

基础研究

纳米TiO_{2-x}N_x薄膜的制备及抗菌性能分析李娜¹,曹宝成^{1,2},王育华²,刘斌²兰州大学¹口腔医学院,²物理科学与技术学院,甘肃 兰州 730000

摘要:目的 利用TiO₂的抗菌特性,开发一种能够应用于口腔的无机抗菌材料。方法 采用射频磁控溅射法在医用不锈钢表面制备TiO_{2-x}N_x薄膜,用XRD、SEM、EDS等测试手段表征薄膜的结构、形貌、组成,并通过覆膜法利用口腔常见致病菌考察TiO_{2-x}N_x薄膜的抗菌性能。结果 纳米TiO_{2-x}N_x抗菌薄膜为锐钛矿相结构,氮元素质量比为0.13%,表面结构均匀致密,对变形链球菌、粘性放线菌及白色念珠菌的抗菌率分别为97.79%、49.42%和96.84%。结论 纳米TiO_{2-x}N_x抗菌薄膜对口腔常见致病菌具有较强的抗菌效果,可作为一种新型抗菌剂应用于口腔临床。

关键词:纳米掺氮二氧化钛;薄膜;抗菌

中图分类号:R783.1 文献标志码:A 文章编号:1673-4254(2012)07-0952-04

doi: 10.3969/j.issn.1673-4254.2012.07.010 http://www.cnki.net/kcms/detail/44.1627.R.20120620.1446.010.html

Preparation and antibacterial properties of nano-TiO_{2-x}N_x filmLI Na¹, CAO Baocheng^{1,2}, WANG Yuhua², LIU Bin²¹College of Stomatology, ²School of Physical Science and Technology, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China

Abstract: Objective To prepare a nano-TiO₂ film and characterize its antibacterial properties for dental application. **Methods** The TiO_{2-x}N_x antibacterial film was prepared by radio frequency (RF) magnetron sputtering. The crystal structure and surface morphology of the film were characterized by X-ray diffraction, scanning electron microscopy, and EDS, and the antibacterial properties of the film against common dental pathogenic bacteria were evaluated. **Results** The TiO_{2-x}N_x antibacterial film presented with an anatase phase with a mass ratio of nitrogen of 0.13% and compact and smooth surface. Antibacterial assay of the film showed a resistance rate of 97.79% against *Streptococcus mutans*, 49.42% against *Actinomyces viscosus*, and 96.84% against *Candida albicans*. **Conclusion** The nano-TiO_{2-x}N_x film shows strong antibacterial effects against common dental pathogenic bacteria and can be used as a novel antibacterial dental material.

Key words: nano-TiO_{2-x}N_x films; antibacterial properties; dental materials

口腔就诊患者中需要义齿修复和正畸矫治的患者占很大比例。由于口腔修复体和固定矫治器在口腔内停留时间长,口腔卫生不易清洁,口腔菌群发生变化,条件致病菌滋生,常导致白色念珠菌性口炎、龈炎、龋病等口腔疾病的发生^[1]。TiO₂作为一种光催化抗菌剂,具有良好的耐生理腐蚀性、自清洁性和抗菌效果以及生物安全性,从而得到广泛关注。TiO₂的抗菌性来自于其光催化活性,在一定波长紫外光照射下,TiO₂的价带电子受光激发跃迁到导带形成载流子(e⁻-h⁺),在电场作用下,载流子由催化剂的体相向表面扩散,扩散到表面的光生电子可以被TiO₂表面的吸附氧所俘获,生成具有一定氧

化能力的超氧负离子(O₂⁻),可以直接氧化表面的有机物,也可以把吸附水氧化为羟基自由基(-OH),然后通过羟基自由基再去氧化水中的有机污染物。通过这种不停地氧化还原作用,TiO₂光催化技术可以使绝大多数有机物氧化降解,直至为无机小分子CO₂和H₂O^[2]。微生物是由有机复合物构成的,因此可应用TiO₂光催化作用杀灭^[3]。Shah等^[4]对表面进行了TiO₂修饰的口腔用金属托槽的抗菌性能进行了研究,表明其在紫外光照条件下对嗜酸乳酸杆菌具有抗菌作用。但是,TiO₂吸收波段局限于波长小于387 nm的紫外光区,只能利用在太阳光中占4%的紫外光,而通过掺杂改性可以使其扩展到可见光区。研究发现氮掺杂是目前最为理想的方法^[5]。2001年Asahi^[6]报道掺氮TiO₂在不降低紫外光催化活性的基础上具有优异的可见光活性。本实验在医用不锈钢表面制备了一种掺氮纳米TiO₂薄膜材料,这种纳米材料可以在医用高分子材料(如齿科金属器械、金属修复体和托槽)表面进行涂层改性,通过掺氮纳米TiO₂的可见光催化杀菌作用来达到自清洁和杀菌的效果,为减少口腔细菌感染提供新思路。

