

TiO₂ 纳米管表面蛋白质-羟基磷灰石复合涂层及其结合强度

于 榕, 冯 波, 汪建新, 鲁 雄, 屈树新, 翁 杰

(西南交通大学 材料先进技术教育部重点实验室, 材料科学与工程学院, 成都 610031)

摘 要: 采用阳极氧化法在钛表面制备不同管径的 TiO₂ 纳米管, 450℃ 热处理后经牛血清白蛋白(BSA)与钙磷的共沉积得到载有 BSA 的羟基磷灰石(HA)涂层. 经检测发现, 170nm 管径的 TiO₂ 表面比 100 和 50nm 管径的表面具备更好的矿化能力, HA 的形成能力随管径的增大而提高. 大管径表面得到的涂层结合强度高于小管径的, 可达 16.95MPa. 经过真空预矿化的试样, 涂层结合强度明显高于未经过预矿化的试样, 且 HA 涂层生长速率加快. BSA 与磷酸钙在真空预矿化后共沉积到氧化钛纳米管表面, 短时期内形成 BSA-HA 涂层, 是在钛基生物材料表面制备生物活性涂层的有效方法.

关 键 词: TiO₂ 纳米管; 牛血清白蛋白; 磷灰石涂层; 结合强度
中图分类号: TG146 **文献标识码:** A

Protein-hydroxyapatite Composite Coatings on TiO₂ Nanotube Layers and Bond Strength to Substrate

YU Rong, FENG Bo, WANG Jian-Xin, LU Xiong, QU Shu-Xin, WENG Jie

(Key Laboratory of Advanced Technologies of Materials, Ministry of Education, School of Materials Science and Engineering, Southwest Jiaotong University, Chengdu 610031, China)

Abstract: TiO₂ nanotubes on titanium with different diameters were prepared by anodic oxidation after heat-treated at 450℃. Hydroxyapatite (HA) coatings containing bovine serum albumin (BSA) were produced on the nanostructured surface through biomimetic co-deposition. The TiO₂ nanotube layers with 170nm diameter has a better mineralization ability compared that with diameter of 100nm and 50nm. And the HA formation ability is enhanced with increase of the diameters. The bonding strength of the coating to the nanotube layers with large diameter is higher than that with small diameter, and the maximal strength can reach 16.95MPa. Moreover, the pre-mineralization in vacuum significantly enhances the bonding strength, and increases growth rate of the coating. The BSA-HA coating with high bonding strength can fastly form on TiO₂ nanotube layers by pre-mineralization in vacuum and then biomimetic co-deposition, which would be a promised method for preparing titanium-based bioactive coatings.

Key words: TiO₂ nanotubes; bovine serum albumin; apatite coating; bonding strength

钛基羟基磷灰石(HA)涂层材料在硬组织置换技术中得到了广泛应用. 这种金属基生物活性涂层材料兼有 HA 生物材料与金属材料的生物性能与力学性能, 较其它硬组织替代材料拥有更大的优势. 目前, 商业领域中制备 HA 涂层的主要方法是等离子喷涂, 该技术是将粉末材料送入等离子焰中高温熔

融, 高速喷射在金属基体上快速凝固而形成涂层. 其缺点是涂层与底材结合强度低, 涂层本身机械性能不稳定, 并且等离子喷涂是直线过程, 很难在形状复杂的器件上获得均匀涂层, 不适于喷涂多孔金属表面^[1-3]. 涂层结合力不高主要是由于涂层和基体材料热膨胀系数差异较大, 使涂层具有较大的残余

收稿日期: 2010-10-26; 收到修改稿日期: 2010-12-22

基金项目: 国家自然科学基金(50871093), 教育部高等学校全国优秀博士学位论文作者专项资金(200554)

National Natural Science Foundation of China (50871093); Foundation for the Author of National Excellent Doctoral Dissertation of China (200554)

