

氧化钛纳米管阵列热驱动掺银及其生物活性和抗菌性研究

田 甜^{1,2}, 顾明俊², 董海成², 马 兰², 胡同平³

(1. 西北工业大学 凝固技术国家重点实验室, 陕西 西安 710072)

(2. 中国兵器科学研究院宁波分院, 浙江 宁波 315103)

(3. 包头医学院第一附属医院, 内蒙古 包头 014030)

摘 要: 通过在纯钛表面制备得到氧化钛纳米管阵列后, 再利用热驱动掺银技术, 成功制备得到既具有生物活性, 又具有抗菌性能的银掺杂氧化钛纳米管阵列。研究表明氧化钛纳米管阵列热驱动掺银的机理为硝酸银在受限反应空间中的低温分解及其与氧化钛低温相变的协同。将氧化钛纳米管阵列浸泡饱和硝酸银后, 在 300 °C 条件下热处理, 不仅能实现氧化钛纳米管阵列由无定型转变为金红石型的低温相变, 还能同时实现硝酸银的低温分解。

关键词: 生物活性; 抗菌性; 钛; 移植; 热

中图分类号: TB383

文献标识码: A

文章编号: 1002-185X(2017)04-1020-06

氧化钛纳米管阵列被公开报导后^[1], 并被证明其在许多领域具有优异的应用前景, 如光电化学材料^[2-4]、传感器件^[5]、催化载体材料^[6]、太阳能电池材料^[7]及骨组织工程材料^[8,9]等, 引起了科研工作者们极大的关注。围绕氧化钛纳米管阵列的掺杂研究也相应成为热点^[10-14], 研究表明对氧化钛纳米管阵列进行掺杂, 能有效提高其光电性能、光催化性能。作为医用钛骨移植材料的表面处理技术, 氧化钛纳米管阵列在经热处理后, 会形成锐钛矿型结构或金红石型结构的氧化钛, 具有诱导骨磷灰石形成的能力^[15]。然而作为骨移植材料, 除了具有良好的生物相容性、机械性能以及生物活性外, 抗菌性能也不能忽视。据统计, 在美国每年有 4.3% 的骨移植手术因为细菌感染而失败^[16], 而进行二次手术的难度又较大, 因此需要对钛骨移植材料进行抗菌化处理。

银抗菌剂具有很多优点: (1) 用量小且抗菌的种类多; (2) 具有长期抗菌性; (3) 具有生物相容性, 无细胞毒性和副作用; (4) 化学性质稳定; (5) 易与多种材料复合。因此以银作为抗菌剂的涂层的钛合金抗菌化研究则成为了该领域的热点。

Y. Z. Wan 等^[17]以离子注入的方法在钛合金表面制备了银抗菌层, H. L. Huang 等^[18]利用磁电管溅射的方法在钛合金表面制备得到了具有抗菌性的 TaN-Ag 涂层, D. S. Kutsal 等^[19]采用电沉积的方法在钛合金表面制备得到了银抗菌层。这些方法成功赋予了钛合金抗菌性

能, 但还需进行生物活化处理, 才能满足钛骨移植材料的应用需求。W. Chen 等^[20]利用磁电管溅射的方法在钛合金表面制备得到羟基磷灰石-银复合涂层, 以羟基磷灰石赋予了钛合金生物活性, 以银赋予了钛合金抗菌性。Y. K. Chen 等^[21]依次利用碱处理和等离子喷涂的方法在钛片表面制备得到具有生物活性的含银涂层。D. H. Song 等^[22]采用磁电管在钛合金表面制备得到氧化钛-银复合涂层。L. Z. Zhao 等^[23]在钛片表面制备得到氧化钛纳米管后, 以硝酸银作为浸泡液, 通过光沉积的方法制备得到氧化钛-银复合涂层材料。Y. Y. Song 等^[24]以蛋白诱导方法在钛合金表面制备得到氧化钛-银复合涂层。在使钛合金具有生物活性和抗菌性能的研究方面取得了一定的进展, 但是上述方法或因制造成本高, 或因工艺过程复杂, 或因涂层结合强度不够等原因难于工业化推广应用。开发研究赋予钛合金生物活性和抗菌性的新方法显得十分必要。