收稿日期:2012-03-14

基金项目:国家杰出青年基金(50925206);甘肃省国际科技合作基金(090WCGA903);教育部春晖计划(Z2008-1-62007);中央高校基本科研业务费专项资金(lzujbky-2010-83)

Supported by National Foundation for Outstanding Young Scientists (50925206).

作者简介:李娜,在读硕士研究生,E-mail: yxln06@yahoo.com.cn

通讯作者:曹宝成,副教授,E-mail: caobch@lzu.edu.cn

1 材料和方法

1.1 实验材料和仪器

医用不锈钢基片(1 cm×1 cm),氧化钛陶瓷靶(成都超纯公司),JZCK-580高真空多功能磁控溅射设备(辽宁聚智科技发展有限公司),X射线衍射仪(Rigaku D/MAX-2400型,日本),场发射扫描电镜(Hitachi S-4800,日本),Noran能谱仪(EDS)(美国热电公司,分辨率12 keV)。

1.2 实验菌株

变形链球菌 ATCC25175,粘性放线菌 ATCC15987,白色念珠菌 ATCC10231。

1.3 抗菌薄膜的制备

利用JZCK-580高真空多功能磁控溅射设备在医用不锈钢基片上沉积TiO_{2-x}N_x薄膜。沉积前不锈钢基片用40 g/L NaOH、25 g/L NaCO₃、50 g/L Na₃PO₄·12H₂O和7.5 g/L Na₂SO₃配制而成的90℃混合液恒温超声清洗25 min,表面无水珠后,取出并放入盛有丙酮溶液的烧杯,超声清洗20 min,清洗干净的基片浸泡在装有丙酮的烧杯内备用。

溅射前Ar气预溅射10 min以去除靶表面污染物。实验中本底真空为1.0×10⁻³ Pa,工作气压为1.0 Pa,氩气和氮气质量流量比为30:1,射频溅射功率为300 W。将溅射获得的TiO_{2-x}N_x薄膜基片置于高温箱式电阻炉内在氮气气氛(保护气体)中进行退火处理,退火温度控制在450℃,得到抗菌TiO_{2-x}N_x薄膜。

1.4 薄膜的表征

使用日本理学Rigaku D/MAX-2400型X射线衍射仪(X-ray diffraction, XRD)对TiO_{2-x}N_x抗菌薄膜进行结构分析;用日立公司Hitachi S-4800场发射扫描电镜(scanning electron microscopy, SEM)对TiO_{2-x}N_x抗菌薄膜表面形貌进行观测;用扫描电镜自带的能谱分析仪(energy dispersive spectrometer, EDS)分析元素组成。

1.5 薄膜抗菌性能

分别用移液枪吸取0.3~0.4 ml液体培养基,滴入装有变形链球菌、粘性放线菌和白色念珠菌冻干粉安瓿瓶。将全部的菌悬液移入试管,用液体培养基稀释至5 ml,于37℃培养48 h。将复苏的菌株接种在培养基平板上,分别于37℃(变形链球菌、粘性放线菌)和28℃(白色念珠菌)恒温培养箱内培养24 h,取单菌落染色形态学鉴定为培养物。分别取变形链球菌、粘性放线菌和白色念珠菌配制成1.5×10⁶/ml菌悬液。平皿内倒入50%甘油溶液,放入三角形毛细管做支架,依次放置载玻片、TiO_{2-x}N_x抗菌薄膜基片,取10 μl菌悬液滴于基片表面(1 cm×1 cm),并用盖玻片覆盖使菌液均匀分布无气泡,在可见光照射37、28℃下有氧培养6 h。然后用5 ml PBS将试件上的细菌在漩涡振荡仪上振荡5 min,

洗脱。取10 μl移入固体培养基,摇匀后倒入平皿,在37、28℃下有氧培养15 h后计数。抗菌性能利用存活菌落形成单位计数(CFU)描述,每个菌种做5个平行组,抗菌率按以下公式计算:抗菌率(%)=空白组-阳性组/空白组CFU×100%。

