

碱热处理对 Ti-3Cu 合金表面特征及抗菌性能的影响

张二林, 刘博群

(东北大学, 辽宁 沈阳 110819)

摘要: 研究了碱热处理对抗菌钛合金显微组织、表面粗糙度、接触角及抗菌性的影响规律, 探讨了碱热处理应用于 Ti-3Cu 表面生物改性的可能性。结果表明: 碱热处理后在钛合金表面形成一层钛酸盐凝胶层, 表面分布有大量尺寸约 100 nm 的纳米级微孔, 这使得合金的粗糙度降低, 但合金表面的亲水性提高。合金表面钛酸盐凝胶层的形成使得合金的抗菌性能由处理前的 92%降低到碱热处理后的 71%。细菌的粘附实验也证实碱热处理一定程度上降低了合金的抗菌性能。分析认为, 表面形成的钛酸盐凝胶层部分阻断了合金中抗菌相 Ti_2Cu 与细菌的接触, 因此降低了合金的抗菌效果。

关键词: 抗菌钛合金; 碱热处理; 显微组织; 粗糙度; 抗菌性

中图分类号: TG146.23

文献标识码: A

文章编号: 1002-185X(2020)03-0973-07

细菌感染是生物医用材料术后严重的并发症之一。体液内的微生物感染及微生物腐蚀大大降低了生物植入材料的使用寿命, 甚至导致植入失败, 给人类带来严重的健康威胁和沉重的经济负担。统计表明: 全髋关节植入体内后感染率为0.1%~1%; 全膝关节植入后感染率为1%~4%; 全肘关节植入后感染率为4%~7%^[1-3]; 美国每年由细菌感染引起的血管内导管感染病例有15~20万例, 引起的死亡人数为3~4万, 死亡率高达20%^[4]; 世界每年约有1200万人死于与病菌感染相关的疾病, 其中金葡菌感染占总体感染的30%^[5]。可见, 有效预防与控制植入材料的术后感染是生物医用材料成功用于临床的关键。

与传统的钴合金和不锈钢相比, 钛和钛合金具有低密度、高比强度、较好的耐蚀性、与人骨相近的弹性模量及良好的生物相容性, 被认为是目前最有发展前景的金属生物材料之一, 已成为人造髋关节、牙种植体、血管支架及骨缝合术等领域的临床首选材料^[6,7]。前期的研究结果已经表明, Ti-3Cu 合金不仅具有良好的力学性能和耐蚀性能, 而且具有非常强的抗菌性能(抗菌率>90%), 因此作为一种新型的功能性生物医学材料, 非常有前途^[8,9]。但是, 作为植入材料, Ti-3Cu 的细胞相容性仍然有待于提高, 尽管合金本身并没有表现出细胞毒性。碱热处理已经被很多研究结果证实可以显著提高钛合金表面的细胞粘附和铺展, 是一种非常有效的钛合金表面生物改性技术^[10,11]。本工作在前期研究抗菌钛合金的基础上, 研究了碱处

理对抗菌钛合金显微组织、表面粗糙度、接触角及抗菌性的影响, 探讨了碱热处理应用于 Ti-3Cu 表面生物改性的可能性。

1 实验

将商业纯钛(99.9%)和纯铜(99.9%)按照设计的合金成分配制熔炼原料, 然后采用非自耗真空电弧熔炼炉熔炼成 Ti-3Cu 合金铸锭。为了获得均匀的化学成分, 铸锭反复重熔 3 次。然后铸锭在 800~900 °C 进行锻造, 制成直径 15 mm, 长 3 m 的 Ti-3Cu 合金棒材。锻造后 Ti-3Cu 合金棒材进行抗菌热处理(固溶处理与时效)。固溶处理在箱式电阻炉中进行, 固溶处理制度为 900 °C/5 h, 固溶处理后的试样要进行时效处理, 其工艺为 400 °C/16 h。

将钛合金试样放入 60 °C 的 10 mol/L NaOH 溶液中浸泡 24 h 进行碱处理, 取出后用无水乙醇和去离子水依次超声波清洗 2 遍, 吹干, 在恒温保温箱中干燥 1 h。然后在 500 °C 处理 1 h, 炉冷至室温, 用无水乙醇和去离子水依次清洗 2 遍, 在保温箱中干燥备用。