Y. Y. Chang 等^[25]在研究氧化钛-银复合涂层的生物相容性时发现, 氧化钛在银复合后仍然具有很好的生物相容性, 为本研究奠定了一定的理论基础。本实验将氧化钛纳米管阵列浸泡于硝酸银溶液后, 采用热驱动的方法, 使银在氧化钛纳米管阵列的受限反应空间中形成, 详细研究了氧化钛纳米管阵列热驱动掺银机理, 并对掺银氧化钛纳米管阵列的生物活性和抗菌性进行了评价。

1 实 验

收稿日期: 2016-04-26

基金项目: 浙江省科技计划项目 (2013C31051)

作者简介: 田 甜, 男, 1982 年生, 博士生, 副研究员, 中国兵器科学研究院宁波分院, 浙江 宁波 315103, Email: fjnutiantian@163.com

1.1 氧化钛纳米管阵列的制备

将钛片(厚 2 mm, 纯度 99.9%) 剪切成 1 cm×10 cm, 封闭并预留研究工作面积 1 cm×1 cm, 经化学抛光后, 依次用丙酮、无水乙醇和去离子水超声清洗, 以钛片为阳极, 以光谱纯石墨片为对电极, 以 0.5% (质量分数) NH_4F 溶液为电解液(以硫酸调节 pH 至 4), 外接直流电源, 在室温下对钛片进行持续 60 min 的阳极氧化。控制阳极氧化电压为 20 V, 氧化结束, 立即取出阳极钛片, 清洗后利用鼓风干燥箱在 40 °C 下烘干备用。

1.2 氧化钛纳米管阵列的热处理掺银

将制备有氧化钛纳米管阵列的钛片分别浸入饱和 AgNO_3 溶液 5 min 后, 在常温下烘干, 之后, 分别在 300、500 和 600 °C 的条件下, 于空气气氛的马弗炉中进行热处理, 热处理 4 h 后随炉冷却。取出后, 用去离子水超声清洗样品表面, 100 °C 空气气氛烘干。

1.3 抗菌性能试验

用经酒精灯灭菌的接种针挑取金黄色葡萄球菌(SAU)、大肠埃希菌(ECO)、肺炎克雷伯菌(Kpn)、铜绿假单胞菌(PAE) 分别放进已灭菌的生理盐水中, 配成 0.5% 的菌浊液, 用已灭菌棉试纸涂布于覆有营养液的 MH 琼脂平板上。然后用镊子将钛片用酒精灯灭菌后, 将钛片放于铺有培养基的 MH 琼脂平板上, 并轻压于琼脂表面, 钛片一旦接触培养基表面, 禁止移动。最后将培养基放入培养箱培养 24 h, 温度设定为 37 °C。24 h 后取出, 观察抑菌圈。

1.4 生物活性试验

将材料置于 1.5 倍的模拟体液(1.5 SBF) 于 36.5 °C 水浴中浸泡一周, 模拟体液每 2 天换一次, 7 天后取出样品用二次蒸馏水洗净在 40 °C 下烘干。模拟体液按照 Kokubo 研究组研制的^[26]标准模拟体液进行配制, 但为了缩短生物活性实验的周期, 将其中的钙磷离子的浓度增加到标准浓度的 1.5 倍, 配制成为 1.5 SBF。