作者简介: 于 榕(1984-), 女, 硕士研究生. E-mail: 08091003@163.com

通讯作者: 冯 波, 教授. E-mail: fengbo@swjtu.edu.cn

应力,从而限制了涂层与基体界面结合强度的提高。

虽然 HA 具有优良的生物活性,但是合成 HA 与骨组织中天然 HA 仍然存在明显差异:人体骨骼中的 HA 是与胶原和蛋白质等有机成分相结合的;合成的 HA 表面层转化为天然骨组织需要较长的诱导期。Liu 等^[4]在钛合金(Ti6Al4V)表面通过仿生共沉积方法得到牛血清白蛋白(BSA)改性磷灰石涂层,发现 BSA 的加入可以使钙磷涂层的晶体结构更接近于天然骨组织,并且降低了钙离子的溶解速度。Yu 等^[5]也通过仿生共沉积得到载有 BSA 的仿生涂层,并且认为涂层携带骨诱导因子,因此具有骨传导和骨诱导的特性。

本工作使用 BSA 作为模型蛋白,通过共沉积的方法在不同管径的氧化钛纳米管表面制备出 BSA-HA 复合涂层。利用 TiO₂ 纳米管层减低钛表面硬度及弹性模量,降低应力集中,同时减少因热膨胀系数的差异造成的残余应力,有利于提高涂层和基材的结合强度^[6-7]。同时探讨了 HA 涂层在不同管径的 TiO₂ 纳米管表面的生长状况以及 BSA 对于晶体形成的影响,最后测试了各表面所得涂层与底材的结合强度。

1 材料与方法

1.1 预处理及阳极氧化

预处理步骤:1)纯钛片 TA2($\phi 10\text{mm} \times 1.5\text{mm}$)经 400#、1000#、1500# SiC 砂纸打磨至表面光亮且无明显划痕,然后依次在水和丙酮中超声波清洗 10min,取出烘干;2)在摩尔比为 6:1 的 HNO₃ 与 HF 的混合酸液中进行酸洗,然后于蒸馏水中超声波清洗 10min,吹干后保存。

根据文献[8],阳极氧化采用的电解液为 H₃PO₄ 和 HF 体系,施加电压分别为 10、20、25V,氧化时间 1h。阳极氧化后的试样在 450℃ 热处理,升温速率为 2℃/min,保温 6h,随炉冷却。将样品清洗并干燥。

经过 10、20、25V 阳极氧化 1h 后可得到管径分别约为 50、100、170nm 左右的 TiO₂ 纳米管表面,经过 450℃ 热处理后表面的 TiO₂ 由无定形态转变为锐钛矿晶型^[9-10]。所得试样分别记为 5T、10T 和 17T。

1.2 仿生共沉积 BSA-HA 涂层

纳米管样品在真空条件下置于过饱和和钙磷溶液(ACS)中,分别预矿化 1h(5TA-1, 10TA-1 和 17TA-1)和 3h(TA-3)。为了防止 BSA 在抽真空过程中发生变性在此过程中尚未加入 BSA。

真空预矿化 3h 后,立即浸泡在 BSA 浓度为

1mg/mL 的 ACS 溶液中,37℃ 下进行矿化,1h 取样记为 5TAB-1、10TAB-1、17TAB-1;5h 后取样记为 5TAB-5、10TAB-5、17TAB-5。

ACS 溶液用 NaCl、CaCl₂、K₂HPO₄·3H₂O 配置,用 1mol/L HCl 和 tris 调节 pH=7.4,离子浓度如表 1 所示。

1.3 结合强度的测试

用文献[11-12]中的测试方法进行拉力实验,所选的粘结剂为 DG-3S 胶粘剂(中蓝晨光化工研究院有限公司),经测试其结合强度 $\geq 39.24\text{MPa}$ (Ti-Ti)。每种试样采取 6 个平行样完成测试。

1.4 样品的表征

采用扫描电子显微镜(SEM, FEI Quanta 200)和场发射扫描电镜(FE-SEM, JEOL JSM-6700 OL)对试样进行表面及断面形貌观察,分析前对试样进行喷金处理。X 射线衍射仪(XRD, Philips χ' Pert PRO)对样品表面相成分进行鉴定,扫描范围 20°~50°,采用薄膜衍射法,掠射角 0.5°,步长(2 θ)0.025°。采用傅立叶变换红外光谱(FTIR, Thermo NICOLET5700)检测涂层中的特定基团。用台阶仪(Tencor Alpha-Step IQ)测量膜层厚度。万能力学测试仪(INSTRON)测试涂层与底材的结合强度。

