

鈦金屬表面之非晶質與熱處理後生成銳鈦相 TiO₂ 奈米薄膜研究

Devitrification and thin film studies of ATO nanotubes

徐源鴻* 賴舜仁 薛文景

Y.H. Shiu S.J.Lai W.C. Say

摘要

鈦金屬是一種具有良好強度/重量比及高生物相容性的金屬。其高疲勞強度與抗蝕性被廣泛應用在生醫材料上。鈦金屬因表面形貌不同對骨細胞的成長有著極大的影響。本研究先將鈦試片表面生成緻密氧化膜使其表面具有奈米級孔洞，再探討經過熱處理製程表面氧化膜由非晶質相轉變為銳鈦相(anatase) 後之顯微鏡 morphologies 及各種性質變化。測試儀器以 SEM、EDS、XRD 及 FRP (頻率反應阻抗儀) 為主，再配合 MTT assay 檢測。本 In vitro 實驗是以培養類骨母細胞 MG-63 的 OD 值對晶質與非晶質鈦試片表面上的增殖 (proliferation) 活性程度作結果比較。

關鍵字：鈦金屬、熱處理、銳鈦相(anatase)、非晶質、MTT assay 檢測、細胞培養。

Abstract

Titanium and its alloy are increasingly attracting attention especially in the application of biocompatible needing such as implant devices. Treatments without affecting the mechanical and physical stability were crucial. The ordered nanochannel-array of anodic titanium oxide (ATO) is formed on the electro-polished titanium substrate. A compact ATO can be easy obtained in a dilute sulfuric acid solution and maintained as a long-lasting exterior. The initial ATO is amorphous leading to the difficulty for electron transpotation when used to photo-catalytic and

solar cell applications. This could be amended by having heat treatments. The reproducible procedure of amorphous and long-range ordered nanochannel ATO was then proposed in this study. A scanning electron microscope (SEM) was employed to characterize the amorphous and crystalline structure ATO nanotubes. Both forms of nanotubes were performed in vitro for comparing. The MTT solution was drawn out and 200µl of Dimethyl sulfoxide (DMSO) was added per well. The plate was shaken for 15 minutes and 100 µl of sample per well was add into ELISA plate to measured O.D. 570 nm with ELISA reader.

Keywords: biocompatible, heat treatment, anodic titanium oxide (ATO), ordered channel-array

1. 前言

鈦金屬具有優越的強度/重量比，鈦極容易與氧鍵結，而促使鈦金屬表面生成一薄的穩定氧化膜，而使鈦具有良好的耐蝕性〔1〕，避免因腐蝕而產生的金屬離子釋出到人體中，因此鈦金屬不會與人體產生排斥現象。此外，在文獻中提到鈦在經過一些表面處理後，能使磷灰石(apatite)更有效地在材料表面成核，將會更加提升其生物活性，使骨細胞容易成長在其上〔2〕，而在長期植入後，在鈦金屬表面僅檢測出 O、Ti、Ca、P，其中 Ca、P 會於人體內形成類骨之氫氧基層，其結構與人體骨組織相似。鈦金屬也具有足夠的機械強度及硬度〔1〕

), 以及適當的彈性模數, 以減少應力遮蔽 (stress shielding) 效應的產生 [1,3]。在其他一些研究中 [4,5,6] 更指出, TiO₂ 膜之不同相 (anatase 與 rutile) 皆可吸附 Ca 與 P 離子, 使其生成具有生物相容性之氫氧基層。

由於鈦金屬表面形貌不同, 將會對骨細胞的成長有著極大的影響, 因此本研究將鈦試片利用陽極處理方法, 使鈦金屬表面生成緻密氧化膜, 並使其表面具有奈米級孔洞, 然後經過熱處理退火製程, 使氧化膜由非晶質相轉變為銳鈦相(anatase)。在鈦試片經過表面處理之後, 我們將使用 XRD、SEM、EDS 及電化學交流阻抗分析儀(EIS), 來對鈦試片做表面形態及性質的分析, 另外再配合 in vitro 實驗, 以類骨母細胞(MG-63)作細胞培養, 以 MTT assay 來檢測細胞在不同表面處理後之鈦試片上的貼附性 (attachment) 及增殖 (proliferation) 活性程度。