1.5 材料表征

利用高分辨扫描电子显微镜进行材料表面形貌观测, 利用 X 射线衍射仪对材料物相组成进行测试, 利用能谱仪进行材料表面微区成分分析,

并利利用能谱仪进行管内物质成分分析。

2 结果与讨论

2.1 热驱动掺银机理研究

图 1 所示为在不同温度进行热处理后获得的样品的表面形貌, 其中图 1b 为 300 °C 热处理获得的样品, 氧化钛纳米管阵列管口结构依然可见, 表面均匀覆盖有白色颗粒物, 经能谱分析, 白色颗粒为含银物质; 图 1c 为 500 °C 热处理获得的样品, 氧化钛纳米管阵列管口结构消失, 取而代之的是杂乱排列的片状结构物; 图 1d 为 600 °C 热处理获得的样品, 表面形成大量杂乱排列的方柱状晶体。为进行对比, 将所制得的氧化钛纳米管阵列直接在 500 °C 进行热处理, 样品表面形貌如图 1a 所示, 表面管阵结构明显。对比结果说明氧化钛纳米管阵列在浸泡硝酸银溶液后, 再进行热处理, 其形貌结构会随着热处理温度的升高发生重大变化, 当热处理温度等于或小于 300 °C 时, 氧化钛纳米管阵列表面形貌相对规则, 且表面能形成大量均匀散布的含银颗粒物。

图 2 所示为样品表面 XRD 图谱。其中 a、b 分别为氧化钛纳米管阵列和浸泡硝酸银氧化钛纳米管阵列的 XRD 图谱, 图中均只出现了钛的特征衍射峰, 说明经阳极氧化制备得到的氧化钛纳米管阵列为无定型结构, 且该无定型氧化钛纳米管阵列浸泡硝酸银后, 如果不进行热处理, 硝酸银会在样品超声清洗的过程中洗脱。c 为氧化钛纳米管阵列在 300 °C 热处理后的 XRD 图谱, 图中除了有钛的特征衍射峰, 还出现了明显的锐钛矿型氧化钛的特征衍射峰(A), 说明氧化钛纳米管阵列在 300 °C 热处理时, 其晶体结构会向锐钛矿型结构转变。d 为氧化钛纳米管阵列浸泡硝酸银溶液后, 再经 300 °C 热处理的样品的 XRD 图谱, 图中除了有钛的特征衍射峰, 还出现了金红石型氧化钛的特征衍射峰(R) 和银的特征衍射峰(Ag), 但是未见

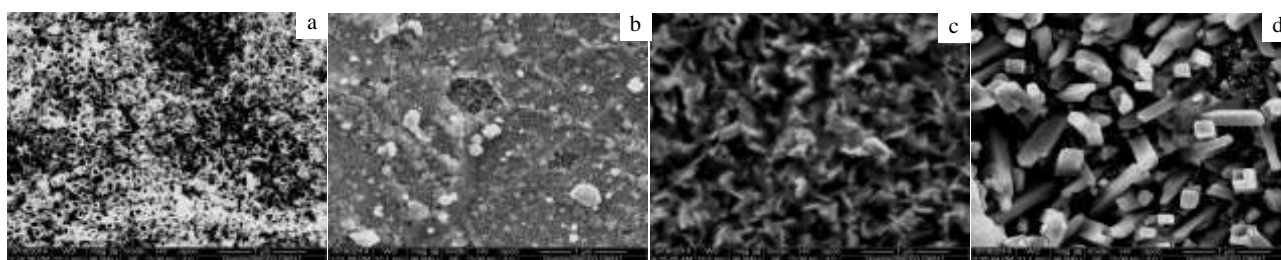


图 1 不同温度热处理样品表面形貌

Fig.1 Surface morphologies of the samples heated at different temperatures: (a) no Ag-doped, 500 °C; (b) Ag-doped, 300 °C; (c) Ag-doped, 500 °C; (d) Ag-doped, 600 °C

锐钛矿型氧化钛的特征衍射峰出现, 也未见其它含银化合物的特征衍射峰, 说明在该温度下, 无定型结构的氧化钛能转变为金红石型结构, 且图 1b 表面的含银颗粒为单质银。同样的热处理条件, 制备出的样品表面的氧化钛的晶体结构却存在明显差异, 说明硝酸银的介入影响了氧化钛的热力学相变过程, 降低了氧化钛相转变温度, 抑制了锐钛矿型氧化钛的形成, 促使氧化钛由无定型结构转变为金红石型结构。

