanotech-discovery-promises-safer-food-packaging). 与 Ag 相比, ZnO 和 MgO 的抗菌能力更强,复合材料的制备成本更低. 目前,我国台湾 SongSing Nano Technology 公司开发的纳米 ZnO 聚合物塑料涂层,这种塑料涂层在室内光照的情况表现出优异的杀菌效果(www.nanotechproject.org/inventories/consumer/browse/products/nano_plastic_wrap/).

另外一种广泛应用的纳米材料是 MMT. 由于 MMT 具有类似石墨的层状结构,因此以 MMT 复合聚合物为基础的包装材料表现出良好的气体阻隔性^[19,20]. 目前,与 MMT 复合的高分子材料有聚酰亚胺、尼龙、聚苯乙烯-聚甲基丙烯酸甲酯(PS-*b*-PMMA),

表 1 抗菌食品包装/接触材料的商业化应用实例

生产企业/公司	应用
SongSing 公司	食品包装袋和饮水壶中含纳米 ZnO 和 Ag 的复合涂层
Sharper Image 和 BlueMoonGoods	食品塑料包装袋和容器含纳米 Ag 复合膜
Daewoo, Samsung, LG 和 Midea	冰箱中含纳米 Ag 涂层
Baby Dream 公司	婴儿用水杯中含纳米 Ag 涂层
A-DO Global 公司	烹饪菜板含纳米 Ag 涂层
Nanocor 公司产品 Imperm [®]	PET 与纳米颗粒复合,阻隔碳酸饮料中 CO ₂ 的逸出和外界空气中的 O ₂ 进入,以延长食品的保质期
Honeywell 公司产品 Aegis [®] OX	PET 与纳米颗粒复合,阻隔碳酸饮料中 CO ₂ 的逸出和外界空气中的 O ₂ 进入,在啤酒、果汁和饮料包装中应用
Bayer 公司产品 Durethan [®] KU2-2601	PA 与 MMT 纳米颗粒复合,增强包装材料的阻隔特性、光泽度和硬度,在果汁饮料的外包装中应用

聚对苯二甲酸乙二醇酯(PET)和聚苯胺等^[21~25], 这些复合材料几乎在所有的食品内外包装中都得到了应用. 例如, 美国 Miller Brewing 和韩国 Hite Brewery 公司均报道了在啤酒和碳酸饮料包装中使用了 MMT-多层聚合物塑料薄膜复合包装, 以此来阻隔啤酒和碳酸饮料中气体的外逸和外界空气中 O₂ 的侵入, 保证了包装食品的感官指标, 延长了食品的保质期. 表 1 列出了几种代表性的具有气体阻隔性和抗菌活性的食品包装产品.

1.2 “智能”和“活性”包装材料

“智能”和“活性”食品包装是近年来广泛应用的一类新型包装技术. 所谓“活性”, 是指包装材料具有去除异味和氧气, 增加食品色泽和感官指标的功能. 例如, 在食品包装材料中复合碳黑(BC)和多壁碳纳米管(MWNT)等具有表面积大和吸附气体能力强的 NPs 以后, 包装袋内释放的异味气体能被吸附; 同样, 在 MWNT 中添加一定的香料后, 可以有效保持包装食品的色泽和感官指标^[26~28].

“智能”包装的概念和应用较“活性”包装要广泛很多. 例如, 利用 NPs 合成得到的纳米微球或囊泡可以携带食品防腐剂, 在食品运输和存储过程中通过缓慢释放起到防腐功效, 这种包装材料的开发是建立在纳米生物开关的基础之上, 以达到“按需释放(Release-on-Command)”的目的 (www.azonano.com/Details.asp?ArticleID=1317); 另外, 利用 NPs 研制的阵列传感器, 是一种基于“电子舌头(Electronic Tongue)”的传感技术, 可以用于监控, 追溯和显示包装袋内食品的基本安全情况^[29]. 这种监控和溯源技术在食品加工、运输、存储、销售、质量监管等领域都有巨大的应用价值. 表 2 列出了目前国际知名食品企业和公司开发的智能和活性食品包装产品的实例.

另外一项以 NMs 为基础的“智能”包装就是射频信息识别显示(Radio-Frequency Identification Display, RFID)技术的开发. 目前, 这种技术在商品包装和物流运输等领域处于初期的商业化运用阶段. 运用该系统, 每一种商品包装上的智能标签能迅速而准确地显示该商品的生产日期以及保质期, 为海量商品中指定产品的定位、质量跟踪、生产溯源等信息查询带来了极大的便利. 基于该技术, 研究人员正在将 NPs-聚合物复合薄膜的晶体二极管复合进 RFID 技术中去, 以实现 RFID 系统的自动化操作, 为人们快速而准确地查询产品质量等信息提供便利.

1.3 纳米复合可降解包装材料

纳米复合生物可降解材料是利用 NPs 与聚乳酸(PLA)复合而成的一种新型食品包装材料, 这种材料可有效解决食品包装回收再利用和环境污染问题^[30]. 目前, 与 PLA 复合的 NMs 主要是 MMT^[31~33]. MMT 是一种天然存在的黏土物质, 具有良好的生物可降解性和环境友好性. 目前, MMT-PLA 复合材料已在肉制品、乳制品、糖果、谷物以及速食袋装煮沸(boiling-the-bag)食品的包装中得到了广泛的应用. 例如, McGlashan 小组报道的纳米复合食品包装材料表现出良好的可降解性能和优异的可回收性^[32]. 表 3 列出了已经市场化的和某些正处于研究阶段的纳米复合可降解包装材料实例.

2 纳米复合食品包装材料的安全评价

2.1 迁移研究

对消费者来说, 纳米复合食品包装材料的主要威胁来自于包装中 NPs 向食品中的迁移. 但到目前为止, 人们对复合包装材料中 NPs 的迁移研究极少. 开创性工作由意大利的 Avella 小组在 2005 年完成.