利用场发射扫描电子显微镜(FE-SEM, ZEISS SIGMA 500/VP)及其能谱仪进行样品的显微组织观察和成分分析。在 X 射线衍射仪(XRD, SmartLab, Japan)上进行材料的物相分析。用光电子能谱(X-ray Photoelectron Spectroscopy, XPS)分析和确定合金表面元素的存在形式和化学价态。

用激光共聚焦显微镜(CLSM)测量样品表面的

收稿日期: 2019-03-10

基金项目: 国家自然科学基金(81071262); 东北大学创新创业学院资助项目

作者简介: 张二林, 男, 1968 年生, 博士, 教授, 东北大学材料科学与工程学院, 辽宁 沈阳 110819, 电话: 024-83689400, E-mail: zhangeli@atm.neu.edu.cn

粗糙度,借助于 20 X 的物镜随机扫描样品表面的 3 个区域,从而获得三维形貌图,通过 LEXT 软件分析平面粗糙度值。用悬滴法在接触角测量仪 SL200B (KINO, 美国)上测试试样表面的亲水性,每个样品取 3 个点测量,取其平均值并计算标准偏差。

称取 3 g 牛肉膏、10 g 蛋白胨、5 g NaCl 加入到盛有 1000 mL 的蒸馏水锥形瓶内搅拌均匀,将 pH 调至 7.0~7.2,用橡胶塞塞紧和牛皮纸封口,在高压蒸汽灭菌锅内灭菌 30 min,取出冷却,在 4 °C 的保温箱密封保存备用。

用棉线将样品竖直浸泡在配置好的细菌悬液中,在不同的时间点将样品取出,然后再在样品表面滴加 1 mL 戊二醛溶液,4 h 后将戊二醛用移液管吸出,依次用 30%、50%、70%、90%乙醇脱水 10 min,放在保温箱待其干燥,表面喷金后在 SEM 下观察样品表面细菌的粘附情况。

根据《中华人民共和国轻工业行业标准-抗菌塑料抗菌性能实验方法和抗菌效果》(QB/T 2591-2003)进行抗菌实验。具体步骤如下:(1) 分别将空白试样(玻璃片)、对照组(纯钛片)和实验组(碱热处理的 Ti-3Cu 合金)试样在乙醇溶液中浸泡 1 h 后置于 12 孔板中,每孔 1 个样品;(2) 取配好的 80 μ L 金黄色葡萄球菌菌液接种到试样上;(3) 将接种有菌液的试样连同 12 孔板一起放入温度(37 $\pm$ 1) °C、相对湿度>90%的恒温箱中培养 24 h;(4) 24 h 后取出 12 孔板,滴入 2 mL 生理盐水放在震荡器上震荡 5 min 充分清洗样品表面的细菌。然后取 100 μ L 上述清洗液体铺展到琼脂培养基上,涂布均匀后置于恒温箱中培养 24 h;(5) 用自动菌落计数仪测定琼脂板上的活菌数,按照公式(1)计算抗菌率^[12],抗菌率 $R \geq 90\%$ 的合金可以报告为有抗菌作用,抗菌率 $R \geq 99\%$ 的合金可以报告为有强抗菌作用。

$$R = \frac{\text{对照组菌落数} - \text{实验组菌落数}}{\text{对照组菌落数}} \times 100\% \quad (1)$$

2 结果与讨论

2.1 碱热处理对 Ti-3Cu 合金微观组织与形貌的影响

图 1 是 Ti-3Cu 合金在碱热处理前后的 XRD 图谱。未处理的 Ti-3Cu 合金主要由 α -Ti 和 Ti_2Cu 相组成。碱热处理后,除了仍然有 α -Ti 和少量的 Ti_2Cu 相外,出现了钛酸钠的衍射峰,说明碱热处理后,在钛合金表面形成了一层钛酸钠凝胶的反应层。这与其他研究者的结果相一致^[11]。

图 2 给出了 Ti-3Cu 合金碱热处理前后的表面 SEM 形貌。图 2a 是碱热处理前 Ti-3Cu 合金的表面形貌。

经过金刚石抛光处理后,表面没有明显划痕,表面形态均一平整,右上角为局部放大的 SEM 形貌,即使在高倍下,表面仍然十分平整。图 2b 为碱热处理后的 Ti-3Cu 合金的表面形貌。相对于未处理的 Ti-3Cu 合金,碱热处理后表面仍然保持原始形貌,但碱热处理后的 Ti-3Cu 表面平整,相当光滑,呈现蓝灰色,在扫描电镜观察下有沟纹状起伏的微粗糙面,反应层均匀,局部有裂隙。通过进一步放大后发现形成大小约为 100 nm 的纳米级微孔。