2 结果与分析

2.1 涂层的形成

图 1 为真空预矿化过程中不同管径 TiO₂ 纳米管表面磷酸钙晶体的生长状况,可以观测到预矿化 1h 后,试样 5TA-1 和 10TA-1 面没有晶体形成,17TA-1 表面则出现了蠕虫状颗粒,这与文献[11]中矿化初期 HA 形貌相似。经预矿化 3h 后,试样 10TA-3 和 17TA-3 表面出现许多球状颗粒,高倍下可看到该颗粒是由无数细小薄片状的晶体团聚而成;而试样 5TA-3 表面仅零星分布着不规则形状的晶体颗粒。由此可以初步推断 TiO₂ 纳米管管径大小的不同,会影响钙磷盐在试样表面的沉积。

共沉积 1h 和 5h 后涂层的表面形貌如图 2。共沉积 1h 时各试样表面沉积的颗粒明显增多,其中 10TAB-1 和 17TAB-1 试样表面已被涂层全部覆盖,5TAB-1 表面颗粒由预矿化 3h 时零星分布的状态转

表 1 矿化液(ACS)配方
Table 1 Ingredient of accelerate calcium supersaturated solution (ACS)

	Na ⁺	Ca ²⁺	K ⁺	Cl ⁻	HPO ₄ ²⁻
Concentration/ (mmol·L ⁻¹)	140.4	3.1	3.72	142.9	1.86

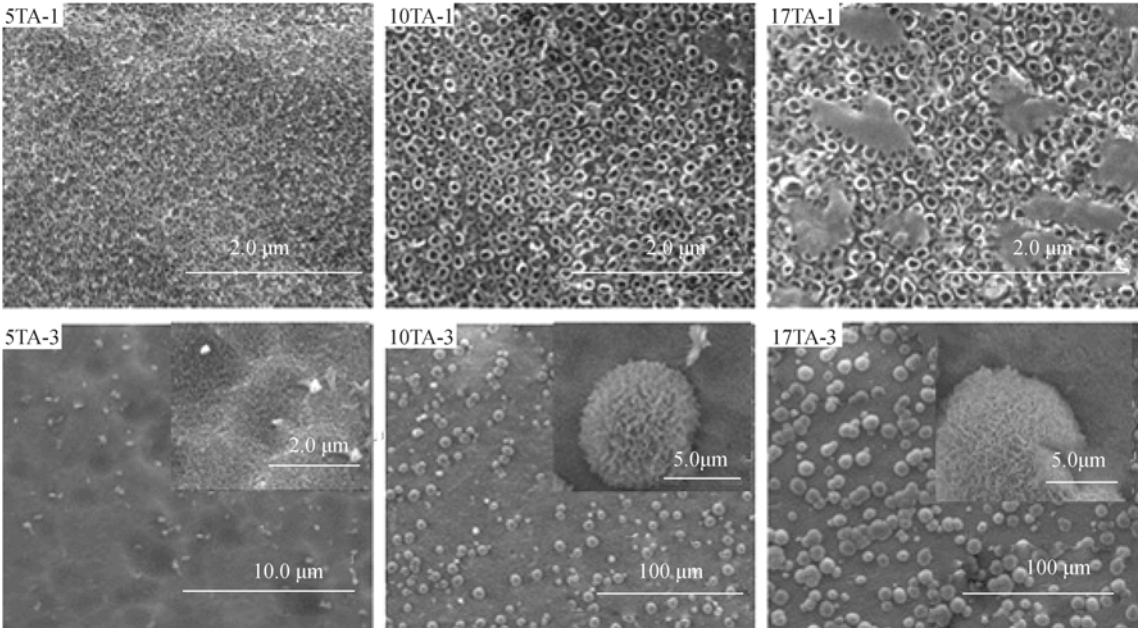


图 1 预矿化不同时间各试样的表面形貌

Fig. 1 SEM morphologies of TiO₂ nanotube layers after pre-mineralization for 1h and 3h