何超等^[27]在研究银掺杂对氧化钛粉末结构的影响时, 发现银有抑制锐钛矿粒子生长的趋势, 能促进氧化钛向金红石型结构转变。Mackenzie 等^[28,29]在研究 Fe³⁺等掺杂元素对氧化钛相转变的促进作用时发现, 可通过提高氧化钛粒子表面阴离子空穴位的浓度, 促进氧化钛晶格的重组和金红石晶体的形成。对于氧化钛纳米管阵列掺杂 Ag 而言, Ag 能促进氧化钛相转变的原因可能是由于 Ag 的掺杂增加了氧化钛表面氧空位的浓度。因为 Ag⁺的半径 (126 pm) 远大于 Ti⁴⁺ (68 pm), Ag⁺不能进入氧化钛的晶格形成固溶体, 所以在热处理过程中, 它们只能在氧化钛纳米管阵列的表面扩散、迁移。当 Ag⁺被还原时, 为了平衡电荷, 氧化钛纳米管阵列表面将产生氧空位。因此氧化钛纳米管阵列表面阴离子空位浓度增大, 促进了 Ti⁴⁺和 O²⁻离子的重排及氧化钛晶格的重组, 促进了金红石型氧化钛的形成。

此外, 银的特征衍射峰的出现也属于异常现象, 硝酸银的热分解温度约为 440 °C, 试验条件所设置的热处理温度为 300 °C, 远小于硝酸银的热分解温度。这可能是由于纳米尺寸效应的影响。当氧化钛纳米管阵列浸泡硝酸银后, 在干燥过程中重新结晶, 并以纳

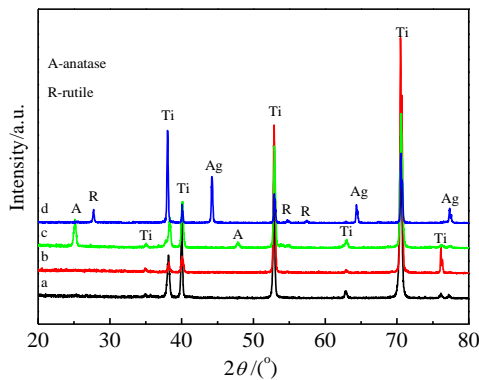


图 2 样品的 XRD 图谱

Fig.2 X-ray diffraction patterns of samples (a-no Ag-doped,

unannealed; b-Ag-doped, unannealed; c-no Ag-doped, 300 °C; d-Ag-doped, 300 °C)

米质点的形式散布于氧化钛纳米管阵列表面和纳米管内壁, 在对其进行热处理时, 纳米尺寸效应发生作用, 降低了其热分解温度。

图 3a 所示为氧化钛纳米管阵列浸泡硝酸银后, 再经 300 °C 热处理获得的样品的纳米管的透射电子显微镜图片。从图中可以看出, 氧化钛纳米管阵列的长度达到微米级, 管径约 50 nm, 管壁很薄, 且内壁均挂有不连续黑色质点。图 3b 所示为图 3a 用圈标记处的能谱图, 图中除了有钛和氧的峰, 还出现了银的峰, 结合 XRD 图谱 (图 2) 分析, 说明氧化钛纳米管内形成的黑色质点为单质银。

综合上述分析, 氧化钛纳米管阵列的热驱动掺银的基本原理是硝酸银在纳米管受限反应空间中的热分解, 且当热处理温度在 300 °C 时, 能够实现氧化钛纳米管相转变与硝酸银分解的协同, 从而形成管内掺银和表面覆盖银粒子的金红石型氧化钛纳米管阵列。