图 3 为 Ti-3Cu 合金碱热处理前后的 EDS 能谱,合金元素含量见表 1。在未进行碱热处理的 Ti-3Cu 合金中 Ti 的含量是 97.45%,Cu 的含量是 2.55%,与合金的配制成分基本吻合。经碱热处理后的表面有 Ti、

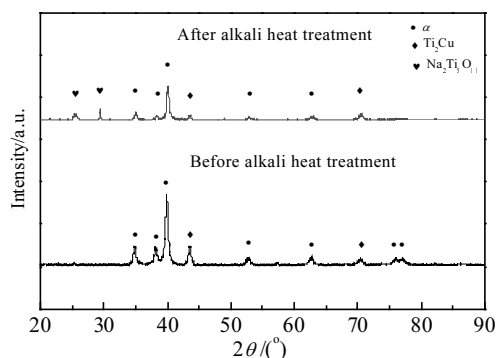


图 1 碱热处理前后的 XRD 图谱

Fig.1 XRD patterns of Ti-3Cu alloy before and after alkali heat treatment

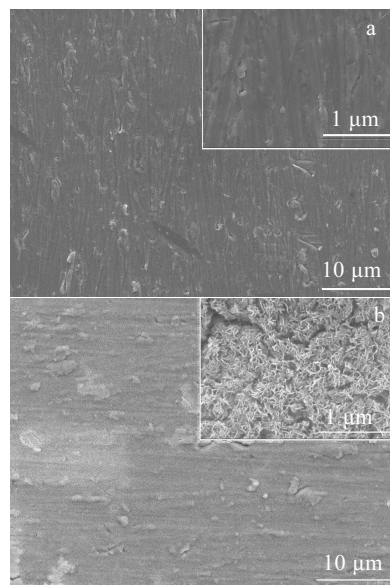


图 2 Ti-3Cu 碱热处理前后的表面 SEM 形貌

Fig.2 SEM morphologies of Ti-3Cu alloy before (a) and after (b) alkali heat treatment

O、Na、Ca 和 Cu 元素, Cu 的含量为 0.79%, 说明碱热处理后 Ti-3Cu 合金表面的 Cu 含量会降低。这可能是表面反应层覆盖在合金的表面, 合金中的 Ti_2Cu 相被覆盖, 所以 Cu 含量明显降低。

图 4 为 Ti-3Cu 合金碱热处理后表面的 XPS 全谱图和 Ti 2p、O 1s、Cu 2p 高分辨谱图。由图可见, 表面主要成分为 Ti、Cu、O 和 C。C 可能源自空气中碳污染。碱热处理后 Ti 2p 双峰结合能 Ti $2p_{1/2}$ 和 Ti $2p_{3/2}$ 对应的 2 个峰分别在 464.2 和 458.5 eV 附近, 这说明 Ti 以 TiO_2 的形式存在合金的表面。Cu 2p 双峰结合能 Cu $2p_{1/2}$ 和 Cu $2p_{3/2}$ 对应的 2 个峰分别在 933.4 和 953.0 eV 附近, 这表明 Cu 以 CuO 的形式存在。O 1s 图谱呈现对称性, 对应的峰值 530.20 eV, 对应着 TiO_2 和 CuO 中氧元素的化学态。从 Cu 元素的 XPS 分析结果可以看出, Ti_2Cu 对应的零价 Cu 含量非常少, 这也证实了表面形成的反应层覆盖了合金中的 Ti_2Cu 相, 但是同时部分 Cu 参与了反应形成了少量的 CuO。

2.2 碱热处理对 Ti-3Cu 合金亲水性的影响

图 5 为 cp-Ti 及 Ti-3Cu 合金表面碱热处理前后的二维与三维形貌图。图 5a 和图 5b 分别为 cp-Ti 的表面二维与三维形貌, 图 5a 中给出了激光共聚焦显微镜放大倍数为 240 倍及 1200 倍的二维形貌, 图 5b 为表征合金表面粗糙度的等高图, 图中不同的颜色代表不同的粗糙度。由图可知, cp-Ti 表面比较光滑平整, 无较大的起伏。