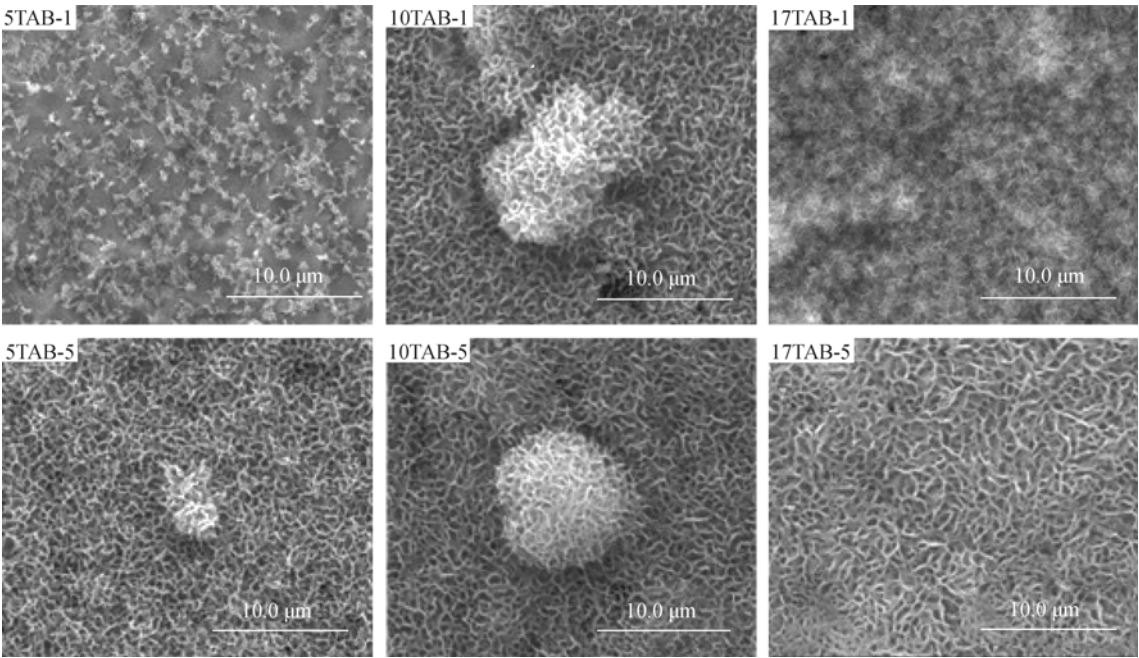


图 2 共沉积不同时间各试样的表面形貌

Fig. 2 SEM morphologies of TiO₂ nanotube layers after co-deposition for 1h and 5h

变得更加密集. 此时可观察到 HA 颗粒的形貌发生了变化, 由原来的球状, 变为不规则的星状颗粒. 共沉积 5h 后, 三种试样表面都被 HA 覆盖, HA 呈细小薄片状, 基本垂直于底材, 相互交叉构成网状. 图 3 为管径为 100nm 的试样切面形貌, (a)没有经过矿化处理, 纳米管管状形貌较清晰分明; (b)是预矿化 3h+共沉积 5h 后得到的样品, 纳米管壁变厚, 管口处被生成的 HA 覆盖.

之所以在共沉积前进行真空预矿化, 有两方面原因: 一是在抽真空的过程中将材料表面氧化钛纳米管中的气体排出. 管内空气会使溶液不能充分进入管内, 导致 HA 只能在纳米管上段沉积. 当空气被抽离后钙磷溶液能充分地进入管内, 为 HA 晶体沿纳米管管壁原位生长提供了可能性; 其二, 抽真空过程中, 压力减小会使溶液中所含气体的溶解度降低, 析出气泡, 并且溶液中少量水份变为水蒸气逸出,

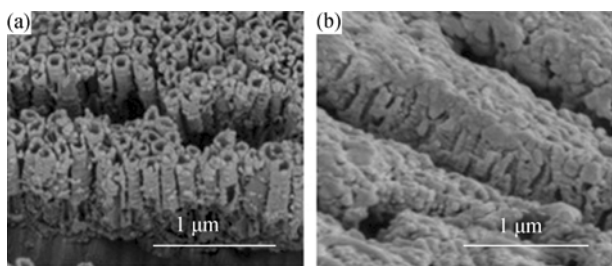


图 3 (a)未经矿化的试样切面(b)预矿化 3h+共沉积 5h 后的管径 100nm 试样切面

Fig. 3 Cross-sectional SEM images of the nanotube layers with diameter of 100nm (a) without pre-mineralization (b) with HA coating through pre-mineralization for 3h and then co-deposition for 5h

温度降低, 离子浓度增大. 此过程溶液中气泡冒出呈沸腾状, 也加速了溶液中离子的运动, 更利于钙磷的沉积.