2.2 生物活性评价

通常将材料浸泡在生理模拟液中一段时间后, 磷灰石在材料表面的形成能力是衡量该材料是否具有生物活性的重要依据。图 4 所示为 300 °C 热处理掺银样

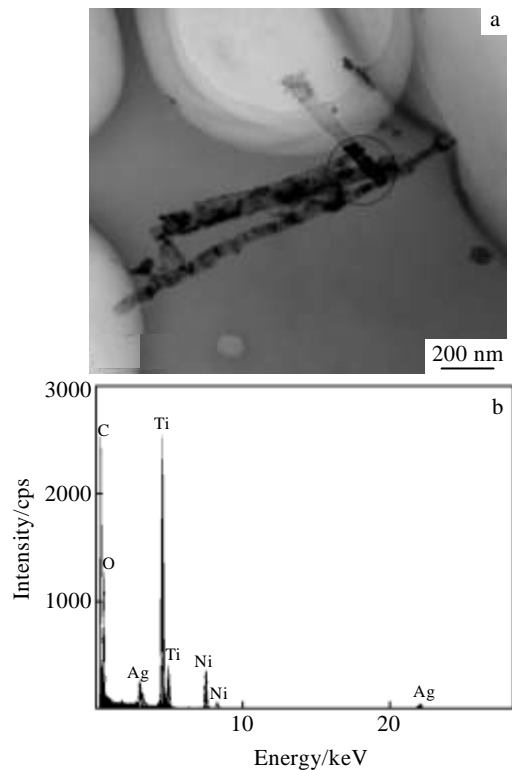


图 3 银掺杂、300 °C 热处理样品的 TEM 照片和圆圈处的 EDS

能谱

Fig.3 TEM image (a) of Ag-doped titania nanotube arrays heated at 300 °C and EDS spectrum (b) corresponding to the circle in Fig.3a

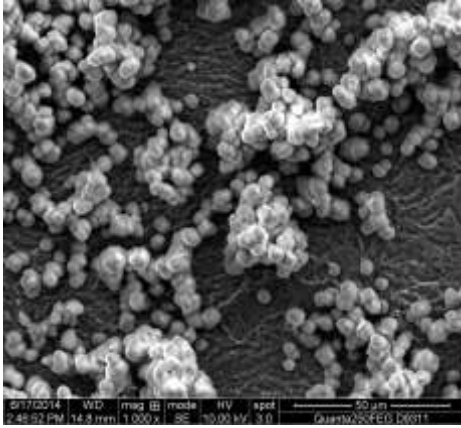


图 4 300 °C 热处理银掺杂氧化钛纳米管阵列浸泡 1.5 SBF 后的表面形貌

Fig.4 Surface micrograph of Ag-doped titania nanotube arrays heated at 300 °C and soaked in the 1.5 SBF

品在浸泡模拟体液后的表面形貌, 样品表面均匀的形成了新物质, 该新物质层经 X 射线衍射仪表征, 结果如图 5 所示。谱图中出现了磷灰石的特征衍射峰 (H), 结果说明 300 °C 热处理掺银样品具有生物活性, 能够在模拟体液中诱导形成磷灰石。

将样品浸于模拟体液时, 金红石型氧化钛会发生水解而形成大量的 Ti-OH 群, 表面形成的 Ti-O-通过库仑力吸引 Ca²⁺, 通过氢键吸引 PO₄³⁻, 使表层的 [Ca²⁺]、[PO₄³⁻]、[OH⁻] 等的离子浓度增大至过饱和状态, 直至以磷灰石的形式不断地从模拟体液中沉积到材料表面, 形成磷灰石层, 表现出诱导磷灰石形成的生物活性。

2.3 抗菌性能评价

图 6 所示为 300 °C 热处理获得的掺银样品的细菌抗杀试验结果, 其中图 6a 为样品抗杀金黄色葡萄球菌 (SAU) 的结果, 图 6b 为样品抗杀大肠埃希菌 (ECO)

