

远程氧等离子体灭菌对基质材料表面性能的影响

刘红霞^{1,2}, 陈杰榕¹

(1. 西安交通大学环境科学与工程系, 710049, 西安; 2. 西安交通大学动力工程多相流国家重点实验室, 710049, 西安)

摘要: 在特定的远程氧等离子体灭菌条件下, 通过接触角测定、质量损失率计算、微生物培养和体外凝血实验, 考察了染菌载体医用聚四氟乙烯 (PTFE) 表面的物理、化学及医学使用性能在灭菌前、后发生的变化, 并通过 X 射线光电子能谱进行了表面分析. 结果表明: 远程氧等离子体灭菌在载体 PTFE 膜表面引入了含氧极性基团并取代了 F 元素, 从而使 PTFE 表面的亲水性在距放电中心 0~40 cm 范围内得到明显增强, 且随距离的增加, 表面受损程度得到了有效抑制; PTFE 膜表面的生物相容性在灭菌后有较大幅度的增强, 并在距放电中心 40 cm 处获得了最佳改善效果; 亲水性是影响 PTFE 表面生物相容性好坏的关键因素, 而与刻蚀度没有特定关系, 只有当亲水性与刻蚀度达到最佳的平衡状态时, 才能使生物相容性得到最大程度的改善.

关键词: 远程氧等离子体; 灭菌; 医用聚四氟乙烯; 表面性能

中图分类号: O631 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-987X(2009)03-0082-05

Influence of Remote Oxygen Plasma Sterilization on Surface Property of Substrate Material

LIU Hongxia^{1,2}, CHEN Jierong¹

(1. Department of Environmental Science and Engineering, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710049, China; 2. State Key Laboratory of Multiphase Flow in Power Engineering, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710049, China)

Abstract: Under the given conditions of remote oxygen plasma sterilization, the physical, chemical and medical properties of sterilized poly(tetrafluoroethylene) (PTFE) surface are investigated by water contact angle measurement, mass loss calculation, microorganism incubation and blood coagulation measurement in vitro, respectively. The surface analysis is characterized by X-ray photoelectron spectroscopy. The results show that remote oxygen plasma sterilization can induce polar oxygen functionalities onto the PTFE film surface to replace the F element, making the surface hydrophilicity enhanced within the distance of 0-40 cm from the center of plasma discharge. With the distance increasing, the surface damage of PTFE is restrained. The surface biocompatibility of remote oxygen plasma-sterilized PTFE film is also strengthened to a great extent, and the optimal effect can be obtained at the distance of 40 cm. Surface hydrophilicity is the pivotal factor for influencing the biocompatibility, while surface etching has no special relationship with it. Only when the optimal equilibrium is obtained between surface hydrophilicity and etching could the biocompatibility achieve the maximum improvement.

Keywords: remote oxygen plasma; sterilization; poly(tetrafluoroethylene); surface property

医学灭菌较之其他技术更强调稳定性与安全性, 但低温等离子体在作用于微生物的同时, 必然会

作用于染菌载体表面. 随着越来越多的聚合物材料被广泛应用于现代医用设备、生物移植材料中, 等离

子体在灭菌的同时所引发的这些医用高分子材料表面的化学修饰、刻蚀、交联、聚合等反应^[1]对材料医学使用性能的影响已经受到人们的广泛关注. 一般的等离子体灭菌研究都只限于在放电区进行,即放电过程中生成的各活性物种(电子、离子、自由基等)混合存在,同时作用^[2-4]. 此时,基质材料表面的改性是难以控制的^[5-6]. 究竟能否实现灭菌与材料表面性能最优化的同步完成,从而实现可控等离子体灭菌技术,是等离子体灭菌应用基础研究中亟待解决的问题,目前尚未见国内外的相关报道. 据此,我们提出了远程等离子体灭菌技术,并在前期的研究中,确认了远程氧等离子体的有效灭菌范围及最佳灭菌条件^[7]. 与常规等离子体灭菌相比,远程等离子体可在距放电中心一定距离处形成较纯的高浓度自由基氛围^[7],从而强化目的性反应,获得对基质材料更有效的表面改性效果. 本文在文献^[7]研究的基础上,即在特定的等离子体灭菌条件下(放电功率 100 W,放电时间 60 s, O₂ 流量 40 cm³/min),通过接触角测定、质量损失率计算、微生物培养和体外凝血实验,考察了远程氧等离子体灭菌前、后医用聚四氟乙烯(poly(tetrafluoroethylene), PTFE) 表面的物理、化学及医学使用性能变化,并通过 X 射线光电子能谱(XPS)进行了表面分析.