表 2 活性和智能食品包装材料应用实例

生产企业/公司	纳米成分	作用
CSP 科技	聚合物包装在外界刺激下会释放出其中的功能纳米成分	对包装袋内的湿度、氧气、细菌、气味和食品本身的味道进行控制
卡夫食品(Kraft)	基于“电子舌”概念的纳米传感器能够“尝”出包装袋内的气味含量并引导化学物质释放	根据个人消费需求向包装袋内控制释放气味和营养保健物质
美国 Georjin 科技	基于 MWNT 的生物传感器	能够监测食品中的微生物、有毒的蛋白质和腐烂成分食品发生变质时包装袋会改变颜色
英国 Southampton 大学	50 nm 的 CB “Opal”薄膜	
和德国 Kunststoff 学院		
苏格兰 Strathclyde 大学	含 TiO ₂ NPs 的包装袋和 O ₂ 传感印刷油墨	抗紫外线; 防伪标签印刷
澳大利亚 MiniFAB 公司	纳米生物传感器	监测食品的微生物污染物

表3 可降解纳米复合生物塑料薄膜

生产企业/公司	纳米成分	作用
澳洲 Plantic 科技	纳米复合生物高分子	生产生物可降解塑料, 并提供澳大利亚 80% 的巧克力包装市场, 包括 Cadbury 牌巧克力
美国 Rohm 和 Haas	使用 Paraloid BPM-500 生产纳米复合生物高分子	增强生物可降解高分子材料 PLA 的强度
欧盟 13 个国家的研究机构, 大学和公司联合开发的“可持续包装”	使用 MMT NPs 生产纳米复合生物高分子	增强聚合物纤维强度, 并具防水功能
澳洲科技和工业研究组织	纳米复合生物高分子	用于生产可燃烧的, 废弃后可用作肥料的再生包装材料

他们采用马铃薯淀粉和 MMT 为原料, 利用双螺杆挤压法合成了一种新型的生物可降解淀粉-MMT 复合薄膜^[33]。然后, 该小组根据欧盟关于食品接触材料指令对其进行了迁移实验。首先, 他们将莴苣和菠菜放入复合包装袋中, 然后将其置于 40℃ 下进行 10 d 的迁移实验。完成迁移实验的食品经马弗炉高温灰化消解后溶解于 HCl 溶液中, 过滤除杂后利用原子吸收光谱测定其中的 Si、Fe 和 Mg 三种元素。分析结果表明, 与无接触复合包装袋的蔬菜相比, 尽管 Fe 和 Mg 的含量增加较小, 但 Si 的含量却有大幅的增加, 这主要是因为 MMT 的主要成分为 SiO₂ 的原因造成。2008 年, 斯洛伐克科技大学的 Peter 小组以化学势的概念为出发点, 对复合薄膜中 NPs 的迁移进行了理论研究^[6]。他们综合考虑了聚合物基质的密度, NPs 的尺寸, NPs 在基质中的浓度以及 NPs 在基质中距离表面的距离等多方面因素, 以菲克扩散第二定律为模型, 提出了如式(1)所示的用来表示 NPs 迁移率的理论模型和用以表示 NPs 迁移数量的模型(2):

$$m = \sqrt{\frac{k_B T t}{24 \pi^2 \eta a}}, \quad (1)$$

$$n = m S c_0. \quad (2)$$

模型(1)中, m 表示 NPs 在基质中的迁移率; T 表示绝对温度, t 表示 NPs 在基质中的迁移时间, η 表示指定温度下基质(聚合物)的流体动力学黏度, a 表示 NPs 的尺寸, k_B 为波尔兹曼常数。从上式可以看出, NPs 的粒径越小, 聚合物基质的黏度越小, NPs 的迁移率就越高; 模型(2)中, S 表示包装薄膜的表面积; c_0 表示 NPs 在聚合物薄膜中的初始浓度。利用模型(2), 该研究小组以粒径为 5 nm 的 Ag NPs 为研究对象, 以表面积为 0.2 m² 的低密度聚乙烯(LDPE)为基质, Ag

NPs 的初始浓度为 1 kg/m³, 通过模型(1)计算得出 25℃ 条件下 Ag NPs 在 LDPE 中的迁移率为 1.3×10^{-6} 。根据上述假设和参数, 利用模型(1)和(2)可以计算出 5 nm 的 Ag NPs 在 1 年的接触时间内向包装物中的迁移量为 2.6×10^{-7} kg; 当基质为 PET 时, 其迁移量为 2.2×10^{-9} kg。通过上面的理论分析可以看出, NPs 在聚合物基质中的迁移量非常小^[6]。

目前, 有关 NPs 在聚合物薄膜、陶瓷、玻璃和纸张等包装材料中的迁移研究相当匮乏, 其主要原因是因为 NPs 在这些基质中的尺寸和形貌的表征相对复杂, 并且迁移实验的设计和定量分析 NPs 的手段也相对匮乏, 因此有关 NPs 在包装材料基质中的迁移研究是目前纳米复合包装材料安全技术评价的主要障碍, 需要进一步广泛而深入的研究。

2.2 暴露途径和体内分布

欧洲化学品生态毒理学和毒理学中心(European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals)的研究报告表明, 人们在日常生活中暴露于 NPs 的途径有 3 种方式, 即呼吸接触、皮肤接触和经口接触^[34]。呼吸接触和皮肤接触的污染源主要是生产和销售 NMs 的车间和企业以及这些污染源附近的大气。经呼吸接触的 NPs 通过扩散运动在生物体内的呼吸系统(主要是肺部)沉积。一般来讲, NPs 的尺寸越小, 其扩散系数越大, 与肺部上皮细胞接触的几率也越高。沉积在肺部的 NPs 通过呼吸道黏液中纤毛细胞的运动或生物体的咳嗽等生理运动将其携带至喉咙部位, 然后经吞咽作用进入胃肠器官, 这种传播途径主要针对粒径较大的 NPs; 对于小于 100 nm 的颗粒来说, 其在肺部上皮细胞中的沉积会通过细胞表面的内陷将 NPs 经非特异性内吞作用输送到肺泡当中, 并经肺泡毛细血管进入血液循环系统,

从而导致生物体内肝、脾、肾、大脑和心脏等器官的暴露^[35,36]。

NPs经皮肤接触进入生物体内有3种方式,即皮肤细胞间渗透、细胞内渗透和毛囊渗透。在这3种渗透方式中,毛囊渗透是NPs经皮肤接触过程中最为直接和有效的方式,虽然毛囊占整个生物体表面积的比例很小(约0.1%)^[37,38]。然而,无论是何种渗透方式,近年来的研究表明,NPs在皮肤表面仅仅是停留在毛囊中或角质层中,而并没有跨越毛囊或角质层细胞进入生物体的体液循环系统中^[39,40]。

经口接触是目前生物体暴露于NPs的主要方式,其暴露源主要是人为添加在食品、饲料及其包装中的NMs。经口接触的NPs初期绝大部分停留在生物体内的胃肠部位,其后经胃肠壁的吸收进入其他器官和组织中。一般来讲,该过程需要经过4个步骤:(1)NPs通过在胃肠黏膜中的扩散向胃肠道消化壁扩散;(2)与胃肠上皮细胞或M细胞接触;(3)NPs在胃肠上皮细胞内的运输和(4)后转移^[41]。NPs在胃肠上皮细胞中的转移与其尺寸、表面电荷性质、亲水/疏水性、表面有无配体和胃肠上皮细胞的生理状况(如肠胃上皮细胞处于健康或疾病状态)等物理化学性质有关^[42]。