2. 實驗方法

2.1 試片前處理

以 Grade 2 商業用純鈦 (cp Ti) 來做為我們實驗所使用之試片, 試片來源為忠正科技公司, 其成分如表 1 所示。切取直徑 14mm、厚度 4mm 之試片, 以 SiC 砂紙研磨至 1500 號, 並用 0.5 μ m 之 Al₂O₃ 粉拋光, 在 95% 酒精中震盪六十分鐘後洗淨、乾燥。

表.1 Cp Ti (G2) 之化學成分% [7]

H	O	N	Fe	C	Ti
0.0015	0.25	0.03	0.3	0.1	其餘

2.2 基材表面處理

我們將前處理過後之試片以陽極處理方法處理之: 以 0.5%HF 及 10%H₂SO₄ 作為電解液, 鈦試片為陽極, 鉑片為陰極, 在電壓 15V、時間為 120 分鐘的條件下對鈦試片作陽極處理, 使鈦試片表面形成緻密氧化膜, 並具有奈米級孔洞。此時鈦試片表面之陽極氧化膜 (ATO, anodic titanium oxide) 為非晶質相 (amorphous), 再將此鈦試片以每分鐘 40°C 加

熱至 450°C, 並持溫 3 小時, 對鈦試片作退火熱處理, 使鈦試片表面之 ATO 轉變為銳鈦相 (anatase)。我們將陽極處理後的試片分別編號為: A(CpTi/ATO amorphous)、B(CpTi/ATO anatase)、C(CpTi)。

2.3 XRD 及 SEM、EDS 分析

為了檢測我們所得之 ATO 鈦試片, 在經過熱處理後是否會如預期般轉變為銳鈦相, 將 A(CpTi /ATO amorphous)、B(CpTi /ATO anatase) 兩組試片作 XRD 分析, 起始角為 20°、終止角為 80°, 以每分鐘 2° 的條件對試片作分析。另外也使用掃描式電子顯微鏡(SEM), 觀察各組試片在陽極處理及熱處理後的表面型態, 並作能量散佈光譜儀(EDS)分析, 我們以線掃描分析方式, 檢測鈦試片橫切面的成分元素分布, 而從氧分子散佈情況, 可推測得知陽極氧化膜厚度。

2.4 電化學交流阻抗分析

交流阻抗(AC Impedance)分析法, 是以恆電流電位儀輸入一微小交流訊號(一般為振幅 10mV 的正弦波), 電壓干擾系統使其偏離穩態, 再以頻率響應分析儀提供 10⁻¹~10⁺⁵Hz 之頻率範圍。測得響應(response)之電壓或電流, 轉換得到阻抗 (impedance) 或導納 (admittance) 值, 藉以得到金屬表面資訊。並以 Bode 圖或 Nyquist 圖來解釋材料在腐蝕液中的腐蝕行為。

我們以鈦試片為工作電極、鉑片為對極、甘汞電極(S.C.E)為參考電極, 以模擬人工體液 Hank's solution 作為電解液, 利用此三電極電池模擬鈦試片浸漬於人體體液中之腐蝕行為, 並探討之。儀器使用上, 分別是 EG&G273 恆電流電位儀(Potentionstat), 及 Solartron1255 頻率響應分析儀(Frequency Response Analyzer)。模擬人工體液成分如表 2 所示。

表 2 Hank's solution 成分 [9]

成分	Concentration (g/l)
NaCl	8.00
NaHCO ₃	0.35
KCl	0.20
Glucose	0.10

KH ₂ PO ₄	0.10
CaCl ₂	0.14
Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O	0.06
MgCl ₂ · 6H ₂ O	0.10
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.06