材料表面的生物性能与其形貌、成分以及表面能量等因素密切相关. 有研究表明, 钛表面形成二氧化钛纳米管会加速 HA 的形成^[13]. 钛表面管径不同的 TiO_2 纳米管具有不同的比表面积, 管径越大, 其表面能越大^[7]. 结合预矿化过程实验结果, 管径为 100 和 170nm 的试样表面形成的 HA 颗粒比管径 50nm 试样表面多, 佐证了大管径的 TiO_2 纳米管具有大的比表面, 从而有更高的表面能, 对溶液中钙磷离子的吸附能力更强, 利于涂层的形成.

对于 BSA 和溶液中钙磷离子的相互作用, 静电力是主要的驱动力^[14]. BSA 的等电点为 4.7~4.8, 在 pH=7.4 的溶液中呈现负电性. 在本实验中, 纳米管试样经预矿化处理得到一层很薄的 HA 涂层. 在共沉积过程, 起初材料表面的 HA 会溶解出少量的 Ca^{2+} 、 PO_4^{3-} 进入溶液中^[5,15], 在静电作用下, BSA 与 Ca^{2+} 结合, 加之其浓度较高, 从而共同吸附到涂层表面, 同时溶液中的钙磷离子也向材料表面沉积, 导致 BSA-HA 复合涂层的形成.

2.1.1 XRD 检测结果

图 4(a)和(b)分别是三种试样在预矿化 3h 和预矿化 3h+共沉积 5h 后的 XRD 图谱. 预矿化 3h 后, 均检测到 HA 特征峰, 其中 17TA-3 试样上最为明显, 这与扫描电镜结果一致. 预矿化 3h+共沉积 5h 的 XRD 图谱中, 三种试样均检测到强烈的 HA 特征峰: $25.9^\circ(002)$ 和 $31.7^\circ(211)$, 锐钛矿的峰消失, 钛峰微弱, 并且可以看出 17TA-3 的 HA 峰略高于 5TA-3 的, 其钛的特征峰却相对要弱, 也间接证明了大管径试样表面的 HA 涂层要厚于小管径的.

图 4(c)是矿化 24h 后, 试样表面纯 HA 涂层和 BSA-HA 涂层的 XRD 图谱, 从图中可看出, 加入

BSA 后, HA(002)晶面的衍射峰强度明显增强, (211)、(112)、(300)晶面所对应的三连峰的强度没有明显的变化, 说明晶体沿(002)晶面平行于基材表面择优生长. 由于晶粒尺寸越大, 结晶度越大, 衍射峰宽越小, 因此 BSA 的加入不仅引起 HA 形貌的变化, 也改变了 HA 的晶体结构^[15-16]. 图中(002)的衍射峰清晰尖锐且独立于其它峰, 因此选此处(002)晶面进行晶粒尺寸和结晶度的计算. 经谢乐公式计算得: HA 和 BSA-HA 在(002)晶面的平均晶粒大小分别为 17.7 和 41.4nm; 两种试样的结晶度分别为 40.2%和 67.1%. 因此, BSA 的加入使得 HA 晶体沿