图 5c 和图 5d 所示为未处理 Ti-3Cu 合金表面的二维与三维形貌。图 5c 中为激光共聚焦显微镜放大倍数 240 倍及 1200 倍的二维形貌, 图 5d 为合金表面粗糙度的等高图, 未处理 Ti-3Cu 合金表面比较平整光滑, 也无较大起伏。图 5e 和图 5f 为碱热处理后 Ti-3Cu 合金表面的二维与三维形貌, 碱热处理后的 Ti-3Cu 合金表面较纯钛和 Ti-3Cu 合金处理前更加平整, 粗糙度等高图均为黄色, 这说明经碱热处理后 Ti-3Cu 合金的粗糙度比较小。

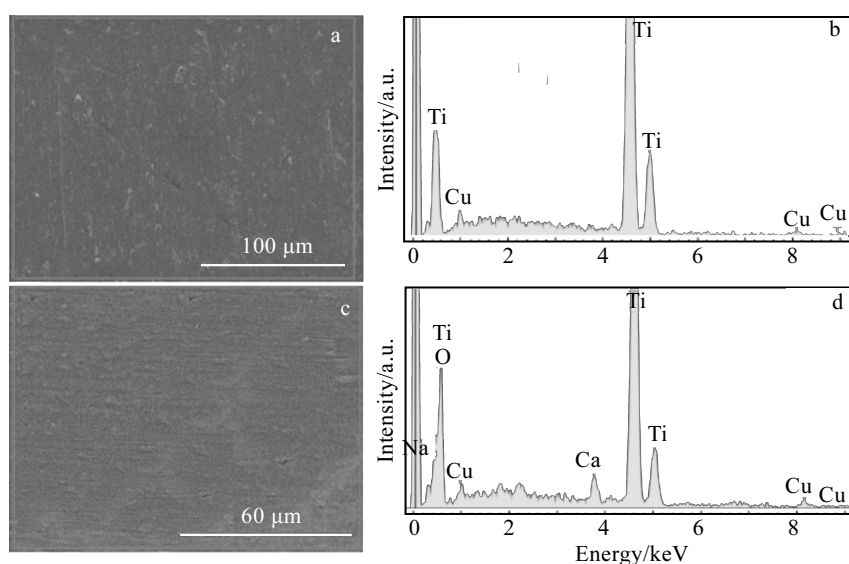


图 3 Ti-3Cu 合金碱热处理前后的 EDS 能谱

Fig.3 SEM images (a, c) and EDS spectra (b, d) of Ti-3Cu alloy before (a, b) and after (c, d) alkali heat treatment

表 1 碱热处理前后 Ti-3Cu 合金的元素含量

Table 1 EDS analysis of Ti-3Cu alloy before and after alkali heat treatment (at%)

Element	O	Ti	Cu	Na
Untreated Ti-3Cu	-	97.45	2.55	-
Alkali heat-treated	50.62	35.73	0.79	0.8

图 6 给出了 cp-Ti 及 Ti-3Cu 合金碱热处理前后的表面粗糙度和接触角。结果表明, 未处理的 cp-Ti 和 Ti-3Cu 合金的表面粗糙度 R_a 值分别为 0.523 和 0.812 μm 。经碱热处理后 Ti-3Cu 合金的 R_a 值为 0.801 μm , 说明尽管碱热处理在钛合金基体表面形成了一层钛酸钠水凝胶层, 但对合金表面的粗糙度影响不大。未处理 Ti-3Cu 合金的接触角约为 51° , 碱热处理后合金表面接触角降低, 约为 40° , 这表明碱热处理可提高合金表面的亲水性。