1 材料与方法

1.1 实验材料

本实验所用的材料为文献^[7]中的染菌载体医用 PTFE 膜. 实验前,将灭菌后的 PTFE 样片用去离子水反复清洗后在超声波清洗器(KQ-100DB, 昆山市超声仪器有限公司)中洗涤 15 min,于无菌环境中干燥,经光学显微镜检验确认表面无菌后备用. 远程等离子体反应器与文献^[7]中的相同.

1.2 实验方法

1.2.1 接触角测试 采用接触角测定仪(JY-82型,承德试验机厂)对 PTFE 样片进行水接触角测量,温度为(20±1)℃,相对湿度为(45±5)%,液滴(去离子水)经微量进样器排出,控制液滴与试样接触面直径为 2~3 mm. 选取 5 个测量点分别测量后取平均值.

1.2.2 质量损失率计算 采用电子分析天平(Mettler AE240 型)测量灭菌前、后 PTFE 样片的质量,按下式计算质量损失率

$$W = \frac{m_1 - m_2}{S} \quad (1)$$

式中:W 为样片质量损失率(μg/m²);m₁、m₂ 分别为灭菌前、后 PTFE 膜的质量(μg);S 为样片表面积(m²).

1.2.3 抗细菌粘附实验 本实验中选用的指示菌种为大肠杆菌 8099 株,菌悬液的制备同文献^[7]. 将灭菌前、后的 PTFE 样片分别置于 10 mL 大肠杆菌悬液中,37℃下水浴振荡 24 h 后取出样片,先用磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗 3 次,除去薄膜表面游离的细菌,再经 PBS 溶液超声清洗 10 min,分离粘附于材料表面上的细菌. 将超声清洗后形成的菌悬液经振荡混匀,取样进行活菌培养计数^[8],按下式计算细菌粘附率

$$D = \frac{n_t}{n_0} \times 100\% \quad (2)$$

式中:D 为细菌粘附率(%);n₀、n_t 分别为灭菌前、后 PTFE 膜表面粘附的细菌数.

1.2.4 血液相容性实验 依据医用 PTFE 膜的用途,应从血液学、凝血和血小板 3 个方面来评价其血液相容性^[9]. 因此,本文依据 ISO 组织给出的介入材料血液相容性的评价方法^[10],选择以下 3 类实验分别进行测定.

(1)溶血实验^[11-12]. PTFE 样片经生理盐水冲洗 3 次,置于小试管中,加入 0.2 mL 稀释血液和 10 mL 生理盐水,轻轻混匀后置于 37℃恒温水浴箱中 60 min. 阳性对照组为 0.2 mL 稀释血液+10 mL 蒸馏水,阴性对照组为 0.2 mL 稀释血液+10 mL 生理盐水,亦分别轻轻混匀后置于 37℃恒温水浴箱中 60 min. 取出 PTFE 试样,将浸泡试样溶液及阳性、阴性对照组溶液分别以 2 000 r/min 离心 10 min,取上清液,在紫外可见分光光度计(Aglient 8453,美国安捷伦有限公司)上于 545 nm 处测定吸光度,取 3 次测量结果的平均值,按下式计算溶血率

$$R = \frac{D_t - D_{nc}}{D_{pc} - D_{nc}} \times 100\% \quad (3)$$

式中:R 为溶血率(%);D_t 为样片溶液的吸光度;D_{pc}、D_{nc} 分别为阳性、阴性对照组溶液的吸光度.