研究表明,小尺寸NPs在胃肠黏膜中的扩散速率要高于大尺寸NPs;1997年,Szentkuti^[43]利用不同尺寸的乳胶NPs在大鼠远端上皮细胞黏膜中的扩散速率进行研究。结果表明,14 nm的颗粒穿过黏膜需耗时2 min,415 nm的颗粒耗时30 min,而1000 nm的颗粒则没有观察到扩散现象。不同尺寸Au颗粒(58, 28, 10和4 nm)的小鼠经口毒性实验表明,胃肠吸收率随NPs尺寸的减小而逐渐上升^[44];不同尺寸聚苯乙烯(PS)NPs(50, 100, 200, 300, 1000和3000 nm)的大鼠经口毒性实验表明,粒径为50 nm的PS NPs吸收率为34%,而当PS的粒径逐渐增加后,其吸收率也逐渐趋于零^[45]。NPs在胃肠黏膜中的扩散不但受其尺寸影响,而且与其表面电荷属性有关。1997年,同样是Szentkuti^[43]的研究发现,表面带正电荷的NPs会被带负电荷的胃肠黏膜包围,不利于扩散,而带负电荷的NPs则能顺利通过黏膜与肠上皮细胞或M-细胞接触;另外,美国霍普金斯大学的研究者发现,生物体内肠胃上皮细胞中的黏膜存在很多孔径比人们预期要大很多的小孔。他们利用聚乙二醇(PEG)包覆的粒径为200 nm的NPs进行实验,发现

这些NPs能够顺利通过黏膜到达消化内壁^[46]。

穿越上皮细胞黏膜的NPs在与M-细胞或上皮细胞接触以后,会发生在细胞内的迁移。NPs在细胞内的迁移有3种途径:肠上皮细胞的转胞吞作用、派伊尔小结(Peyer's patches, PP)中M-细胞的转胞吞作用和被动扩散。研究表明,尽管PP所占的面积仅为整个肠胃消化壁面积的1%左右,但NPs在其中的迁移速率是在肠上皮细胞中的2~200倍^[42]。NPs在上皮细胞和M-细胞内的迁移与其尺寸有关。尺寸为116±5 nm的NPs,其迁移速率比微米级的颗粒高15~250倍;除此之外,NPs在上皮细胞中的迁移速率还与其表面修饰的配体类型,颗粒表面的zeta电位,表面亲水/疏水性以及胃肠上皮细胞的生理状况等因素有关^[42]。

完成上皮细胞或M-细胞内穿越的NPs会与肠胃亚黏膜组织接触。这种接触作用可将NPs带入毛细血管中,从而通过生物体的门脉循环进入到肝、淋巴和血液循环系统中。以小鼠为研究对象,28 d 60 nm Ag NPs的经口毒性实验结果表明,Ag颗粒在胃部的浓度最高,其次是肝和肾,而在肺、睾丸、大脑和血液中的浓度则相对较低^[47]。NPs在生物体内各器官的含量与其尺寸有关。2001年,Hillyer和Albrecht^[44]发现尺寸为58 nm, 28 nm, 10 nm和4 nm不等的Au颗粒在大鼠体内器官的浓度具有强烈的尺寸效应,即小尺寸的NPs在各个器官中的含量均高于大尺寸的NPs;同时他们还发现,小尺寸NPs主要分布在大鼠的肾、肝、脾、肺和大脑中,而大尺寸NPs则主要集中在肠胃消化道中;对雌性Sprague Dawley大白鼠连续10天以1.25 mg/kg的经口实验表明,50 nm的PS颗粒在大鼠体内的吸收占总摄入量的34%,其中有7%的NPs分布在肝、脾、血液和骨髓中;100 nm的PS颗粒有26%在体内分布,其中有4%分布在肝、脾、血液和骨髓中,而尺寸大于100 nm的颗粒则主要分布在肝和脾中。

2.3 健康危害

NPs向包装食品的迁移引发了人们对NMs健康安全的担忧。这种担忧通过动物体内的经口毒性实验和体外细胞毒性实验得以证实。NPs对生物体的毒性表现为两种不同类型的效应。一种毒性效应是不依赖于NPs的组成,其在生物体内的毒性主要通过产生大量的活性氧物质(Reactive Oxygen Speci-

ese, ROS)表现出来;另外一种毒性效应与 NPs 的组成有关,如某些金属或金属氧化物 NPs 在生物体内与蛋白的结合会导致蛋白功能的异常,而某些 NPs,如金属合金,碳纳米管等则表现出直接或间接的基因毒性。

体外细胞实验表明, NPs 在细胞内会产生大量的 ROS. 当体相材料的尺寸急剧减小到纳米级别时,裸露在颗粒表面的原子数目增加,致使未键合的原子数目增加,从而产生很多悬置键(dangling bond);另外,尺寸减小导致组成材料的晶面不连续性增加,颗粒表面和内部的晶体缺陷增加. 悬置键和晶体缺陷的存在都会使得原子的电子结构发生改变^[48,49]. 例如,在半导体和金属 NPs 中,电子结构的变化使得半导体 NPs 表面的电子-空穴对(electron-hole pair)和金属 NPs 表面含有悬置键的原子成为活性中心,这些活性中心与生物体内 O_2 接触便会产生过氧根自由基 $O_2^{\cdot-}$. $O_2^{\cdot-}$ 自由基通过歧化反应或 Fenton 反应产生 ROS. ROS 的产生不因纳米材料的组成而变化,金属氧化物,含有金属杂质的碳纳米管和富勒烯都会产生 ROS. 然而,在正常情况下,生物体细胞内的线粒体也会产生 ROS,但这种反应的几率较低. 细胞自身产生的 ROS 会被体内的抗氧化剂谷胱甘肽(GSH)和抗氧化酶消耗掉,因此不会对生物体造成损害^[50]. 但当 NPs 进入细胞以后,其与线粒体的结合会干扰 ROS 的产生,并导致 ROS 大量生产,此时 GSH 和抗氧化酶便显得不足,于是细胞内便会聚集大量被氧化的谷胱甘肽(GSSG),这种效应称之为氧化应激(oxidative stress)^[50]. 氧化应激的结果是细胞抗氧化能力的降低,导致细胞内部 GSSG 的过量聚集,造成生物体局部器官(如肺部)的炎症和纤维化。