的结果, 图 6c 为样品抗杀肺炎克雷伯菌 (Kpn) 的结果, 图 6d 为样品抗杀铜绿假单胞菌 (PAE) 的结果。

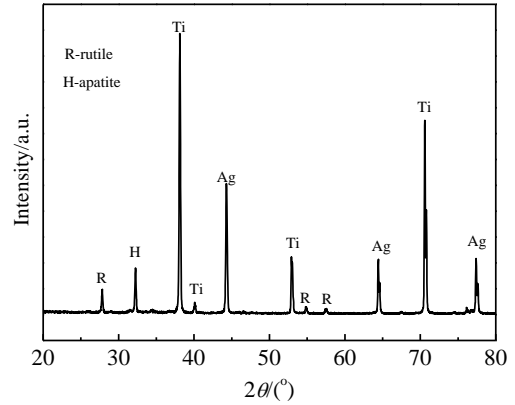


图 5 300 °C 热处理银掺杂氧化钛纳米管阵列浸泡 1.5 SBF 后的 XRD 图谱

Fig.5 X-ray diffraction pattern of Ag-doped titania nanotube arrays heated at 300 °C and soaked in the 1.5 SBF

从图中可以清晰地看到, 在 4 组抗菌试验结果中, 样品周围均出现了抑菌圈, 表明上述 4 种细菌均不能在该材料表面和周围生存、繁殖。

为进行对照, 将 300 °C 热处理后的氧化钛纳米管阵列进行细菌抗杀试验, 结果如图 7 所示, 其中图 7a 为样品抗杀 SAU 的结果, 图 7b 为样品抗杀 ECO 的结果, 图 7c 为样品抗杀 Kpn 的结果, 图 7d 为样品抗杀 PAE 的结果。材料周围均未出现抑菌圈, 说明未经掺银的氧化钛纳米管阵列不具有抗菌性能。300 °C 热处理获得的掺银样品的抗菌性能主要来源于银的掺杂。

银是一种广谱性杀菌材料, 杀菌能力很强, 关于银的抗菌机理, 有金属溶出杀菌机理、光催化杀菌机理和复合杀菌机理 3 种^[30-35]。由于本研究在抗菌性能评价过程中未利用光照条件, 可排除光催化杀菌机理。在细菌抗杀对比试验中, 未掺银的样品不具有抗菌性能, 可排除复合杀菌机理。因此以金属溶出杀菌机理更能合理地解释掺银样品的抗菌机理: 银离子溶出后,

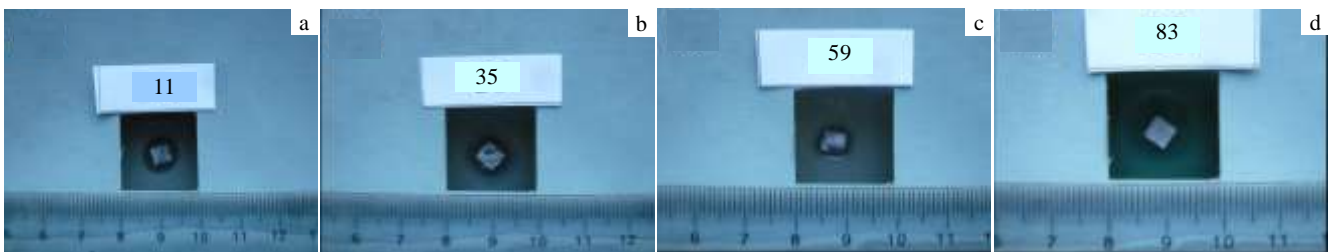


图 6 300 °C 热处理银掺杂氧化钛纳米管阵列抗菌效果图

Fig.6 Antimicrobial effects of Ag-doped titania nanotube arrays heated at 300 °C on different bacteria: (a) SAU, (b) ECO, (c) Kpn, and (d) PAE