实验中的稀释血液由新鲜抗凝兔血 8 mL 加入 10 mL 生理盐水配成. 新鲜抗凝兔血由西安交通大学医学院动物中心提供.

(2)凝血时间测定. 本实验中以凝血酶原时间(t_P)、活化部分凝血活酶时间(t_{APT})、凝血酶时间(t_T)及血浆复钙时间(t_R)的变化作为测定对象,测定方法与文献^[12-13]相同. 人体抗凝血浆由西安交通大学医学院血液研究中心提供.

(3)体外血小板粘附实验^[14-15].将新鲜抗凝兔血以 1 000 r/min 离心 10 min,取上部富含血小板的血浆浸泡 PTFE 样片,37 ℃ 水浴静置 1 h.取出样片,经生理盐水漂洗 3 次,用体积分数为 2.5%的戊二醛溶液固定 2 h 后,将样片依次置于体积分数分别为 30%、50%、75%、95%和 100%的乙醇-水溶液中逐级脱水各 15 min,并于超净环境下自然干燥后喷金成像,用扫描电镜(JSM6700F,日本 JEOL 电子公司)对样片表面的血小板进行定量统计和粘附形态观察.

1.2.5 X 射线光电子能谱分析 灭菌前、后 PTFE 样片表面的化学成分通过 XPS (PHI5400ESCA,美国 Perkin-Elmer 公司)分析,以 Mg K_α 为 X 射线源(扫描范围为 0~1 253.6 eV),功率为 250 W,通能为 235 eV,分析室真空度为 50 nPa,分析仪器与样片之间的掠射角为 90°.实验中所用的化学试剂均为分析纯.

2 结果与讨论

2.1 PTFE 表面亲水性的变化

通常采用水接触角来表征 PTFE 表面的亲水性.图 1 表示经远程氧等离子体灭菌后 PTFE 表面的水接触角随放电距离的变化曲线.由图可知,在放电中心(0 cm),水接触角由灭菌前的 110°迅速下降至 77.8°,这主要是由于放电区中各活性粒子混合存在、共同作用的结果.当放电距离增至 20 cm 时,水接触角增大到 85.8°,表明这种共同作用是随着放电距离的增加而减弱的.当放电距离进一步增至 40 cm 时,水接触角又降至 80.2°,表明远程区中相对高浓度的自由基引发的官能团反应得到强化,使得表面更多地引进了极性基团,增强了材料的表面极性.实验表明,距放电中心 0 cm、40 cm 处的灭菌均可使 PTFE 表面的润湿性得到较大改善.

2.2 PTFE 表面刻蚀度的变化

当等离子体放电产生的高能活性粒子(电子、离

子)在灭菌过程中轰击 PTFE 表面时,会导致 C—C 键断裂,分子分解成碎片脱去,从而在 PTFE 表面形成刻蚀层.因此,考察质量损失率可获得材料表面刻蚀程度的信息.

图 2 为远程氧等离子体灭菌后 PTFE 膜的质量损失率随放电距离的变化曲线,可以看出质量损失率随放电距离的增加快速下降.这与电子、离子相对浓度随放电距离的变化是一致的^[7],即电子、离子对材料表面的刻蚀作用随放电距离的增加迅速减小.由文献^[7]可知,60 cm 和 80 cm 处的灭菌效果较差,因此根据实验可以确定,40 cm 处的灭菌可使 PTFE 表面的受损程度降至最低.