目前,由 ROS 导致的氧化应激是解释生物体 NPs 吸入毒性的最有力理论. 2003 年,美国 Nel 小组^[51]研究了 NPs 的尺寸,尺寸分布与组成在生物体内产生氧化应激反应的区别,并建立了 NPs 尺寸及尺寸分布与 ROS 生成量的关系. 研究结果表明, NPs 的单分散性越高,其生成的 ROS 含量也就越高,产生的氧化应激反应越强烈;同年,日本科学家 Yamakoshi 等人^[52]就富勒烯(C_{60} 和 C_{70}) NPs 在生物体内产生 ROS 的过程进行了阐述,并利用 DNA 切割、电子自旋共振谱(ESR)和近红外光谱法(NIR)等手段定量分析了 ROS($O_2^{\cdot-}$ 和 $\cdot OH$)的含量. 吸入接触的 NPs 产

生的氧化应激主要对肺部造成毒性,除此之外,还会给生物体的神经系统造成损害,其危害也是通过氧化应激实现. 例如,有研究表明,由 ROS 产生的氧化应激是某些神经退行性疾病,如帕金森氏症(Parkinson's)和阿尔茨海默氏症(Alzheimer's)的病原体^[53]. 通过对阿尔茨海默氏症患者的活体组织切片分析表明,大脑皮层中与 NPs 有关的炎症细胞标记物增加,同时淀粉样 β 蛋白(AB-42)发生聚集^[54]. 这些症状都表明 NPs 可以引发生物体的神经毒性。

NPs 的经口毒性主要体现在肝脏和脾等器官. 生物体中,位于肝和脾器官内的网状内皮系统(reticuloendothelial system)中含有大量具有吞噬细胞残骸、老化细胞、病原体、外来物质(包括来自血液中的惰性颗粒)的巨噬细胞、单核细胞和内皮细胞. 网状内皮系统的主要作用是消除或中和从肠胃系统进入生物体内的病原体,然而,这些细胞也具有吞噬 NPs 的能力. 如前所述, NPs 在细胞内产生的 ROS 会刺激吞噬细胞产生促炎性细胞因子(proinflammatory cytokines),如肿瘤坏死因子 α (tumour necrosis factor alpha)^[55];另外,由 ROS 产生的氧化应激会抑制肝脏细胞的某些功能和抑制胆汁的形成与分泌^[56].

经口接触的 NPs 不仅对肝脏和脾产生损害,还会对生物体的心脏和血管等器官造成损伤. 例如, NPs 在心脏和血管中的富集会引发生物体心肌梗塞和血栓,并且影响生物体的正常心律. 2003 年,美国 Samuel 小组在利用超顺磁的氧化铁 NPs 对早期动脉硬化症患者进行血管生成分子成像研究过程中发现,表面带正电荷的 NPs,包括 Au 和 PS 颗粒在血液会造成红血球溶解和血液凝块;同年,美国 Campen 小组以患有高血压的小鼠为研究对象,通过收集空气中散布的颗粒(纳米级别)对其进行了经口实验. 结果表明,服用 NPs 4 d 后小鼠的心律为 290 ± 7 次/min,而未服用 NPs 的小鼠的心律为 265 ± 5 次/min^[57];2002 年,英国和加拿大的研究人员在家兔的 NPs 毒性实验中发现, NPs 在血管中的富集会引血管末梢的炎症,而这种炎症是引起血管动脉硬化的主要原因^[58];2003 年,德国 Krombach 小组采用大鼠对 CB NPs 的毒性进行了研究. 他们发现, CB NPs 在肝脏微脉管循环系统中会引起血管中血小板的聚集,导致肝脏微脉管上皮表面血栓的形成. 尽管上述研究已经证明 NPs 可以导致生物体心血管的损伤,但血栓和动

动脉硬化等病变的致病机理是因为 NPs 引起的末端血管炎症还是因为 NPs 在血液中的聚集, 目前仍然不清楚^[54].

NPs 对生物体肺、心血管、肠胃和神经系统等器官的损害不依赖于 NPs 的组成. 然而, 某些健康危害却因 NPs 的组成不同而出现不同的情况. 例如, 有研究发现不易降解的 NPs, 其在人体内的富集与肠易激综合征(IBD)和局限性肠炎(Crohn's disease)病情的轻重程度有关^[60]. 虽然有研究表明这些 NPs 不是导致 IBD 和 Crohn 疾病的直接原因, 但其在吞噬细胞内的吸收和富集能够加重 IBD 和 Crohn 疾病患者的病情^[61]. 例如, TiO₂, ZnO 以及 SiO₂ NPs 被巨噬细胞吞噬以后, 其在吞噬细胞内会与钙离子和脂多糖结合. 这种 NPs-钙离子-脂多糖复合物会激活存在于肠胃中不易被“激怒”的外围单核血液细胞和噬菌细胞. 当肠胃中再次有物质进入后(如食物或异物等), 肠胃便失去抵抗外界干扰的应激能力, 从而加重了 IBD 和 Crohn 疾病的症状^[62]; 某些金属或金属氧化物 NPs, 如 Fe/Pt 合金, Co/Cr 合金, ZnO, SiO₂ 和 TiO₂ NPs 以及单壁碳纳米管(SWNT)和多壁碳纳米管(MWNT)在生物体内具有间接和直接的基因毒性^[63,64]; 另外, 尺寸不同的 NPs 表现出的毒性反应也不一样, 如~20 nm 的 TiO₂ 和 CB 对 DNA 有损伤作用, 而大尺寸的颗粒则未表现 DNA 损伤^[63,65,66], 这种情况在 Co NPs 的毒性实验中同样出现^[67]. 表 4 列出了近年来在食品包装中有应用价值的几种 NPs 的健康危害特性, 这些材料的毒性特征都表现出强烈的尺

寸效应和组成效应.

3 复合包装中纳米材料的检测技术

与传统有机小分子, 无机化合物和低聚物的检测相比, NPs 的检测要复杂很多, 这是因为 NPs 在包装材料基质中的功能和生物体内的毒性与其游离状态的尺寸, 形貌和在基质中的尺寸和形貌有直接的关系, 为此, 除了传统的仪器检测技术以外, NPs 的检测还需要有专门的形貌检测技术和检测仪器, 如电子显微技术.