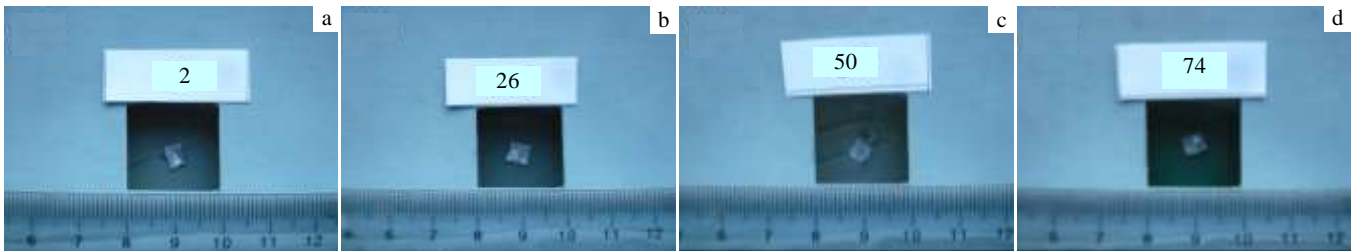


图 7 300 °C 热处理未掺银氧化钛纳米管阵列抗菌效果图

Fig.7 Antimicrobial effects of titania nanotube arrays heated at 300 °C without Ag-doping on different bacteria: (a) SAU, (b) ECO, (c) Kpn, and (d) PAE

使细菌的固有成分被破坏，尤其是当溶出的银离子接触到细菌的细胞膜时，因细胞膜带负电荷，银离子在库仑力的作用下牢固地吸附在细胞膜上，甚至穿透细胞壁进入细菌内部，与细菌体内的蛋白质、核酸中存在的巯基（-SH），氨基（-NH₂）等含硫、氮的官能团发生反应，使细菌细胞的蛋白质凝固，破坏细菌细胞合成酶的活性，影响细菌 DNA 的合成，使细菌细胞丧失分裂增殖能力，杀灭细菌。由于氧化钛纳米管内部被证明已经掺入银，该材料可能具有很好的持久抗菌能力。

3 结 论

1) 氧化钛纳米管阵列热驱动掺银技术能有效赋予钛合金生物活性和抗菌性，该技术工艺简单、条件温和，在 300 °C 热处理温度下，就能实现氧化钛纳米管阵列晶体结构向金红石型转变、氧化钛纳米管阵列管内和表面掺银。

2) 热驱动掺银技术不仅实现了硝酸银在纳米管受限反应空间中的低温分解，还实现了氧化钛在低温条件下向金红石型转变。

参考文献 References

- [1] Gong D W, Grimes C A, Varghese O K *et al. Journal of Materials Research*[J], 2001, 16(12): 3331
- [2] Varghese O K, Mor G K, Grimes C A *et al. Journal of Nanoscience and Nanotechnology*[J], 2004, 4(7): 733
- [3] Varghese O K, Gong D W, Paulose M *et al. Advanced Materials*[J], 2003, 15(7-8): 624
- [4] Mor G K, Varghese O K, Paulose M *et al. Thin Solid Films*[J], 2006, 496(1): 42
- [5] Shankar K, Mor G K, Prakasam H E *et al. Nanotechnology*[J], 2007, 18(6): 065 707
- [6] Mor G K, Shankar K, Paulose M *et al. Nano Letters*[J], 2006, 6(2): 215
- [7] Mor G K, Shankar K, Paulose M *et al. Applied Physics Letters*[J], 2007, 91(15): 152 111
- [8] Oh S H, Finones R R, Daraio C *et al. Biomaterials*[J], 2005, 26(24): 4938
- [9] Xiao X F, Liu R F, Tian T. *Journal of Alloys and Compounds*[J], 2008, 466(1-2): 356
- [10] Wu F, Hu X Y, Fan J *et al. Plasmonics*[J], 2013, 8(2): 501
- [11] Xu C, Song Y, Lu L F *et al. Nanoscale Research Letters*[J], 2013, 8(1): 391
- [12] Tian Tian(田 甜), Tian Xiaoting(田小亭), Zhou Hongwei(周宏伟) *et al. Materials Science and Technology(材料科学与工艺)*[J], 2014, 22(1): 14
- [13] Xu Baolong(徐宝龙), Zhang Qifu(张启富), Zhang Xiaojun(张晓君) *et al. Journal of Functional Materials(功能材料)*[J], 2012, 43(11): 1382
- [14] Wang Jianye(王建业), Zhao Zhihuan(赵志换), Fan Jimin(范济民) *et al. Journal of Functional Materials(功能材料)*[J], 2013, 44(10): 1502
- [15] Tian T, Xiao X F, She H D *et al. Materials Science-Poland*[J], 2008, 26(3): 487
- [16] Hetrick E M, Schoenfish M H. *Chemical Society Reviews*[J], 2006, 35(9): 780
- [17] Wan Y Z, Raman S, He F *et al. Vacuum*[J], 2007, 81(9): 1114
- [18] Huang H L, Chang Y Y, Lai M C *et al. Surface and Coatings Technology*[J], 2010, 205(5): 1636
- [19] Kutsal D S, Ozalp H, Attar A *et al. Journal of Clinical Neuroscience*[J], 2011, 18(3): 391
- [20] Chen W, Liu Y, Courtney H S *et al. Biomaterials*[J], 2006,