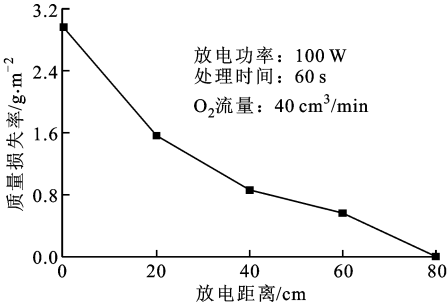


图 2 灭菌后 PTFE 表面的质量损失率变化

2.3 PTFE 表面抗细菌粘附性能的变化

图 3 所示为 100 W、60 s、40 cm³/min 条件下灭菌前、后 PTFE 样片表面大肠杆菌粘附 24 h 后的粘附率.从图中可以看出,灭菌后的载体表面对细菌粘附均有一定程度的抑制,并在距放电中心 40 cm 处获得最好的抗细菌粘附性,0 cm 处次之.将这一结果与材料表面亲水性及刻蚀度的变化相关联可以发现,虽然影响材料抗细菌粘附性的关键因素是亲水性,而与其刻蚀度没有特定关系,但却只有在样片亲水性与刻蚀度达到最佳平衡状态时,才能使表面抗细菌粘附性获得最大程度的改善.

2.4 PTFE 表面血液相容性的变化

2.4.1 溶血率的变化 表 1 给出了按式(3)计算的

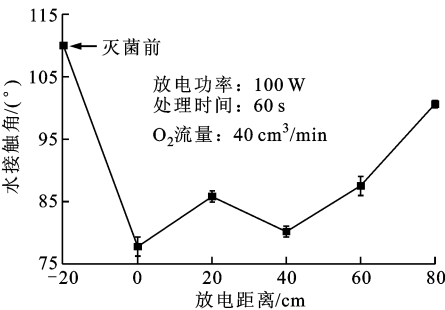


图 1 灭菌后 PTFE 表面的水接触角变化

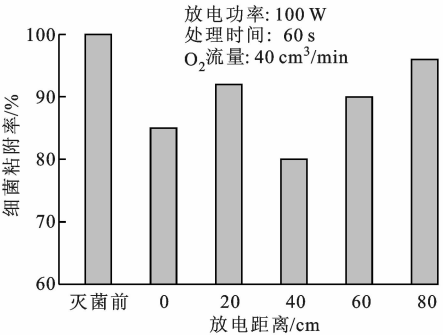


图 3 灭菌前后 PTFE 表面大肠杆菌的粘附率

溶血率值. 由表可知,灭菌后 PTFE 样片表面的溶血率得到了很大程度的降低,抗溶血性能大大增强,且在距放电中心 40 cm 处的效果最为突出,0 cm 处次之. 这同样是 PTFE 表面亲水性和刻蚀度变化的综合效应所致.

表 1 PTFE 表面的溶血率

距离/cm	灭菌前	0	20	40	60	80
溶血率/%	3.13	0.12	0.26	0.04	0.17	0.60

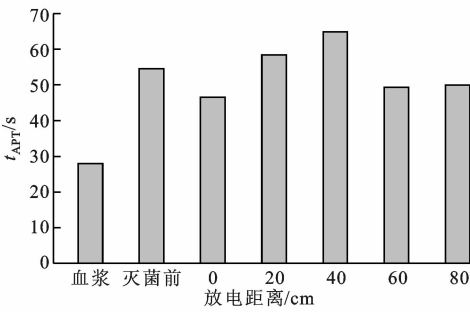
注:等离子体处理参数为 100 W, 60 s, 40 cm³/min.