3.1 成像技术

NPs 的形貌检测主要依靠电子显微镜技术和电子显微设备, 如透射电子显微镜(TEM)、扫描电子显微镜(SEM)和原子力显微镜(AFM). 2003 年, 美国陶氏(Dow)化学公司利用 TEM 对热固性的异氰酸树脂-MMT 复合材料和热塑性的 PP-MMT, PS-MMT, 尼龙-MMT, 丙烯-顺丁烯二酸酐共聚物-MMT(PP-g-MAH-MMT)复合薄膜中 MMT 的形貌和尺寸进行了表征^[68]; 2005 年, 法国国家科学研究中心(CNRS)的 Vermogen 等人^[69]利用 TEM 对采用单螺杆挤压机和双螺杆挤压机等不同挤压法生产的 PP-MMT 复合薄膜进行了 NPs 的形貌和结构表征. 结构分析表明, 不同挤压法得到的复合薄膜中 NPs 的形貌不同, 同时尺寸也有所改变, 这些因素主要与生产过程中的挤压剪切力有关; 2001 年, 日本丰田公司(Toyota)的 Usuki 等人^[70]利用 SEM 对尼龙-MMT 复合材料进行

表 4 应用于食品包装中 NPs 的健康危险特性描述

纳米材料及用途	尺寸及物理特性	毒性实验结果
TiO ₂ 包装材料中用于 杀菌和抗紫外线作用	20 nm	破坏 DNA 结构
	30 nm, 金红石型和锐钛矿型混合物	在大脑免疫细胞中产生 ROS
	金红石型和锐钛矿型混合物	在紫外线作用下对皮肤细胞产生 DNA 损伤
	3~20 nm 4 种不同尺寸, 金红石型和锐钛矿型混合物	影响皮肤细胞和肺部细胞的功能, 锐钛矿型颗粒的毒性药强于金红石型 100 倍以上
Ag 食品接触材料中 用于抗菌作用	25, 80, 155 nm	25 和 80 nm 的颗粒造成肝和肾的损伤, 并在肝、脾、肾和肺组织中聚集
	15 nm	对生殖干细胞有高毒性
	15 和 100 nm	对肝脏细胞有高毒性
	15 nm	对脑部细胞有毒性
Zn 和 ZnO 食品接触材料中 用于抗菌作用	20 和 120 nm ZnO 粉末	120 nm 颗粒造成肝、心脏和脾的损伤; 20 nm 的颗粒造成肝、脾和胰腺损伤
	19 nm ZnO	即使很低浓度的经口试验也对细胞有毒性作用
	58±16 和 1.08±0.25 μm Zn 粉末	第一个星期出现死亡, 同时伴有严重的肝损伤和贫血症状
SiO ₂ 智能食品接触材料	50 nm, 70 nm, 0.2 μm, 0.5 μm, 1 μm 和 5 μm	50 和 70 nm 颗粒造成蛋白质生成反应异常, 并阻碍细胞生长

表征, 结果表明, MMT在尼龙薄膜中以1 nm厚, 100 nm宽的层状结构存在^[70]; 2005年, Perrin-Sarazin等人^[71]同时用SEM和TEM对PP-MMT中的MMT进行了形貌和尺寸的表征; 2004年, 美国的Cakmak小组^[72]利用AFM对PVC-MMT复合材料中的NPs进行了形貌和尺寸的表征. 利用形貌分析结果, 他们提出了增塑剂邻苯二甲酸二辛基酯(DOP)影响MMT在PVC基质中不稳定的原因, 并指出了DOP在PVC中的最佳使用比例.

3.2 分析技术

NPs在包装材料中的定性检测主要依靠X-射线衍射(XRD)完成^[73]. XRD结构分析的对象主要是结晶态的物质, 其理论基础是基于X-射线波长与晶体物质中原子间距相近而产生的射线衍射. 晶体化合物中原子结构和排列的差异是定性结构分析的基础. 目前, XRD可以小角X-射线散射(SAXS)和广角X-射线散射(WAXS)的技术对基质中NPs的自组装和超晶格结构进行精细表征. 2003年, 美国Beaucage小组^[74]利用二维SAXS和WAXS对高密度聚乙烯(HDPE)-MMT复合薄膜中MMT的层状结构及其与HDPE基质的相互作用进行了研究; 美国空军研究实验室的Richard利用SAXS技术对聚合物中MMT的相变过程及其对聚合物基质相变的影响进行详细阐述^[75]; 2005年, Zhu等人利用温度同步广角X-射线衍射对PEO-MMT复合材料进行了表征. 分析结果表明, 通过改变外界温度可以调整PEO在层状MMT中的相变, 从而改变复合薄膜的物理性能.

近年来, 人们利用固体核磁共振(solid NMR)技术实现了NPs在聚合物基质中分布状态的表征. 2001年, 美国国家标准技术研究院的VanderHart等人^[76]利用固体NMR技术, 以MMT NPs中的 Fe^{3+} 为分析对象, 对尼龙-MMT复合材料中MMT在尼龙基质中的分布状态进行了表征; 以此为基础, 他们又利用相同的表征技术对复合材料中MMT的相变及其与尼龙基质的结晶过程进行了表征, 阐述了MMT在尼龙基质中的基本化学状态^[77]. 除此之外, 利用MMT NPs中多种金属离子含有自旋单电子的特性, 人们还利用ESR对复合材料中的MMT进行结构表征. 例如, 2004年, 德国马普学会高分子研究所的Jeschke等人^[78]利用ESR对表面含有硝酰基配体的MMT-PS

复合物中MMT与PS的相互作用情况进行表征.

NPs表面结构及其与基质相互作用的研究还可以利用紫外-可见光吸收光谱(UV-vis), NIR, 傅立叶红外光谱(FTIR)和拉曼光谱(Raman)进行表征. 2003年, 美国麻省理工学院的Loo和Gleason^[79]利用FTIR对尼龙6-MMT复合材料中MMT的Si—O键结构进行了表征, 并分析了MMT在聚合物基质中晶体形变的过程; 2004年, 美国能源部的Maupin等人^[80]利用UV-vis和荧光光谱对PS-MMT的结构进行了表征. 他们利用荧光染料尼罗蓝对PS中的MMT进行标记以后, 通过荧光光谱的红移情况对MMT与PS的层状结构进行了分析.