2.5 In vitro 細胞培養

本實驗以類骨母細胞(osteoblast-like cell)MG-63作為培養細胞，其具有許多骨母細胞特徵，來源為BCRC生物資源及保存中心，組織來源為osteogenic sarcoma interferon producer；Human，冷凍日期為2006年12月，細胞繼代數為第五代。以MTT assay來檢測細胞的增殖活性程度，其原理是利用在活細胞內的粒腺體脫氫酵素(dehydrogenase)，其會將黃色可溶於水tetrazolium-3- (4, 5-dimethylthiazol-2)- 2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)轉變成紫色不溶性的formazan 晶體，formazan 經DMSO溶液溶出後，經ELISA reader量測之吸光值來測定細胞增殖的情形。其方法是將直徑15 mm 的試片置入24-well 的培養盤中，將MG-63 細胞懸浮液以10⁵/cm²的密度植株 (seeding) 於試片上，並以plastic culture disc 為positive control，最初在24小時更換培養液，其後每兩天更換一次培養液，在第3天培養後，在每個well裡置入100μl MTT溶液，經4小時避光培養後，培養液丟棄，再加入等體積之100μl 的DMSO溶液，將紫色的formazan溶出後，以ELISA reader 570nm 之吸光值測定細胞增殖的情形。每種所給予的條件五重複，以所得之平均結果和控制組及各組之間做一比較，是否有顯著的差異。

3. 結果與討論

3.1 SEM/EDS 觀察分析

將經過表面處理的鈦試片，以SEM觀察其表面型態，以EDS儀器做元素分析比較。其結果分別如圖1、圖2及圖3所示。從圖1及圖2中，我們可以看到經過陽極處理後，試

片表面所生成的ATO奈米孔洞，其孔徑大約為50~100nm。而從試片橫切面作EDS線掃描分析，可看到其成分大部份為Ti及O，結果如圖3所示，我們可以看到鈦成分由表面向基材漸增；氧成份從表面向基材漸減，我們可看出其氧化膜厚度約為0.6μm。

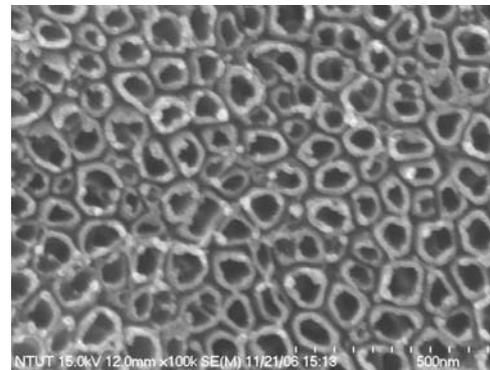


圖.1 A 試片 ATO amorphous SEM10000X/EDS

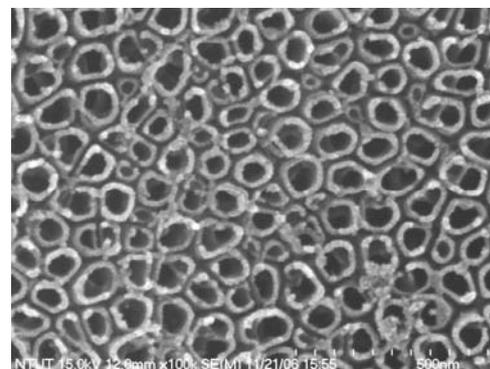
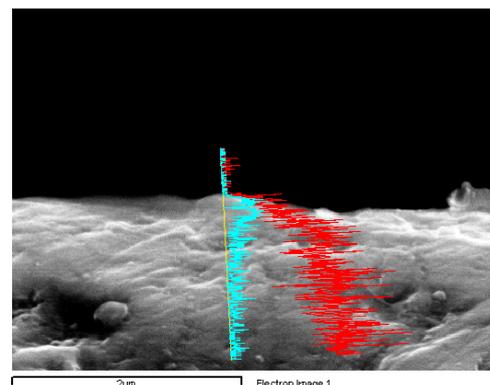