- 27(32): 5512
- [21] Chen Y K, Zheng X B, Xie Y T *et al.* *Surface and Coatings Technology*[J], 2009, 204(5): 685
- [22] Song D H, Uhm S H, Lee S B *et al.* *Thin Solid Films*[J], 2011, 519(20): 7079
- [23] Zhao L Z, Wang H R, Huo K F *et al.* *Biomaterials*[J], 2011, 32(24): 5706
- [24] Song Y Y, Yang T, Cao J *et al.* *Microchimica Acta*[J], 2012, 177(1-2): 129
- [25] Chang Y Y, Lai C H, Hsu J T *et al.* *Clinical Oral Investigations*[J], 2012, 16(1): 95
- [26] Kokubo T, Kushitani H, Sakka S *et al.* *Journal of Biomedical Materials Research*[J], 1990, 24(6): 721
- [27] He Chao(何超), Yu Yun(于云), Zhou Caihua(周彩华) *et al.* *Journal of Inorganic Materials*(无机材料学报)[J], 2003, 18(2): 457
- [28] Mackenzie K J D. *Trans J Br Ceram Soc*[J], 1975, 74(2): 29
- [29] Hsiang H I, Lin S C. *Ceramics International*[J], 2008, 34(3): 557
- [30] Zhang Y, Yin Q S, Zhang Y *et al.* *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*[J], 2010, 21(8): 2453
- [31] Yuranova T, Rincon A G, Bozzi A *et al.* *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*[J], 2003, 161(1): 27
- [32] Feng Q L, Wu J, Chen G Q *et al.* *Journal of Biomedical Materials Research*[J], 2000, 52(4): 662
- [33] Jung W K, Koo H C, Kim K W *et al.* *Applied and Environmental Microbiology*[J], 2008, 74(7): 2171
- [34] Yoshida K, Tanagawa M, Atsuta M. *Journal of Biomedical Materials Research*[J], 1999, 47(4): 516
- [35] Satoshi I. *Dental Materials*[J], 2003, 19(6): 449

Titania Nanotube Arrays with Thermal Driven Ag Doping and Their Bioactivity and Antibacterial Performance

Tian Tian^{1,2}, Gu Mingjun², Dong Haicheng², Ma Lan², Hu Tongping³

(1. State Key Laboratory of Solidification Processing, Northwestern Polytechnical University, Xi'an 710072, China)

(2. Ningbo Branch of China Academy of Ordnance Science, Ningbo 315103, China)

(3. The First Affiliated Hospital of Baotou Medical College, Baotou 014030, China)

Abstract: Titania nanotube arrays were prepared on the surface of pure titanium and then Ag-doped titania nanotube arrays with excellent bioactive and antibacterial performance were obtained by thermal driven Ag-doping. Results show that the mechanism of thermal driven Ag-doping is the collaboration of thermal decomposition of silver nitrate in the limited space with the phase transition of titania at low temperature. After being soaked in saturated silver nitrate and annealed at 300 °C, the titania nanotube arrays can realize the low temperature phase transition from amorphous to rutile, and the low temperature decomposition of silver nitrate within it.

Key words: bioactivity; antibacterial; titanium; implant; thermal

Corresponding author: Tian Tian, Candidate for Ph. D., Associate Research Fellow, Ningbo Branch of China Academy of Ordnance Science, Ningbo 315103, P. R. China, E-mail: fjnutiantian@163.com