2 结果

2.1 薄膜的表征

从图1可以看到,样品TiO_{2-x}N_x薄膜结晶度好,为锐钛矿型结构,在2θ=25.080°和2θ=37.820°处有明显衍射峰,对应着锐钛矿型的(101)和(004)面,并表现出择优取向。根据Scherrer公式:

$$d = 0.89\lambda / \beta \cos \theta \quad (1)$$

其中X射线的波长λ是0.15406 nm,β为扣除仪器宽化后的X衍射的半高宽(弧度),θ为X射线衍射峰对应的衍射角(°),得到TiO_{2-x}N_x薄膜的平均粒径为28 nm,说明TiO_{2-x}N_x薄膜是纳米量级。

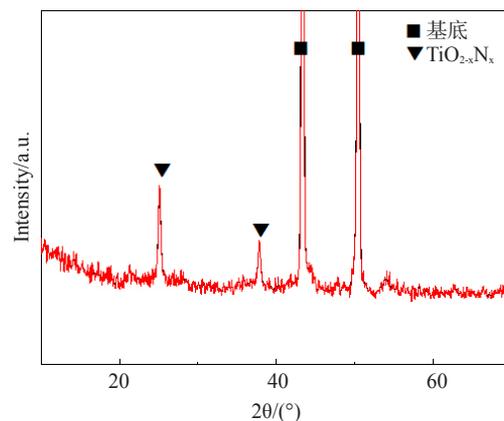


图1 掺氮TiO_{2-x}N_x抗菌薄膜的X射线衍射分析

Fig.1 XRD patterns of nano-TiO_{2-x}N_x antibacterial film on stainless steel.

从图2可以看出薄膜表面均匀致密,薄膜基本晶化,出现了团聚。同视场条件下的EDS能谱分析结果显示,杂峰是由于入射光穿透表面薄膜后不锈钢基片的化学成分,经元素分析,薄膜只有氮元素、氧元素和钛元素组成,其中氮元素质量比为0.13%(图3)。

2.2 抗菌性能

菌落计数结果显示,TiO_{2-x}N_x抗菌薄膜均表现出一定的抗菌性。对口腔主要致病菌变形链球菌、粘性放线菌及白色念珠菌的抗菌率分别为97.79%、49.42%和96.84%,对不同菌种的抗菌性能差异较大(表1)。

3 讨论

目前,有大量学者对口腔医用材料进行添加改性,

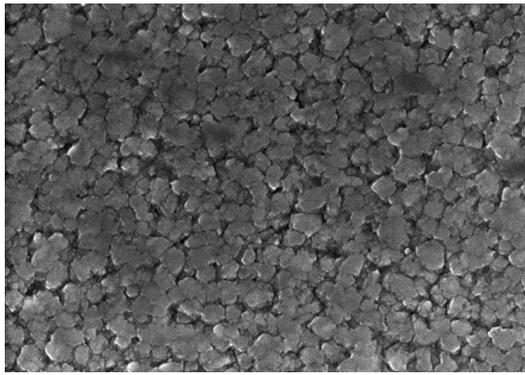


图2 掺氮 TiO_{2-x}N_x抗菌薄膜的扫描电镜图像
Fig.2 Scanning electron microscopy of nano-TiO_{2-x}N_x film on stainless steel (Original magnification: ×50 000).

以便在治疗口腔疾患的同时尽量减少口腔细菌的感染。口腔抗菌剂目前研究最多的是银系无机抗菌粉剂。Ohashi等^[7]将载银抗菌粉体应用在义齿基托树脂中,表明其对变形链球菌和粘性放线菌具有良好抗菌效果。银系抗菌剂虽能使细胞失去活性,但细菌杀死后会释放出致热和有毒的组分如内毒素^[2]。TiO₂光催化剂不仅杀死细菌,而且能同时分解由细菌释放出的有毒复合物,即TiO₂光催化剂不仅能削弱细菌的生命力,且能穿透细胞膜,破坏细菌的细胞膜结构,从而彻底地杀灭细菌。实验证明TiO₂经紫外光照射30 min后,对大肠杆菌的抗菌率接近80%,释放出的内毒素也同时得到有效降解^[2]。