2.4.2 凝血时间的变化 图 4 所示为原血浆与接触 PTFE 后血浆的各类凝血时间变化情况. 从图中可以清楚地看出,灭菌后 PTFE 表面血浆的 t_{APT} 、 t_P 和 t_T 比灭菌前均有一定程度的延长,且随着距离的增加先延长后缩短,最高点均出现在距放电中心 40 cm 处,表明该处的灭菌可使 PTFE 载体表面获得最好的抗凝血性. 此外,灭菌后 PTFE 表面的 t_R 均有所缩短,但在 0 cm 处缩短最少,40 cm 处次之,表明从 t_R 的意义上讲,灭菌后 PTFE 载体表面在这 2 处亦具备良好的抗凝血性. 将这一结果与 PTFE 表面的亲水性与刻蚀度相关联同样可以发现,只有当样片的亲水性与刻蚀度达到最佳平衡状态时,才能使材料表面抗凝血性能获得最大程度的改善.

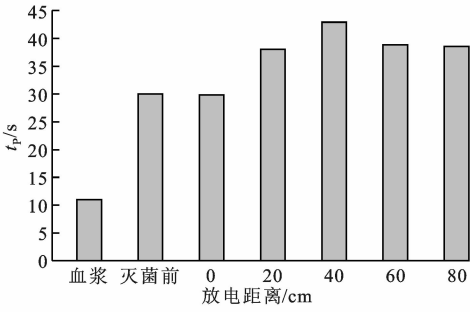
2.4.3 血小板粘附性能的变化 图 5 和图 6 分别是等离子体处理参数为 100 W、60 s、40 cm³/min 条件下,灭菌前、后 PTFE 表面血小板粘附的 SEM 照片. 照片显示,与灭菌前的 PTFE 膜相比,灭菌后 PTFE 表面粘附的血小板数量随放电距离的增加明显减少,且聚集与变形均大大减弱,至 40 cm 处粘附量最少,血小板呈圆形,单个孤立分布,无聚集. 之后随放电距离的进一步增加,血小板的粘附量又迅速增加,且聚集成团,变形严重. 由此可知,远程氧等离子体在 40 cm 处的灭菌可使 PTFE 膜表面获得优良的抗血栓形成性能. 这是由于 40 cm 处材料表面良好的亲水性和较低的刻蚀度使得白蛋白在此表面的吸附能力增强,从而导致血小板粘附量减少,抗血栓性能增强.

2.5 PTFE 表面的 XPS 分析

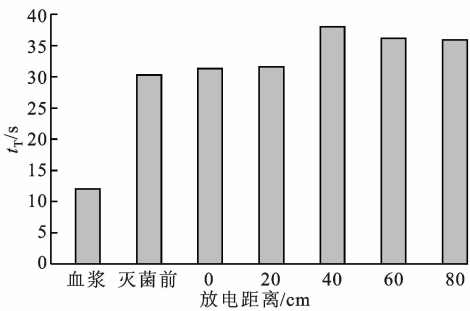
在远程氧等离子体灭菌过程中,PTFE 表面首先发生 C—F 键的断裂,形成的 F 原子进入气相被抽走造成氟碳比(相应元素的 XPS 峰面积与其灵敏度因子的商之比. 氧碳比的定义与此相同)的下降,断键在表面形成自由基,自由基与等离子气氛中的 O₂ 接触后迅速发生反应,在样品膜表面引入 C=O