4 存在的问题和展望

纳米复合材料在食品包装中的应用不仅为人们日常生活中的“食”带来了极大的便利, 而且也有效推动了纳米技术向应用领域迈进的步伐, 加速了纳米技术产业化发展. 然而, 在了解食品包装中有害物质迁移规律和认识纳米材料生物毒性特征的基础上, 我们有必要就纳米复合食品包装中NPs的安全性进行全面而有效的评价. 目前, 欧盟委员会(EC)、美国农业部及食品药品监督管理局(FDA)已经对食品产业链中NPs的健康危害进行了初步的评价. 在NPs尚未作为一种普遍应用的材料而且在许多应用领域尚处于研究阶段的情况下, 即使欧盟和美国等发达国家和地区也遇到了许多技术和管理上的挑战. 总结来看, 这些安全评价在技术上还存在以下几个问题:

(1) 缺乏食品包装材料中, 包括塑料、玻璃、陶瓷以及纸张中NPs的鉴定与分离的有效方法. 与有机小分子和低聚物相比, NPs在基质中的鉴定不仅需要含量信息, 而且需要NPs的形貌信息; 尽管目前存在于复合薄膜中的NPs可以通过电子显微技术进行分析, 但对于其他基质, 如玻璃、陶瓷和纸张中NPs的形貌表征目前还缺乏有效的手段;

(2) NPs的全面理化性能指标. NPs早期的迁移和后期的毒理学研究需要全面掌握NPs的尺寸、尺寸分布、形貌、晶体结构、表面配体结构、表面电性, 表面反应活性, 在不同pH下的聚集行为以及蛋白质的反应活性等基本特性;

(3) 确定纳米材料纯度与其功能性和生物毒性

之间的关系. 对于某些掺杂纳米材料来说, 其中的杂质对其功能性的影响是至关重要的; 纳米材料的毒性与其恰当的尺寸分布有密切关系, 对于不处于毒性效应尺寸分布之外的“杂质”NPs 的分离和鉴定是进行毒理学实验的必要前提;

(4) 迁移实验的建立. 目前, NPs 在包装基质中迁移实验方法和手段的匮乏是妨碍纳米复合食品包装安全评价的主要原因. 尽管目前包括我国在内的欧盟、美国、日本等国家和地区纷纷制定了以食品模拟物的方法对包装材料中有毒有害物质进行评价研究的体系, 但对于NPs来说, 其区别于有机小分子和低聚物的尺寸和形貌特殊性给传统的食品模拟物迁移实验方法带来了挑战. 例如, NPs 在基质中的迁移率, 在模拟液中的分散性, 其尺寸和形貌在迁移前后的变化等因素都使得目前迁移实验体系需要进行较大的改进, 甚至是重新建立和评估. 因此, 在目前有限的迁移实验方法中, 建立一整套 NPs 向食品迁移的实验方法是定量评价 NPs 安全问题的关键;

(5) 纳米材料毒理学实验初始剂量的确定. 目

前, EC 和 FDA 对化学物质毒性实验初始剂量的确定是建立在大量化学物质毒理学数据的基础之上. 然而, 由于NPs与一般化学物质的不同, 因此其初始剂量的确定需要通过大量的实验完成. 目前可行且有效的方法是对每一种纳米材料, 按其尺寸和形貌进行逐一实验;

(6) 纳米材料毒理学实验方法建立和毒理学数据的获取. 毒理学实验方法的建立对正确了解 NPs 生物安全问题至关重要. 实验方法的建立包括 NPs 暴露途径的确定, NPs 毒理动力学的研究以及 NPs 与急慢性疾病之间关系的研究等.

对纳米复合食品包装中 NPs 进行安全评价并不意味着禁止其在食品产业链中应用. 在 NPs 尚未普遍进入人们的生活之前, 对其进行健康以及环境的安全评价是必要的. 相信随着迁移实验、检测技术和毒理学实验方法的不断发展和完善, NPs 在食品包装以及食品行业中的安全问题会得到的客观的评价, 这些评价也会为人们放心享受纳米材料带来便捷和进步提供科学的依据.

参考文献

- 1 Aitken R F, Hankin S M, Tran C L, et al. REFNANO: Reference Materials for Engineered Nanoparticle Toxicology and Metrology. Technical Report, Institute of Occupational Medicine, 2007
- 2 Bouwmeester H, Dekkers S, Noordam M, et al. Health Impact of Nanotechnologies in Food Production. Technical Report, RIKILT—Institute of Food Safety, Wageningen University and Research Centre, 2007
- 3 Torchilin V P. Targeted pharmaceutical nanocarriers for cancer therapy and imaging. *AAPS J*, 2007, 9: E128–E147
- 4 Carmen I, Moraru C P, Panchapakesan, et al. Nanotechnology: A new frontier in food science. *Food Technol*, 2003, 57: 24–29
- 5 Alexandra M, Dubois P. Polymer-layered silicate nanocomposites: Preparation, properties and uses of a new class of materials. *Mat Sci Eng R*, 2000, 28: 1–63
- 6 Peter Š, Qasim C, Dušan B. Migration of engineered nanoparticles from polymer packaging to food—A physicochemical view. *J Food Nutr Res*, 2008, 47:105–113
- 7 Repot of an OECD Workshop on Exposure Assessment and Exposure Mitigation: Manufactured Nanomaterials. Technical Report, OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on the Safety of Manufactured Nanomaterials, No. 13, Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris. 2009
- 8 Nanomaterials in REACH. Technical Report, Follow-up to the 6th Meeting of the REACH Competent Authorities for the implementation of Regulation (EC) 1907/2006 (REACH), Brussels. 2008
- 9 Kotsilkova R, Petkova V, Pelovski Y. Thermal analysis of polymer-silicate nanocomposites. *J Therm Anal Calorim*, 2001, 64: 591–598
- 10 Ray S S, Maiti P, Okamoto M, et al. New polylactide/layered silicate nanocomposites. 1. Preparation, characterization, and properties. *Macromolecules*, 2002, 35: 3104–3110
- 11 Wang K K, Koo C M, Chung I J. Physical properties of polyethylene/silicate nanocomposite blown films. *J Appl Polym Sci*, 2003, 89: 2131–2136
- 12 Wan C, Qiao X, Zhang Y, et al. Effect of different clay treatment on morphology and mechanical properties of PVC-clay nanocomposites. *Polym Test*, 2003, 22: 453–461
- 13 Schartel B, Pötschke P, Knoll U, et al. Fire behaviour of polyamide 6/multiwall carbon nanotube nanocomposites. *Eur Polym J*, 2005, 41: 1061–1070