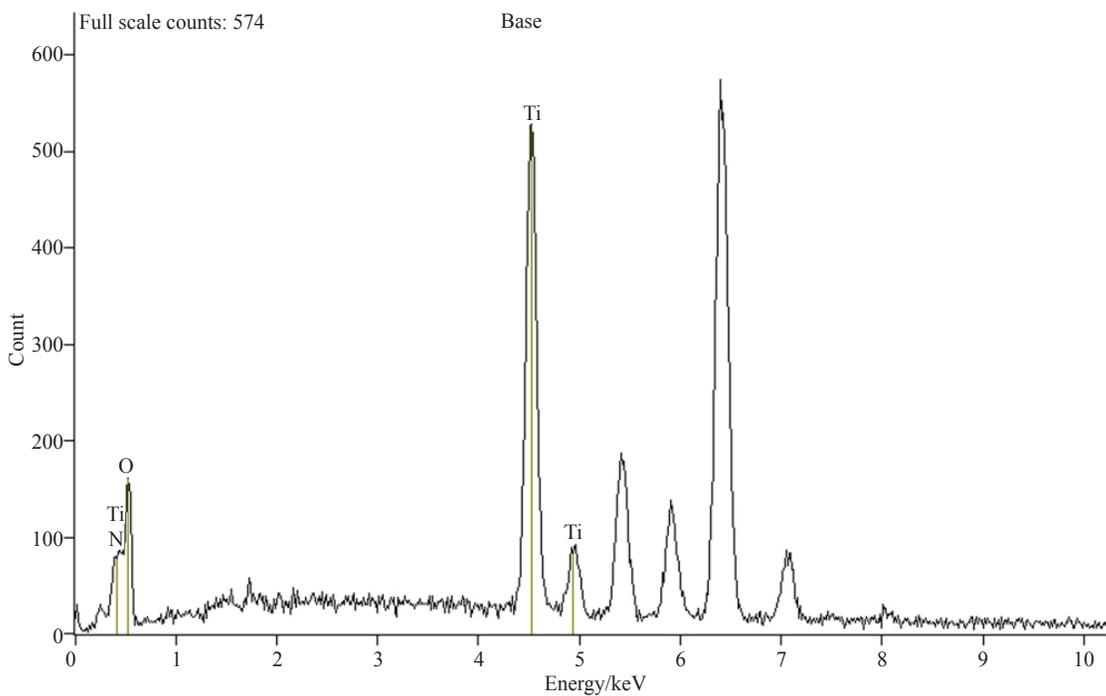


图3 掺氮 TiO_{2-x}N_x抗菌薄膜X射线能谱定量分析
Fig.3 EDS analysis of nano-TiO_{2-x}N_x film on stainless steel.

表1 空白组和阳性组(TiO_{2-x}N_x薄膜组)的菌落计数和抗菌率
Tab.1 Colony forming units of different bacteria on coated and uncoated stainless steel and the bactericidal rate

细菌	菌落计数(10 ⁸ /ml)		抗菌率
	空白	阳性(TiO _{2-x} N _x 薄膜)	
白色念珠菌	13.92±0.66	0.44±0.02	96.84%
变形链球菌	62.14±4.27	1.38±0.22	97.79%
粘性放线菌	11.17±1.85	5.67±0.51	49.42%

TiO₂抗菌剂的研究集中在粉体,而粉体分散性差,添加量很难控制,其不仅会影响材料的抗菌性而且将直接影响到复合材料的各种力学性能。余文珺等^[8]研究

发现义齿基托树脂抗菌性能随载银 TiO₂粉剂比例的上升而明显提高,但基托树脂冲击强度和弯曲强度明显下降。鉴于抗菌粉剂的缺点,有学者提议用抗菌薄膜作为口腔抗菌剂。白石等^[9]研究结果显示,Ag-nHA-nTiO₂对牙龈卟啉单胞菌、变异链球菌和具核梭杆菌的抗菌率分别为91.84%、90.49%和90.64%。

本研究采用射频磁控溅射法形成薄膜。此方法不易引起基底的变形、开裂以及镀层性能的下降,制得的薄膜均匀。另外磁控溅射法可低温进行,同时也可在形状复杂的基材上制备薄膜^[10]。这些特点都能满足口腔修复体表面薄膜的制备,因此射频磁控溅射是一种非常