圖.2 B 試片 ATO anatase SEM10000X/EDS



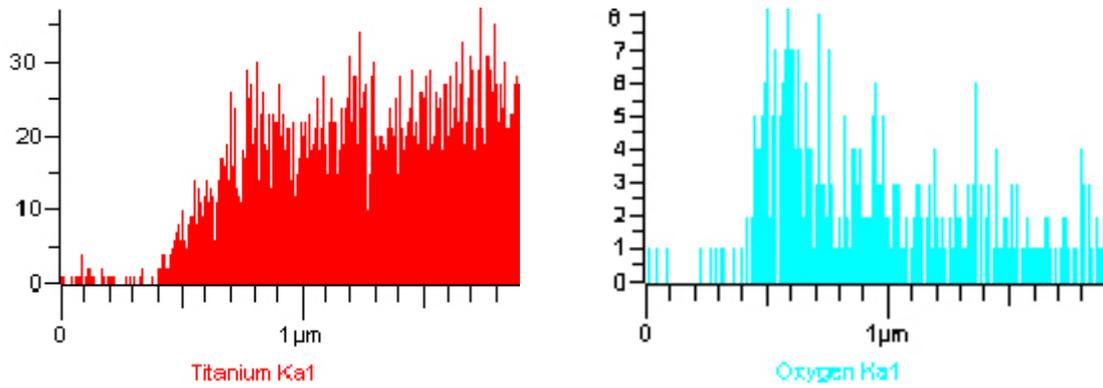


圖 3 B 試片橫切面之 EDS 分析

3.2 ATO 之 XRD 分析

將 A、B 試片作 XRD 分析後，其結果如圖 4 所示。我們可以看到 B 試片在經過加熱至 450°C、持溫 3 小時的熱處理後，在 XRD 頻譜圖中呈現出 anatase 的 peak，而 A 試片僅有 Ti 基材的 peak 出現，所以可得知 A 試片為 amorphous，B 試片為 anatase 相。

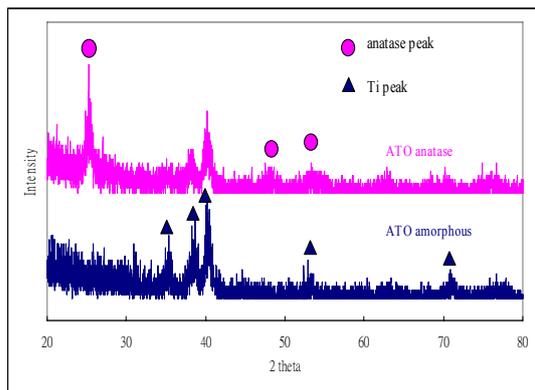


圖 4 A、B 試片 XRD 頻譜圖之比較

3.3 電化學交流阻抗量測

我們將試片浸漬在 Hank's solution 中 14 天，觀察試片在這 14 天之間的阻抗變化，藉以了解其抗腐蝕性。我們比較浸漬 1 天及 14 天後的 Bode 圖及 Bode-phase 圖，其結果分別如圖 5 及圖 6 所示。由圖 5 中我們可以看到 A 試片在中高頻的阻抗值較高，在低頻區卻因浸漬時間不同而有高有低，不如另外兩組試片來得穩定。從圖 6 中我們也可以看到，B、C 兩組試片在低頻區相角皆接近 90°，有趨近於電容的表現，而 A 試片則出現兩個波峰值，代

表其材料表面與溶液界面間較不穩定，推測是由於 amorphous 相的 ATO 屬於介穩態，而有此種現象出現。從圖 7 的 Nyquist 圖中，我們可以看到試片 A 所呈現的圖形依舊是不穩定的，其阻抗值反而比未處理得鈦試片還要來得低，而經過退火熱處理後的 anatase 相，其阻抗值便明顯地比未處理試片要來得高，證明其抗腐蝕能力的確有較為提升。