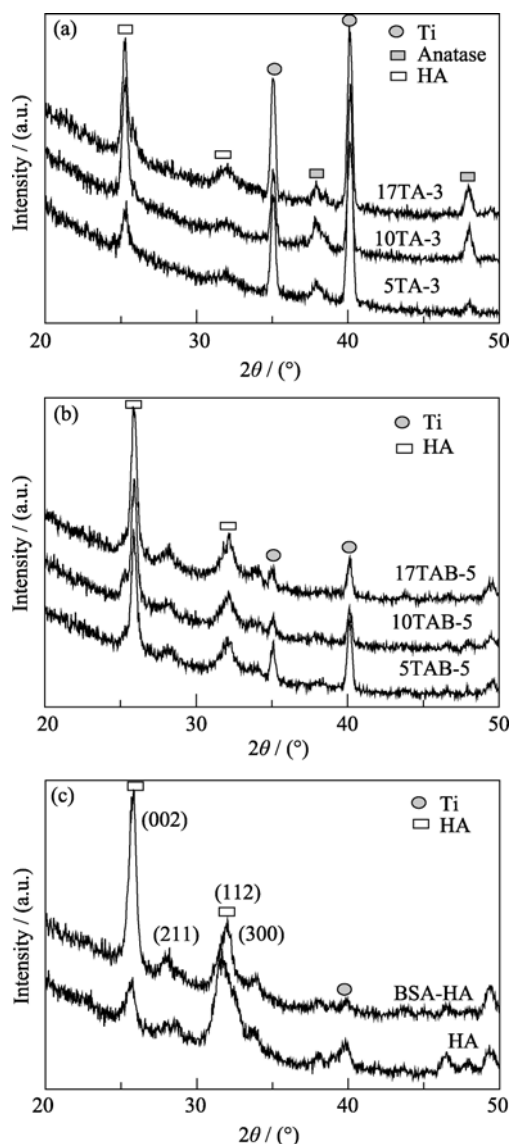


图 4 (a)预矿化 3h 后不同管径纳米管; (b)预矿化 3h+共沉积 5h 后不同管径纳米管; (c)矿化 24h 后 HA 涂层与 BSA-HA 涂层的 XRD 图谱

Fig. 4 XRD patterns of (a) TiO_2 nanotube layers with different diameters after pre-mineralization for 3h; (b) TiO_2 nanotube layers with different diameters after pre-mineralization for 3h and co-deposition for 5h; (c) HA coating and BSA-HA coating after mineralization for 24h

c 轴择优生长, 且晶粒尺寸和结晶度都显著提高.

2.1.2 FTIR 检测结果

图 5 为管径 100nm 的试样经预矿化 1、3h, 以及预矿化 3h 后又共沉积 5h 后的漫反射图谱. 经预矿化 3h 后检测到 P-O 键的特征峰(1027cm⁻¹). 与 BSA 共沉积 5h 后, 在 3449cm⁻¹ 处出现了 O-H 和 N-H, 其中 O-H 来自于 HA 涂层和 BSA, N-H 来自于 BSA. 在 1650 和 1545 cm⁻¹ 处出现 BSA 的特征吸收峰: 酰胺 I 带和酰胺 II 带. 同时还有代表 HA 的 PO₄³⁻、-OH、CO₃²⁻特征峰. 其中 C-O 键可能来自于空气中的 CO₂, 微溶于水后产生 CO₃²⁻, 在涂层中形成碳酸化羟基磷灰石; 还有可能源于 BSA 中的 COO⁻.

2.2 结合强度的测试

2.2.1 结合力测试

三种试样经过共沉积 24h 后, 测得各涂层厚度均为 3μm 左右, 数值相差不大, 因此对结合力测试的影响可忽略不计. 此外, 尽管采用胶粘方法测试薄涂层的拉伸强度时, 胶的渗入可能会影响测试数据的精确性, 但其结果仍然具有一定参考价值.

未经预矿化即进行 BSA 与钙磷共沉积的试样作为对照样. 所得涂层与底材的结合力很低, 略用力就可擦除. 其余试样所得结合力数据如表 2.

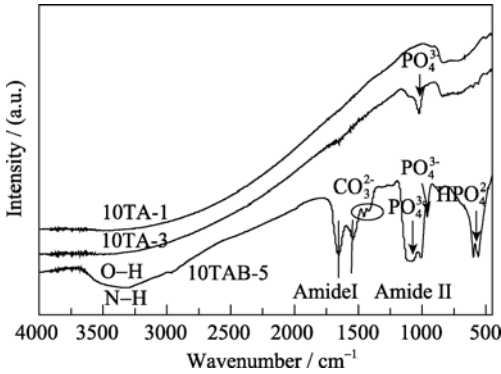


图 5 管径 100nm 试样矿化不同时间的红外图谱
Fig. 5 FTIR spectra of the nanotube layers with 100nm diameter after pre-mineralization and co-deposition

表 2 各试样测得的结合力大小 / N
Table 2 The coatings' bond forces to substrate of different samples / N