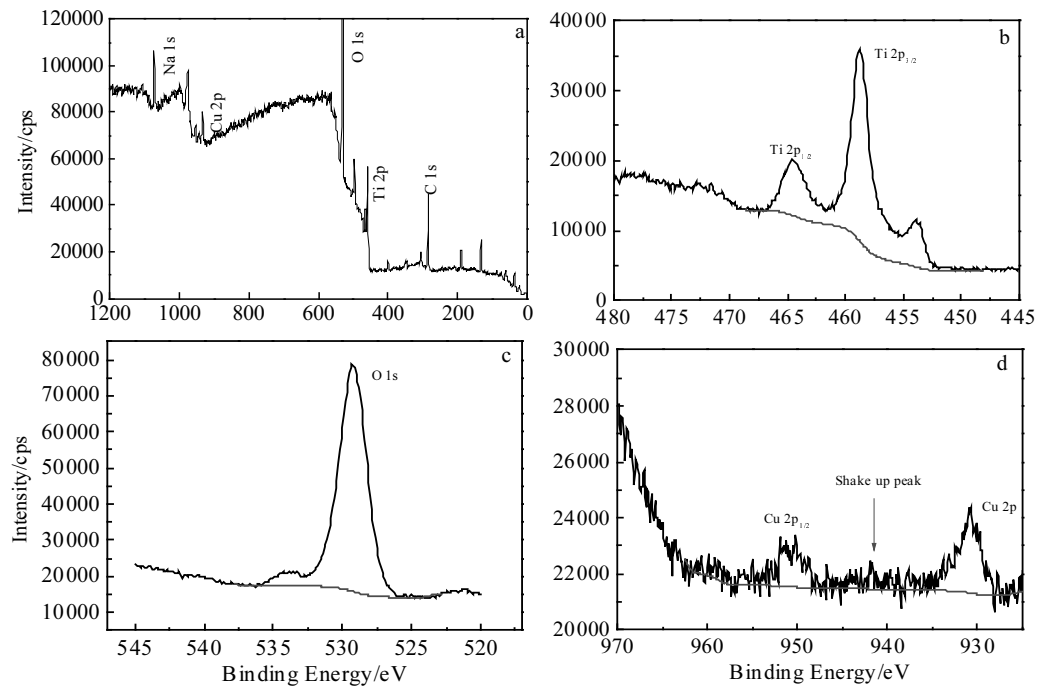


图 4 碱热处理 XPS 全谱和 Ti 2p、O 1s、Cu 2p 高分辨谱图

Fig.4 XPS patterns (a) and Ti 2p (b), O 1s (c) and Cu 2p (d) high-resolution spectra of alkali surface treatment

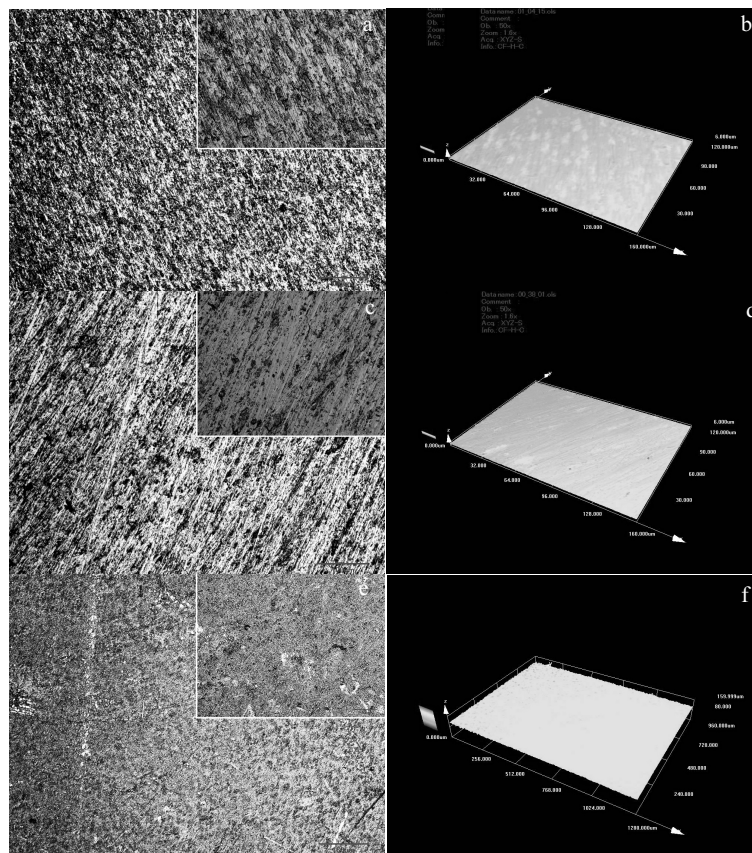


图 5 碱热处理前后 Ti-3Cu 合金二维和三维图

Fig.5 2D (a, c, e) and 3D surface (b, d, f) morphologies of the samples before (c, d) and after (e, f) alkali heat treatment: (a, b) cp-Ti; (c~f) Ti-3Cu