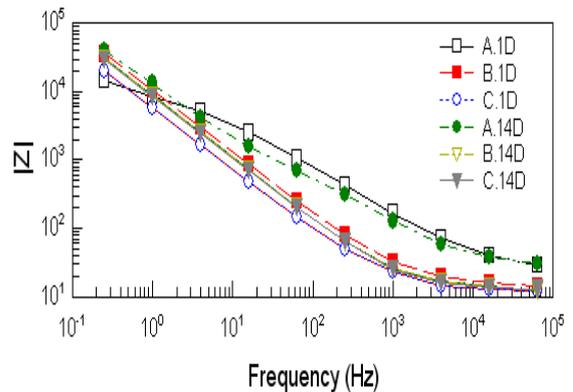


圖 5 試片浸漬 1 天及 14 天之 Bode 圖

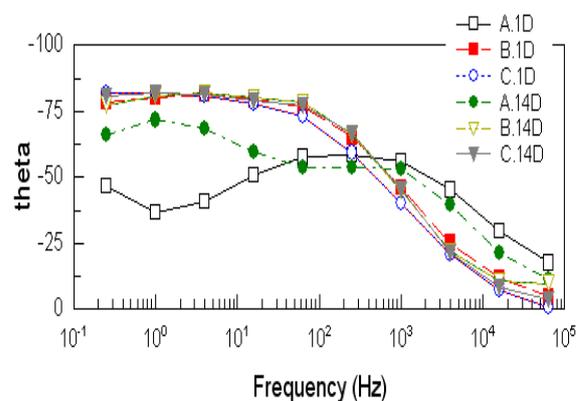
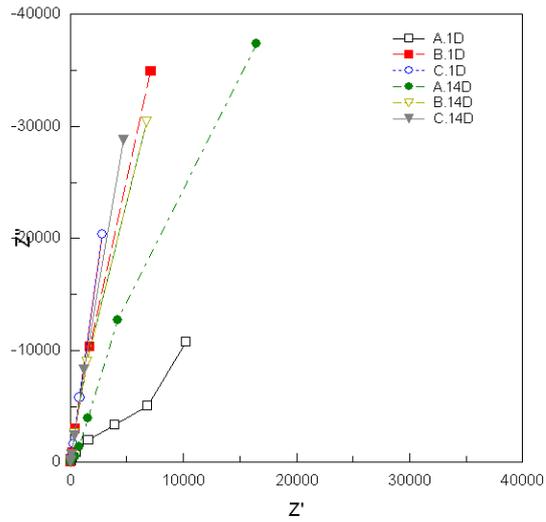


圖 6 試片浸漬 1 天及 14 天之 Bode-phase 圖

圖 7 試片浸漬 1 天及 14 天之 Nyquist 圖



3.4 細胞培養結果分析

細胞培養實驗在第三天及第七天各測一次吸光(OD)值，其結果分別如圖 8 及圖 9 所示。從二圖中我們可以看到鈦試片表面形成 ATO，不論是 amorphous 或是 anatase 相，在細胞增殖上均較未處理試片要來得少，這樣的結果是因為 TiO_2 的自潔性，以及奈米孔徑小於細胞最佳貼附大小所致。細胞不沾粘性可用於例如心血管支架上而可以減少血小板的貼附，降低血管再狹窄率。其可行性可作為其他後續實驗的驗證及討論範圍。