5TAB	10TAB	17TAB
400	780	840
465	390	1428
548	1072	1200
210	1785	1868
776	2264	1745
585	1346	900
497.3±190.3	1272.8±680.1	1330.2±427.4

由图 6 可知, 5TAB 试样涂层的结合强度均值为 6.34MPa; 10TAB 的结合强度均值为 16.21MPa; 17TAB 的结合强度均值为 16.95MPa. 随 TiO₂ 管径的增大, 涂层与基底的结合强度有所增强, 管径为 100 和 170nm 试样的结合强度明显高于管径 50nm 试样, 但后两者无显著性差异. 这可能是由于大管径的 TiO₂ 纳米管更易使 HA 涂层在管内充分沉积, 增大了涂层与纳米管层的机械嵌合作用, 因此提高了涂层与底材的结合强度. 另外, TiO₂ 纳米管层的存在可以减低钛表面硬度及弹性模量. 由本课题组前期实验发现, 随纳米管径增大, 纳米硬度逐渐减小^[17]. 大管径的纳米管表面与涂层间产生的应力集中和残余应力相对较小, 有助于增加结合强度.

2.2.2 断面形貌

从断面形貌照片(图 7)上可以看出, 三种试样表面都有大量残余的涂层, 5TAB 试样在高倍下仍可观察到部分纳米管的形貌, 说明该试样表面 HA 涂层与 TiO₂ 纳米管结合不够牢固, 部分涂层与底材在界面处发生断裂; 10TAB 和 17TAB 大部分 HA 涂层未剥落, 断裂多发生在涂层内部, 仅很少部分发生在氧化钛纳米管与基底之间, 高倍下可观察到该处纳米管剥离后的坑洞状基底. 这也证明了大管径纳米管表面形成的涂层与底材结合更加牢固, 不易在材料表面发生脱落. 而且表明对于这些试样, 其涂层与底材之间的结合强度应当大于前述所测得值.

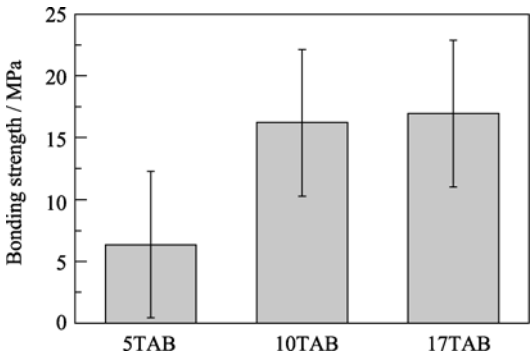


图 6 三种试样涂层的结合强度
Fig. 6 Bonding strength of the coatings to the nanotube layers with different diameters

3 结论

- 1)阳极氧化法制备的不同管径 TiO₂ 纳米管具有不同的矿化能力. 170nm 管径较 50nm 管径更容易促进 HA 晶体的成核生长. 在一定范围内, 管径越大, 越利于涂层的形成;
- 2)添加 BSA 使得 HA 晶体沿(002)面择优生长, 增大了 HA 的晶粒尺寸, 提高了结晶度;

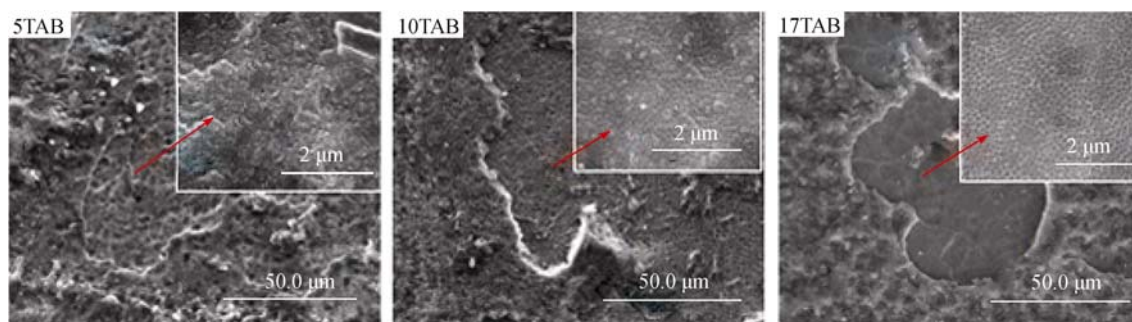


图 7 经拉力试验剥离涂层后试样的表面形貌

Fig. 7 SEM morphologies of different samples after the coating peeled by tension test