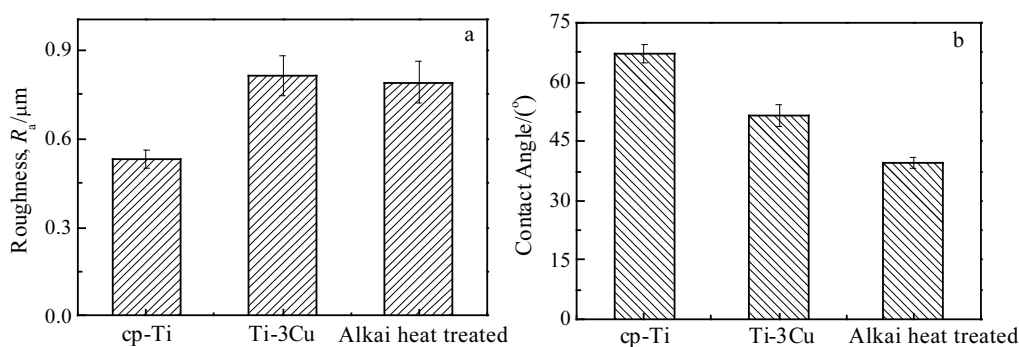


图6 碱热处理前后试样表面的粗糙度和接触角

Fig.6 Surface roughness (a) and contact angle (b) of the samples before and after alkali heat treatment

2.3 碱热处理对 Ti-3Cu 合金抗菌性的影响

图7为cp-Ti及碱热处理前后Ti-3Cu合金在金葡萄菌液中培养24h后细菌粘附情况。经过24h的培养,大量的细菌粘附在纯钛的样品表面,如图7a所示。未进行表面处理的Ti-3Cu样品表面并没有细菌粘附,如图7b。图7c为经碱热处理后合金表面的细菌粘附情况,样品表面有非常少量的细菌粘附。

图8为金黄色葡萄球菌在cp-Ti及碱热处理前后Ti-3Cu合金样品表面培养24h的细菌生长情况。结果表明,cp-Ti表面长满大量的细菌,也就是说cp-Ti没有抗菌性能。碱热处理前Ti-3Cu合金表面上生长的细菌数量微乎其微,只存在少量的细菌,其抗菌率达92%,如图8b所示,这说明Ti-3Cu具有非常优异的抗菌性能。图8c为经碱热处理的Ti-3Cu表面培养24h

后的细菌数量,碱热处理后Ti-3Cu表面细菌的数量同样比cp-Ti少很多,但比未处理Ti-3Cu多一些,碱热处理的抗菌率为71%,也就是经碱热处理后Ti-3Cu合金的抗菌率稍有降低,但仍有一定的抗菌性能。

通过上述实验及分析不难发现,钛合金经过碱热处理后,在钛合金表面形成一层具有亚微米级微孔结构的钛酸钠涂层,这一涂层并没有改变表面的粗糙度,但是却提高了表面的亲水性能。有资料显示,钛合金表面亲水性的提高有利于细胞的粘附,特别是表面的亚微米结构更有利于细胞在表面的铺展^[13, 14]。另外,表面亲水性的提高也有助于表面细菌的粘附^[15, 16]。

抗菌实验的结果表明,碱热处理在一定程度上降低了合金的抗菌性能,抗菌率从92%降低到71%。认为,一方面表面处理形成的钛酸盐涂层覆盖了表面的

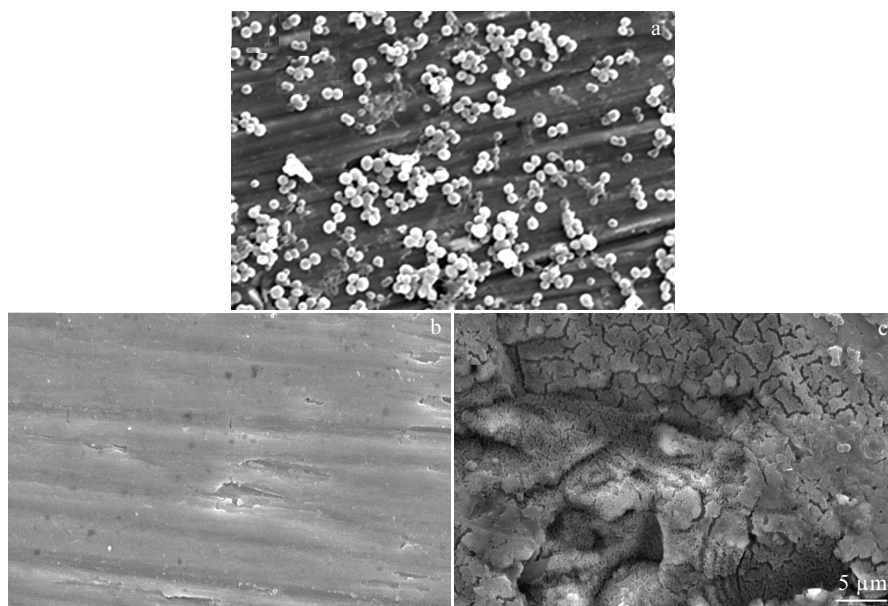


图7 cp-Ti及碱热处理前后Ti-3Cu合金的细菌粘附性

Fig.7 Bacteria adhesion on cp-Ti (a) and Ti-3Cu alloy before (b) and after (c) alkali heat treatment