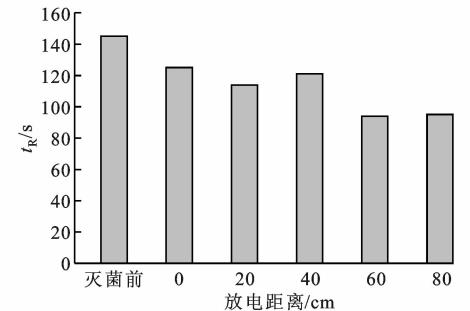
(a) t_{APT} 的变化



(b) t_P 的变化



(c) t_T 的变化

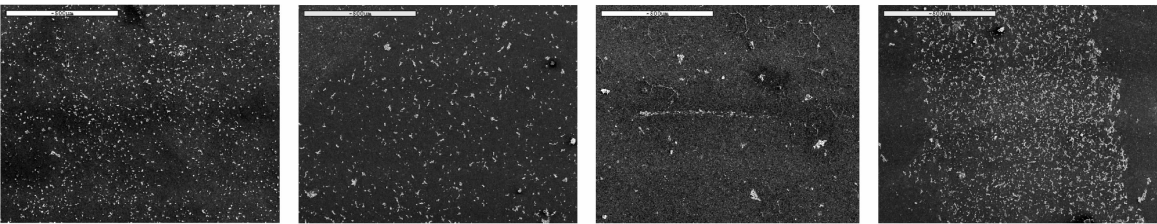


(d) t_R 的变化

等离子体处理参数:100 W, 60 s, 40 cm³/min

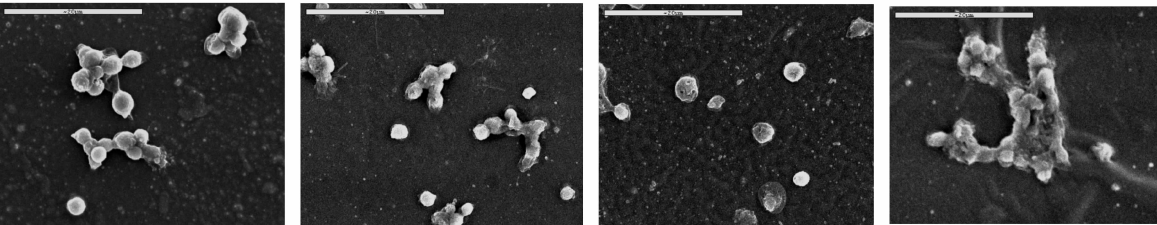
图 4 灭菌前后 PTFE 表面各类凝血因子时间随放电距离的变化

和 C—O 等极性基团,致使氧碳比增大,表面亲水性提高. 根据 XPS 的定量分析结果(见表 2)可知,放电中心 0 cm 处的氟碳比比 40 cm 处的低,表明放电区去 F 能力强,对膜表面的损伤大,40 cm 处的刻蚀作用弱,对膜表面的损伤小. 放电中心 0 cm 处的氧碳比大,表明此处引入了较多的含氧基团,这与 0 cm 处亲水性改善效果最好相符. 灭菌前 PTFE 表



(a)灭菌前 (b)0 cm (c)40 cm (d)80 cm

图 5 远程氧等离子体灭菌前后 PTFE 表面血小板粘附的低倍 SEM 照片 ×100



(a)灭菌前 (b)0 cm (c)40 cm (d)80 cm

图 6 远程氧等离子体灭菌前后 PTFE 表面血小板粘附的高倍 SEM 照片 ×3 000

表 2 灭菌前后 PTFE 膜表面元素的 XPS 分析结果

试样位置	质量分数/%			氟碳比	氧碳比
	C	F	O		
灭菌前	33.50	66.00	0.50	1.97	0.015
0 cm 处	46.98	49.79	3.23	1.06	0.069
20 cm 处	45.08	53.60	1.32	1.19	0.029
40 cm 处	40.94	57.83	1.30	1.41	0.032

注:等离子体处理参数为 100 W, 60 s, 40 cm³/min.

面含有的微量 O 元素是由于材料对空气中 O₂ 的吸附作用所致。

3 结 论

远程氧等离子体灭菌在载体 PTFE 表面引入了含氧极性基团并取代了 F 元素,从而在距放电中心 0~40 cm 范围内使医用 PTFE 表面的亲水性明显增强,且随放电距离的增加,电子、离子刻蚀作用减弱,质量损失率大幅度降低,PTFE 表面的受损程度得到了有效抑制。同时,PTFE 膜表面的抗细菌粘附性、抗溶血性、抗凝血性及抗血小板粘附性均有较大幅度的增强,并在距放电中心 40 cm 处获得最佳效果。结合文献[7]的研究结果可知:远程氧等离子体在 100 W、60 s、40 cm³/min 的放电条件下,在距放电中心 40 cm 处能够实现灭菌与载体 PTFE 膜表面物理、化学及医学使用性能最佳改善的同步完成,从而实现可控等离子体灭菌技术。

参考文献:

[1] KACZMAREK H, KOWALONEK J, SZALLA A, et al. Surface modification of thin polymeric films by air-plasma or UV-irradiation [J]. Surface Science, 2002, 507/510: 883-888.