3)预矿化处理能缩短矿化时间, 提高 HA 涂层与基底的结合强度. TiO_2 纳米管管径的大小会影响所得涂层与基底的结合强度, 50nm 管径试样的结合强度明显低于 100 和 170nm 管径的试样, 其中 100 和 170nm 管径的纳米管所得涂层, 其结合强度平均可达 16MPa 以上.

参考文献:

- [1] Bai X, Sandukas S. Deposition and investigation of functionally graded calcium phosphate coatings on titanium. *Acta Biomaterialia*, 2009, **5(9)**: 3563–3572.
- [2] Ozeki K, Fukui Y, Aoki H. Influence of the calcium phosphate content of the target on the phase composition and deposition rate of sputtered films. *Applied Surface Science*, 2007, **253(11)**: 5040–5044.
- [3] Knabe C, Berger G. The modulation of osteogenesis *in vitro* by calcium titanium phosphate coatings. *Biomaterials*, 2004, **25(20)**: 4911–4919.
- [4] Liu Y, Hunziker E B, Randall N X, *et al.* Proteins incorporated into biomimetically prepared calcium phosphate coatings modulate their mechanical strength and dissolution rate. *Biomaterials*, 2003, **24(1)**: 65–70.
- [5] Yu X H, Qu H B, Knecht D A, *et al.* Incorporation of bovine serum albumin into biomimetic coatings on titanium with high loading efficacy and its release behavior. *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, 2009, **20(1)**: 287–294.
- [6] 王月勤, 陶杰, 何聘婷. 二氧化钛纳米管上电沉积羟基磷灰石. 材料科学与工程学报, 2007, **25(2)**: 249–252.
- [7] 刘达理. 钛表面二氧化钛纳米管及其 Ti- TiO_2 -HA 复合涂层. 成都: 西南交通大学硕士论文, 2009.
- [8] 刘达理, 冯波, 鲁雄 (LIU DA-Li, *et al.*). 两段式阳极氧化法制备大管径 TiO_2 纳米管. 稀有金属材料与工程 (Rare Metal Mat. Eng.), 2010, **39(2)**: 325–328.
- [9] 崔强, 冯波, 陈伟, 等 (CUI Qiang, *et al.*). 形貌对锐钛矿型 TiO_2 纳米管薄膜光催化性能的影响. 无机材料学报 (Journal of Inorganic Materials), 2010, **25(9)**: 616–620.
- [10] Gao L, Feng B. Micro/nano structural porous surface on titanium and bioactivity. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 2009, **89B(2)**: 335–341.
- [11] Feng B, Chu X J, Chen J M, *et al.* Hydroxyapatite coating on titanium surface with titania nanotube layer and its bond strength to substrate. *Journal of Porous Materials*, 2010, **17(4)**: 453–458.
- [12] Standard Test Method for Tension Testing of Calcium Phosphate and Metallic Coatings. American Society for Testing and Materials. Designation: F 1147–99.
- [13] Oh S H, Finõnes R R, Daraio C, *et al.* Growth of nano-scale hydroxyapatite using chemically treated titanium oxide nanotubes. *Biomaterials*, 2005, **26(24)**: 4938–4943.
- [14] Zeng H, Chittur K K, Lacefield W R. Analysis of bovine serum albumin adsorption on calcium phosphate and titanium surfaces. *Biomaterials*, 1999, **20(4)**: 377–384.
- [15] Feng B, Chen J Y. Interaction of calcium and phosphate in apatite coating on titanium with serum albumin. *Biomaterials*, 2002, **23(12)**: 2499–2507.
- [16] Svetina M, Colombi C L, Sbaizero O, *et al.* Deposition of calcium ions on rutile (110): a first principles investigation. *Acta Mater.*, 2001, **49**: 2169–2177.
- [17] 罗荣, 冯波, 屈树新, 等. 不同管径氧化钛纳米管层的微动磨损性能. 摩擦学学报, 2010, **30(5)**: 491–497.