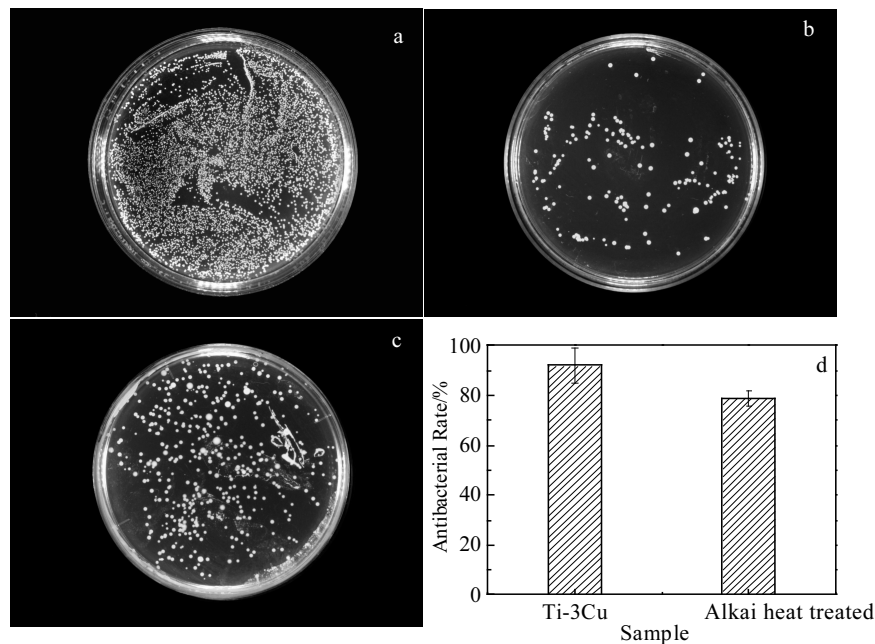


图 8 金色葡萄球菌在 Ti-3Cu 合金样品表面培养 24 h 细菌生长情况

Fig.8 Bacterial growth of staphylococcus aureus cultured on Ti-3Cu alloy sample surface for 24 h: (a) cp-Ti; (b) Ti-3Cu; (c) alkali heat treated Ti-3Cu; (d) antibacterial rate

Ti₂Cu 相, 由于抗菌钛合金的抗菌效果很大程度上取决于合金中 Ti₂Cu 相的存在与数量多少, 即合金表面富含的 Ti₂Cu 相是合金具有非常好抗菌效果的关键^[17, 18], 但碱热处理覆盖了 Ti₂Cu 相, 这导致合金的抗菌效果降低。另一方面, 碱热处理后合金表面形成的亚微米级微孔及亲水性的提高又有利于细菌的粘附。

与之同时, 发现 Ti-3Cu 合金的表面层中出现了一定量的 CuO 新相。有研究结果表明: CuO 具有非常强的抗菌性能^[19-21]。分析认为, 尽管合金的 Ti₂Cu 相被反应层覆盖, 但碱热处理后表面形成的 CuO 使合金仍然保持一定的抗菌性能。

从上面的实验结果可以看出, 有些表面改性方法在提高钛合金亲水性的同时将会降低合金的抗菌性能, 例如本研究的碱热处理。因此, 在以后的研究中选择适当的表面改性方法使合金兼具优异的抗菌性能及细胞相容性是非常重要的。

3 结 论

1) 碱热处理前抗菌钛合金 Ti-3Cu 表面由 α -Ti 和 Ti₂Cu 相组成, 碱热处理后 Ti-3Cu 的表面主要物相是 α -Ti 和少量的 Ti₂Cu 相, 同时有钛酸钠形成。