[2] LAROUSSE M, LEIPOLD F. Evaluation of the roles of reactive species, heat, and UV radiation in the inactivation of bacterial cells by air plasmas at atmospheric pressure [J]. International Journal of Mass Spectrometry, 2004, 233(1/3): 81-86.

[3] CHOI J H, HAN I, BAIK H K, et al. Analysis of sterilization effect by pulsed dielectric barrier discharge [J]. Journal of Electrostatics, 2006, 64 (1): 17-22.

[4] LEE K Y, PARK B J, LEE D H, et al. Sterilization of Escherichia coli and MRSA using microwave-induced argon plasma at atmospheric pressure [J]. Surface and Coatings Technology, 2005, 193 (1/3): 35-38.

[5] CHEN Jierong, YAN Jinglian, ZHANG Yuanze. Surface modification of medical PVC by remote oxygen plasma [J]. Composite Interfaces, 2004, 11 (2): 123-130.

[6] WANG Chen, CHEN Jierong, LI Ru. Studies on surface modification of poly(tetrafluoroethylene) film by remote and direct Ar plasma [J]. Applied Surface Science, 2008, 254(9): 2882-2888.

[7] 刘红霞,陈杰璐,周媛. 远程氧等离子体对大肠杆菌的灭菌效果及机理研究[J]. 西安交通大学学报, 2008, 42 (1): 96-100.

LIU Hongxia, CHEN Jierong, ZHOU Yuan. Studies

- on germicidal efficiency and mechanisms of *Escherichia coli* by remote oxygen plasma [J]. *Journal of Xi'an Jiaotong University*, 2008, 42 (1): 96-100.
- [8] 钱存柔, 黄仪秀. 微生物学实验教程[M]. 北京: 北京大学出版社, 1999.
- [9] GB/T 16886—1997 医疗器械生物学评价系列标准[S]. 北京: 中国标准出版社, 1997.
- [10] ISO 10993—1992 Biological evaluation of medical devices [S]. Geneva, Switzerland: ISO, 1992.
- [11] 刘兴光, 汪刚, 俞世强, 等. 组织工程心脏瓣膜支架材料的血液相容性[J]. *中国临床康复*, 2003, 8 (30): 6659-6662.
- LIU Xingguang, WANG Gang, YU Shiqiang, et al. Hemocompatibility of tissue engineering cardiac valve matrix materials [J]. *Chinese Journal of Clinical Rehabilitation*, 2003, 8(30): 6659-6662.
- [12] 霍丹群. 肝素化高分子液晶/聚醚氨酯生物材料的研究[D]. 重庆: 重庆大学生物工程学院, 2004.
- [13] 邓政兴. 高分子液晶的合成及其血液相容性研究[D]. 广州: 暨南大学理工学院, 2004.
- [14] AMIJI M M. Permeability and blood compatibility properties of chitosan-poly(ethyleneoxide) blend membranes for haemodialysis [J]. *Biomaterials*, 1995, 16 (8): 593-599.
- [15] 那娟娟, 尹光福, 李伯刚, 等. 三种生物碳素材料表面的血小板粘附研究[J]. *化工新型材料*, 2004, 32 (6): 43-45.
- NA Juanjuan, YIN Guangfu, LI Bogang, et al. Research of adhesion of platelets on three biomaterial carbonaceous materials [J]. *New Chemical Materials*, 2004, 32 (6): 43-45.

(编辑 葛赵青)