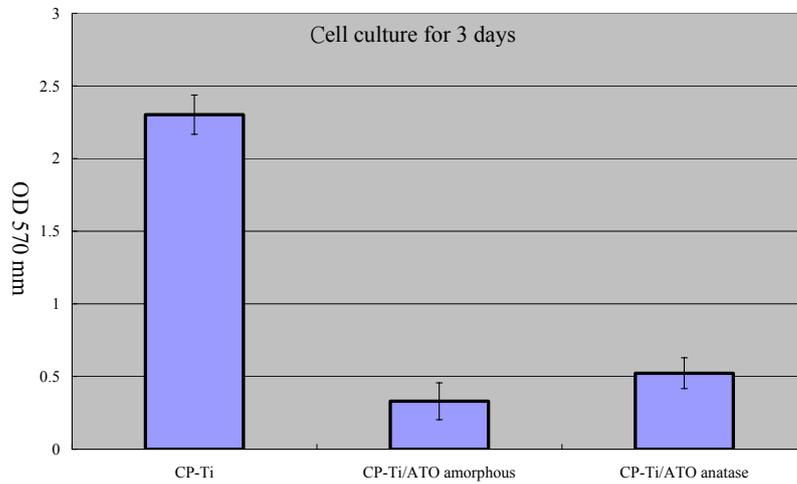


圖 8 細胞培養第三天，不同條件鈦試片之吸光值

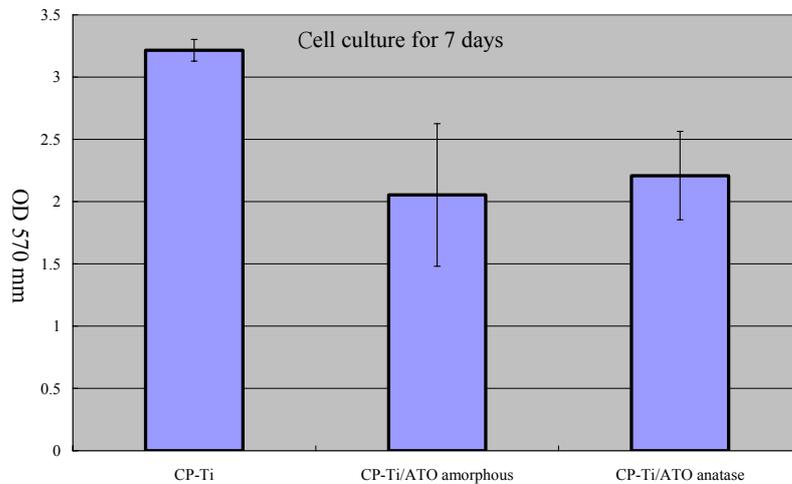


圖 9 細胞培養第七天，不同條件鈦試片之吸光值

4. 結論

本研究利用陽極處理使鈦試片表面生成 ATO，並具有孔徑大約為 50~100nm 之奈米孔洞，再經過加熱至 450°C、持溫 3 小時的退火熱處理後，藉由 XRD 分析得知其將會轉變為銳鈦相(anatase)，氧化膜厚度在 EDS 的分析下，得知約為 0.6 μ m。在經過 EIS 阻抗分析後，可以看到 amorphous 的 ATO，雖然在 SEM 下與 anatase 相 ATO 沒有太大差別，但在 EIS 的數據中所呈現的是一種不穩定的現象，就可看出與 anatase 相的明顯不同，另外我們也可以得知 anatase 相的抗腐蝕性比起未處理試片有明顯的提升。在細胞培養實驗中，我們可以看到表面生成 ATO 之鈦試片具有細胞不易貼附之特性，或許可應用在其他生醫元件上。

致謝

本研究承國科會研究計畫 NSC 95-2221-E-027-023 經費補助，特此致謝。

參考文獻

1. Santos Jr., E., Kuromoto, N.K., Soares, G.A. " Mechanical properties of titania films used as biomaterials," *Materials Chemistry and Physics* 102 (1),2007, pp.92-97
2. Kokubo, T., Kim, H.-M., Kawashita, M., Nakamura, T. " Bioactive metals: Preparation and properties," *Journal of Materials Science : Materials in Medicine* 15 (2),2004, pp. 99-107
3. Long, M., Rack, H.J. " Titanium alloys in total joint replacement - A materials science perspective," *Biomaterials* 19 (18),1998, pp.1621-1639
4. Laing, P. Ferguson, Jr. and H. A. Hodge, " Tissue Reaction in Rabbit Muscle Exposed to Metallic Implants," *J. Biomed. Mater. Res.* vol.1, 1967, pp 135-149.
5. Healy, K. E., & P. Ducheyne, " Oxidation Kinetics of Titanium Film in Model Physiologic Environments," *Colloid Interface Sci.*, 150, 1992, pp.404~417.
6. Maesli, P. A., P. R. Bloch, V. Geret, & S. G. P. Christel, A. Meunier, & A. J. Lee, eds. " Surface Characterization of Titanium and Titanium-Alloy, in *Biological and Biomechanical Performance of Biomaterial*," Amsterdam: Elsevier, 1986, pp.565
7. *Annual Book of ASTM Standards*, Vol 02.04
8. Chen, C.-C., Chen, J.-H., Chao, C.-G., Say, W.C. " Electrochemical characteristics of surface of titanium formed by electrolytic polishing and anodizing," *Journal of Materials Science*, 40 (15),2005, pp. 4053-4059.
9. 汪建民，*陶瓷技術手冊(下)*，新竹：中華民國粉末冶金協會，1994，第 1038-1039 頁。
10. Wang, X.-X., Yan, W., Hayakawa, S., Tsuru, K., Osaka, A. " Apatite deposition on thermally and anodically oxidized titanium surfaces in a simulated body fluid," *Biomaterials* 24 (25),2003, pp. 4631-4637