2) 表面形成钛酸钠凝胶层, 具有亚微米的微孔结构, 显著地提高了合金表面的亲水性, 但是没有改变合金的粗糙度。

3) 碱热处理降低了 Ti-3Cu 的抗菌效果, 抗菌率由 92%降低到 71%。

致 谢: 感谢熊霜和郑桂田同学在实验研究中的贡献, 感谢王晓燕老师在论文撰写过程中的贡献。

参考文献 References

- [1] Hu H, Zhang W, Qiao Y *et al.* *Acta Biomater* [J], 2012, 8(2): 904
- [2] Nam P H, Alejandra B, Frederic H *et al.* *Talanta*[J], 2008, 76(4): 936
- [3] L R Ren N, Chen L *et al.* *Journal of Materials Chemistry*[J], 2012, 22(36): 19151
- [4] Khan M S, Ali M A, Sultan B *et al.* *J Ayub Med Coll Abbottabad*[J], 2008, 20(1): 23
- [5] Arciola C R, Radin L, Alvergnia P *et al.* *Biomaterials*[J], 1993, 14(15): 1161
- [6] Liu X C P K, Ding C. *Materials Science & Engineering R*[J], 2004, 47(3): 49
- [7] Kubacka D, Yamamoto A, Wiciniński P *et al.* *Applied Surface Science*[J], 2019, 472: 54
- [8] Liu Xuanyong(刘宣勇). *Biomedical Titanium Materials and Surface Modification*(生物医用钛材料及其表面改性)[M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2017
- [9] Zhang E, Ren J, Li S *et al.* *Biomed Mater*[J], 2016, 11(6): 065 001

- [10] Yousefpour M A A, Chen J *et al. Materials & Design*[J], 2007, 28(7): 2154
- [11] Kim S Y, Kim Y K, Jang Y S *et al. Surface and Coatings Technology*[J], 2016, 303: 256
- [12] Zhang E, Li F, Wang H *et al. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* [J], 2013, 33(7): 4280
- [13] Shuai C, Sun H, Gao C *et al. Applied Surface Science*[J], 2018, 455: 1150
- [14] Zhang X, Nie J, Yang X *et al. Applied Materials Today*[J], 2018, 10: 164
- [15] Falco G D, Ciardiello R, Commodo M *et al. Surface and Coatings Technology*[J], 2018, 349: 830
- [16] Valverde A, Perez-Alvarez L, Ruiz-Rubio L *et al. Carbohydr Polym*[J], 2019, 207: 824
- [17] Liu J, Li F, Liu C *et al. Materials Science and Engineering C*[J], 2014, 35: 392
- [18] Zhang E, Wang X, Chen M *et al. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*[J], 2016, 69: 1210
- [19] Ghasemi N, Jamali-Sheini F, Zekavati R. *Materials Letters*[J], 2017, 196: 78
- [20] Tavakoli S, Nemati S, Kharaziha M *et al. Colloid and Interface Science Communications* [J], 2019, 28: 20
- [21] Mersian H, Alizadeh M, Hadi N. *Ceramics International*[J], 2018, 44(16): 20 399

Effect of Alkali Heat Treatment on Surface Characteristics and Antibacterial Properties of Ti-3Cu Alloy

Zhang Erlin, Liu Boqun

(Northeastern University, Shenyang 110819, China)

Abstract: The effects of alkali heat treatment on the microstructure, surface roughness, contact angle and antibacterial properties of Ti-3Cu alloy were studied to reveal the possibility of applying alkali heat treatment to biological surface modification of Ti-3Cu alloy. The results show that a layer of titanate gel is formed on the surface of titanium alloy after alkali heat treatment, and a large number of nano-sized pores of about 100 nm are distributed homogeneously on the surface of the gel layer, which reduce the roughness of Ti-3Cu alloy but improve the hydrophobicity of the alloy surface. The formation of the titanate gel layer on the alloy surface reduces the antibacterial property of the alloy from 92% before treatment to 71% after alkali heat treatment. The bacterial adhesion test also confirms that alkali heat treatment reduces the antibacterial property of the alloy. It is believed that the titanate gel layer partly blocks the contact between Ti₂Cu phase and bacteria in the alloy, so the antibacterial effect of the alloy decreases.

Key words: antibacterial titanium alloy; alkali heat treatment; microstructure; roughness; antibacterial property

Corresponding author: Zhang Erlin, Ph. D., Professor, School of Material Science & Engineering, Northeastern University, Shenyang 110819, P. R. China, Tel: 0086-24-83689400, E-mail: zhangel@atm.neu.edu.cn