- 14 Xu B, Zheng Q, Song Y, et al. Calculating barrier properties of polymer/clay nanocomposites: Effects of clay layers. *Polymer*, 2006, 47: 2904–2910
- 15 Aaron L B. “Nano, nano” food packaging technology. *Food Technol*, 2003, 57: 52–54
- 16 Jun S K, Eunye K, Kyeong N Y, et al. Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomed-Nanotechnol*, 2007, 3: 95–101
- 17 Margaret I, Sau L L, Vincent K M P, et al. Antimicrobial activities of silver dressings: An *in vitro* comparison. *J Med Microbiol*, 2006, 55: 59–63
- 18 Mohammed F A, Balaji K, Girilal M, et al. Mycobased synthesis of silver nanoparticles and their incorporation into sodium alginate films for vegetable and fruit preservation. *J Agric Food Chem*, 2009, 57: 6246–6252
- 19 Ke Z, Yongping B. Improve the gas barrier property of PET film with montmorillonite by *in situ* interlayer polymerization. *Mater Lett*, 2005, 59: 3348–3351
- 20 Kostas S T, Peter C L, In P, et al. Epoxy—clay fabric film composites with unprecedented oxygen-barrier properties. *Chem Mater*, 2006, 18: 4393–4398
- 21 Park S Y, Cho Y H, Richard A V. Three-dimensional structure of the zone-drawn film of the nylon-6/layered silicate nanocomposites. *Macromolecules*, 2005, 38: 1729–1735
- 22 Yeh J M, Liou S J, Lai C Y, et al. Enhancement of corrosion protection effect in polyaniline via the formation of polyaniline—clay nanocomposite materials. *Chem Mater*, 2001, 13: 1131–1136
- 23 Tyan H L, Liu Y C, Wei K H. Thermally and mechanically enhanced clay/polyimide nanocomposite *via* reactive organoclay. *Chem Mater*, 1999, 11: 1942–1947
- 24 Ratchana L, Steven S, Peter F G. Stability of diblock copolymer/layered silicate nanocomposite thin films. *Macromolecules*, 2000, 33: 5227–5234
- 25 Kotov N A, Magonov S, Tropsha E. Layer-by-layer self-assembly of aluminosilicate—polyelectrolyte composites: Mechanism of deposition, crack resistance, and perspectives for novel membrane materials. *Chem Mater*, 1998, 10: 886–895
- 26 del N M, Cannarsi M, Altieri C, et al. Effect of Ag-containing nano—composite active packaging system on survival of *alicyclobacillus acidoterrestris*. *J Food Sci*, 2004, 69: E379–E383
- 27 LaCoste A, Schaich K, Zumbrunnen D, et al. Advancing controlled release packaging through smart blending. *Packag Technol Sci*, 2005, 18: 77–87
- 28 Lopez-Rubio A, Gavara R, Lagaron J. Bioactive packaging: Turning foods into healthier foods through biomaterials. *Trends Food Sci Technol*, 2006, 17: 567–575
- 29 Nachay K. Analyzing nanotechnology. *Food Technol*, 2007, 61: 34–36
- 30 Jin-Hae C, Yeong Uk A, Donghwan C, et al. Poly(lactic acid) nanocomposites: Comparison of their properties with montmorillonite and synthetic mica (II). *Polymer*, 2003, 44: 3715–3720
- 31 Chow W S, Lok S K. Thermal properties of poly(lactic acid)/organo—montmorillonite nanocomposites. *J Therm Anal Calorim*, 2009, 95: 627–632
- 32 McGlashan S A, Halley P J. Preparation and characterisation of biodegradable starch-based nanocomposite materials. *Polym Int*, 2003, 52: 1767–1773
- 33 Avella M, De Vlieger J J, Errico M E, et al. Biodegradable starch/clay nanocomposite films for food packaging applications. *Food Chem*, 2005, 93: 467–474
- 34 Paul J A B, David R, Stephan H, et al. The potential risks of nanomaterials: A review carried out for ECETOC. Part Fibre Toxicol, 2006, 3: 1–35
- 35 Nemmar A, Vanbilloen H, Hoylaerts M F, et al. Passage of intratracheally instilled ultrafine particles from the lung into the systemic circulation in hamster. *Am J Respir Crit Care Med*, 2001, 164: 1665–1668
- 36 Kreyling W G, Semmler M, Erbe F, et al. Translocation of ultrafine insoluble iridium particles from lung epithelium to extrapulmonary organs is size dependent but very low. *J Toxicol Environ Health A*, 2002, 65: 1513–1530
- 37 Maibach H I, Feldman R J, Milby T H, et al. Regional variation in percutaneous penetration in man. *Pesticides. Arch Environ Health*, 1971, 23: 208–211
- 38 Lademann J, Richter H, Otberg N, et al. Application of a dermatological laser scanning confocal microscope for investigation in skin physiology. *J Laser Phys*, 2003, 13: 756–760
- 39 Pflücker F, Wendel V, Hohenberg H, et al. The human stratum corneum layer: An effective barrier against dermal uptake of different forms of topically applied micronised titanium dioxide. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol*, 2001, 14(Suppl 1): 92–97
- 40 Alvarez-Roman R, Naik A, Kalia Y N, et al. Skin penetration and distribution of polymeric nanoparticles. *J Control Release*, 2004, 99:

53–62

- 41 Hoet P H, Bruske-Hohlfeld I, Salata O V. Nanoparticles—known and unknown health risks. *J Nanobiotechnology*, 2004, 2: 12–27
- 42 des R A, Fievez V, Garinot M, et al. Nanoparticles as potential oral delivery systems of proteins and vaccines: A mechanistic approach. *J Control Release*, 2006, 116: 1–27
- 43 Szentkuti L. Light microscopical observations on lumenally administered dyes, dextrans, nanospheres and microspheres in the pre-epithelial mucus gel layer of the rat distal colon. *J Control Release*, 1997, 46: 233–242
- 44 Hillyer J F, Albrecht R M. Gastrointestinal persorption and tissue distribution of differently sized colloidal gold nanoparticles. *J Pharm Sci*, 2001, 90: 1927–1936
- 45 Jani P, Halbert G W, Langridge J, et al. Nanoparticle uptake by the rat gastrointestinal mucosa: Quantitation and particle size dependency. *J Pharm Pharmacol*, 1990, 42: 821–826
- 46 Samuel K, Lai D, O'Hanlon E, et al. Rapid transport of large polymeric nanoparticles in fresh undiluted human mucus. *Proc Nat Acad Sci USA*, 2007, 104: 1482–1487
- 47 Kim Y S, Kim J S, Cho H S, et al. Twenty-eight-day oral toxicity, genotoxicity, and gender-related tissue distribution of silver nanoparticles in Sprague-Dawley rats. *Inhal Toxicol*, 2008, 20: 575–583
- 48 Günter O, Eva O, Jan O. Nanotoxicology: An emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ Health Persp*, 2005, 113: 823–839
- 49 Donaldson K, Lang T C. Inflammation caused by particles and fibers. *Inhal Toxicol*, 2002, 14: 5–27
- 50 Halliwell B, Gutteridge J M C. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford: Oxford University Press, 1999
- 51 Li N, Sioutas C, Cho A, et al. Ultrafine particulate pollutants induce oxidative stress and mitochondrial damage. *Environ Health Persp*, 2003, 111: 455–460
- 52 Yamakoshi Y, Umezawa N, Ryu A, et al. Active oxygen species generated from photoexcited fullerene (C₆₀) as potential medicines: O²⁻· versus ¹O₂. *J Am Chem Soc*, 2003, 125: 12803–12809
- 53 Kedar N P. Can we prevent Parkinson's and Alzheimer's disease? *J Postgrad Med*, 2003, 49: 236–245
- 54 Calderón-Garcidueñas L, Reed W, Maronpot R R, et al. Brain inflammation and Alzheimer's-like pathology in individuals exposed to severe air pollution. *Toxicol Pathol*, 2004, 32: 650–658
- 55 Brown D M, Donaldson K, Borm P J, et al. Calcium and ROS-mediated activation of transcription factors and TNF- α cytokine gene expression in macrophages exposed to ultrafine particles. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2004, 286: L344–L353
- 56 Stone V, Johnson G D, Wilton J C, et al. Effect of oxidative stress and disruption of Ca²⁺ homeostasis on hepatocyte canalicular function in vitro. *Biochem Pharmacol*, 1994, 47: 625–632
- 57 Matthew J, Campen J D, McDonald, et al. Cardiovascular effects of inhaled diesel exhaust in spontaneously hypertensive rats. *Cardiovasc Toxicol*, 2003, 3: 353–361
- 58 Suwa T, Hogg J C, Quinlan K B, et al. Particulate air pollution induces progression of atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol*, 2002, 39: 935–942
- 59 Andrej K, Andreas S, Shinji T, et al. Ultrafine particles exert prothrombotic but not inflammatory effects on the hepatic microcirculation in healthy mice *in-vivo*. *Circulation*, 2004, 109: 1320–1325
- 60 Lomer M C, Thompson R P, Powell J J. Fine and ultrafine particles of the diet: Influence on the mucosal immune response and association with Crohn's disease. *Proc Nutr Soc*, 2002, 61: 123–130
- 61 Lomer M C, Grainger S L, Ede R, et al. Lack of efficacy of a reduced microparticle diet in a multi-centred trial of patients with active Crohn's disease. *Eur J Gastroen Hepat*, 2005, 17: 377–384
- 62 Powell J J, Harvey R S, Ashwood P, et al. Immune potentiation of ultrafine dietary particles in normal subjects and patients with inflammatory bowel disease. *J Autoimmun*, 2000, 14: 99–105
- 63 Gurr J R, Wang A S, Chen C H, et al. Ultrafine titanium dioxide particles in the absence of photoactivation can induce oxidative damage to human bronchial epithelial cells. *Toxicology*, 2005, 213: 66–73
- 64 Landsiedel R, Kapp M D, Schulz M, et al. Genotoxicity investigations on nanomaterials: Methods, preparation and characterization of test material, potential artifacts and limitations—many questions, some answers. *Mutat Res*, 2009, 681: 241–258
- 65 Mroz R M, Schins R P, Li H, et al. Nanoparticle-driven DNA damage mimics irradiation-related carcinogenesis pathways. *Eur Respir J*, 2008, 31: 241–251
- 66 Rahman Q, Lohani M, Dopp E, et al. Evidence that ultrafine titanium dioxide induces micronuclei and apoptosis in syrian hamster embryo fibroblasts. *Environ Health Persp*, 2002, 110: 797–800
- 67 Papageorgiou I, Brown C, Schins R, et al. The effect of nano- and micron-sized particles of cobalt—chromium alloy on human fibroblasts

- in vitro*. Biomaterials, 2007, 28: 2946–2958
- 68 Alexander B M, Jeffrey W G. Characterization of polymer-layered silicate (clay) nanocomposites by transmission electron microscopy and X-ray diffraction: A comparative study. J App Polym Sci, 2003, 87: 1329–1338
- 69 Vermogen A, Masenelli-Varlot K, Seguela R, et al. Evaluation of the structure and dispersion in polymer-layered silicate nanocomposites. Macromolecules, 2005, 38: 9661–9669
- 70 Usuki A, Hasegawa N, Kadoura H, et al. Three dimensional observation of structure and morphology in nylon-6/clay nanocomposite. Nano Lett, 2001, 1: 271–272
- 71 Perrin-Sarazin F, Ton-That M T, Bureau M N, et al. Micro- and nano-structure in polypropylene/clay nanocomposites. Polymer, 2005, 46: 11624–11634
- 72 Yalcin B, Cakmak M. The role of plasticizer on the exfoliation and dispersion and fracture behavior of clay particles in PVC matrix: A comprehensive morphological study. Polymer, 2004, 45: 6623–6638
- 73 Vaia R A, Liu W. X-ray powder diffraction of polymer/layered silicate nanocomposites: Model and practice. J Polym Sci B: Polym Phys, 2002, 40: 1590–1600
- 74 Bafna A, Beaucage G, Mirabella F, et al. 3D hierarchical orientation in polymer-clay nanocomposite films. Polymer, 2003, 44: 1103–1115
- 75 Vaia R A, Liu W, Koerner H. Analysis of small-angle scattering of suspensions of organically modified montmorillonite: Implications to phase behavior of polymer nanocomposites. J Polym Sci B: Polym Phys 2003, 41: 3214–3236
- 76 VanderHart D L, Asano A, Gilman J W. Solid-state NMR investigation of paramagnetic nylon-6 clay nanocomposites. 1. Crystallinity, morphology, and the direct influence of Fe^{3+} on nuclear spins. Chem Mater, 2001, 13: 3781–3795.
- 77 VanderHart D L, Asano A, Gilman J W. Solid-state NMR investigation of paramagnetic nylon-6 clay nanocomposites. 2. Measurement of clay dispersion, crystal stratification, and stability of organic modifiers. Chem Mater, 2001, 13: 3796–3809
- 78 Jeschke G, Panek G, Schleidt S, et al. Addressing the interface in polymer-clay nanocomposites by electron paramagnetic resonance spectroscopy on surfactant probes. Polym Eng Sci, 2004, 44: 1112–1121
- 79 Loo L S, Gleason K K. Fourier transform infrared investigation of the deformation behavior of montmorillonite in nylon-6/nanoclay nanocomposite. Macromolecules, 2003, 36: 2587–2590
- 80 Maupin P H, Gilman J W, Harris R H, et al. Optical probes for monitoring intercalation and exfoliation in melt-processed polymer nanocomposites. Macromol Rapid Commun, 2004, 25: 788–792