有效的制备TiO_{2-x}N_x薄膜的方法。

作为一种光催化材料,其抗菌性能取决于光催化活性。影响TiO₂薄膜催化活性的因素很多,如晶型、结晶度、比表面积、吸附情况以及离子掺杂改性等。TiO₂主要有板钛矿、锐钛矿和晶红石3种结构形态。锐钛矿的光催化活性是金红石相的200~3000倍。大量实验证明,在常温下锐钛矿TiO₂可以无选择性降解大量有机物^[11]。粒径大小也直接影响光催化活性。粒径越小,TiO₂光催化剂的比表面积越大,其光催化效率也越高,尤其在粒径达到纳米量级时催化活性更强^[12]。此外,TiO₂经过掺杂改性,可以使其具有可见光催化活性。本研究制备的纳米TiO_{2-x}N_x薄膜,具有理想的锐钛矿相结构,粒径28 nm,SEM显示薄膜结晶度良好,且均匀致密,同时EDS分析薄膜表面由氮元素、氧元素和钛元素组成,其中氮元素质量比为0.13%,从而为TiO_{2-x}N_x薄膜具备优良的光催化及抗菌性提供依据。

菌落计数结果显示,纳米TiO_{2-x}N_x抗菌薄膜对3种口腔常见致病菌均表现出良好的抗菌作用,特别是对变形链球菌和白色念珠菌表现出了更强的抗菌性。变形链球菌为主要的致龋菌,粘性放线菌与一般牙龈炎相关,白色念珠菌在一定条件下可引起口腔粘膜感染^[13-14]。可能的灭菌机制为,可见光(390~770 nm)的激发下,纳米锐钛矿相TiO_{2-x}N_x降解基片表面的水、氧生成自由基($\cdot\text{OH}$)等,他们通过氧化还原反应杀死细菌和细菌释放的有毒物质,从而彻底杀灭细菌。作为一种光触媒抗菌薄膜,理论上它的量是不会发生变化的,可以反复进行抗菌并能起到持久的抑菌作用。

综上所述,纳米TiO_{2-x}N_x抗菌薄膜结构致密,具有在可见光下抗口腔常见致病菌的性能,为开发口腔抗菌剂提供了理论依据。

参考文献:

- [1] van Gastel J, Quirynen M, Teughels W, et al. Longitudinal changes in microbiology and clinical periodontal parameters after removal of fixed orthodontic appliances[J]. *Eur J Orthod*, 2011, 33(1): 15-21.
- [2] Hoffman MR, Martin ST, Choi W, et al. Environmental applications of semiconductor photocatalysis[J]. *Chem Rev*, 1995, 95(1): 69-96.
- [3] 付益平. 二氧化钛薄膜的制备及光催化性能研究[D]. 武汉科技大学. 2006.
- [4] Shah AG, Shetty PC, Ramachandra CS, et al. *In vitro* assessment of photocatalytic titanium oxide surface modified stainless steel orthodontic brackets for antiadherent and antibacterial properties against *Lactobacillus acidophilus*[J]. *Angle Orthodontist*, 2011, 81(6): 1028-35.
- [5] 胡红坡, 赵宏生, 郭子斌. 氮掺杂TiO₂光催化剂研究进展[J]. *材料导报*, 2008, 22(2): 39-45.
- [6] Asahi R, Morikawa T, Ohwaki T, et al. Visible light photocatalysis in nitrogen doped titanium oxides[J]. *Science*, 2001, 293(5528): 269-71.
- [7] Ohashi S, Saku S, Yamamoto K. Antibacterial activity of silver inorganic agent YDA filler[J]. *J Oral Rehabil*, 2004, 31(4): 364-7.
- [8] 余文珺, 夏良伟, 姜卫东, 等. 纳米载银无机抗菌剂对义齿基托树脂机械性能的影响[J]. *上海交通大学学报: 医学版*, 2006, 26(10): 1099-101.
- [9] 白石, 莫安春, 鲜苏琴, 等. 纳米抗菌复合膜的理化性能及对口腔细菌抗菌性能的实验研究[J]. *华西口腔医学杂志*, 2008, 26(4): 358-61.
- [10] 陈丽娟. TiO₂/ZnO纳米复合薄膜的制备及光催化性能研究[D]. 中国海洋大学. 2009.
- [11] 陈顺利, 刁训刚, 杨盟, 等. 射频磁控溅射制备TiO_{2-x}N_x薄膜及其光催化特性研究[J]. *功能材料*, 2005, 36(3): 464-6.
- [12] 李大成, 周大利, 刘恒, 等. 纳米TiO₂的特性[J]. *四川有色金属*, 2002, 3: 12-5.
- [13] 樊明文. 牙体牙髓病学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 20.
- [14] 曹采方. 牙周病学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 42.

(编辑:黄开颜)