

ICP - Mass Spectrometry

作者：

Chady Stephan

Ken Neubauer

Ewa Pruszkowski

PerkinElmer, Inc.
Shelton, CT

生物监测领域的新前沿： 血清中钛的总颗粒分析和 单颗粒分析

简介

多年以来，ICP-MS 一直是人体体液（尿液、血液、血清和唾液）以及组织和骨头中铅（Pb）、砷（As）、

汞（Hg）和铜（Cu）等元素痕量分析的首选工具。单个元素，有毒或营养元素在特有的基质中运行方式可为医生提供关于患者的全面信息。最近，由于植入物的普及，诸如钛（Ti），钴（Co）和钒（V）之类的元素已被添加到一般的测试分析列表中。

钛（Ti）金属被广泛用于各种各样的人体修复术，例如人工髋关节（图 1）、膝盖、种植牙以及医用夹子和螺钉等。人工关节实际上是由不同钛合金制成，其中经常会混合少量铝和钒。这些合金被称为“医用”钛合金。在这个医疗领域中使用钛有以下几个原因。首先，由于钛不受体液腐蚀，因此被视为最具生物相容性的金属，也是少数能够整合入骨头的金属之一（骨整合）。此外，医用钛合金无毒，非磁性，具有与骨头类似的灵活性和弹性。¹

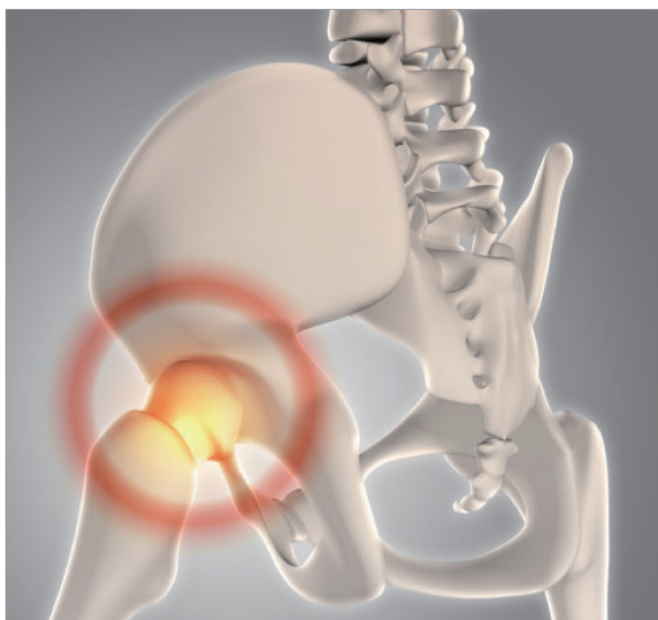


图 1. 插图显示的是医用钛合金制成的置换人工髋关节。

然而，由于人体髋部的球窝关节高强度的工作，钛金属会随着时间的流逝而慢慢磨损并进入血液。虽然钛本身无毒，但是血液中的钛含量水平能够帮助医疗服务提供者了解植入体降解的程度。因此，监控植入人工髋关节的患者血清或髋关节抽出物中钛含量十分重要。

但是由于种种因素限制（包括浓度低、众多潜在的光谱干扰和复杂的人体体液基质）想要准确测量血清中的钛含量比较困难。本研究将探索如何分析血清中的钛含量，寻找有助于克服这种困难的仪器参数和方法。本实验仅用于研究用途，不用作诊断评价。

实验

样品和样品制备

本研究使用的有证标准物质（CRM）为含有正常水平微量元素的血清（UTAK® Laboratories Inc., Valencia, California, USA）。此有证标准物质不是为钛而认证，而是作为实验中的血清基质。此外，患者样品（血清和髋关节抽出物）来自 University Hospital Saint-Louis - Lariboisière - Fernand-Widal, Paris, France。

在所有分析中，血清和抽出物均使用 0.2% HNO₃（Optima Grade, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA）稀释 20 倍。稀硝酸能让钛在溶液中保持稳定，而保持低浓度有助于防止蛋白质和细胞碎片沉淀。

总钛分析时使用标准加入法（MSA），其中校准曲线的基质是稀释了 20 倍的血清。

而对于钛纳米微粒的分析，可行性试验时使用的是 NIST 1898 TiO₂ 纳米微粒。NIST SRM 8013 (60 nm 金纳米微粒) 用于测定输送效率（TE）。在稀释 20 倍的血清中制备溶解态校准曲线。

仪器参数

所有分析都在 PerkinElmer NexION® 2000 ICP-MS 上进行，分析条件如表 1 所示。由于钛同位素存在诸多潜在干扰，因此分析过程中使用氨作为反应气体，将钛转换为 Ti-NH₃ 簇 / [TiNH(NH₃)₄]⁺ (m/z 131)。为了将信号最大化，四级杆离子偏转器（QID）电压设置用于传输 m/z 48——最丰富的钛同位素（73.8%）。所有分析均在相似条件下使用相同的样品导入成分，唯一的区别在于停留时间：总钛测量使用的是 50 ms 停留时间，而 SP-ICP-MS 分析使用的是 50 μs 停留时间。将停留时间控制在低于 100 μs 对于 SP-ICP-MS 分析而言十分关键，因为这样有助于降低在相同分析时间窗内检测到两个纳米颗粒的可能性。所有分析和数据处理均通过 ICP-MS 软件的 Syngistix™ 和 Syngistix 纳米颗粒应用模块来进行。

表 1. NexION 2000 ICP-MS 分析钛含量仪器条件。

参数	数值
样品提升速率	≈ 0.3 mL/min
喷雾器	MEINHARD® C 型玻璃雾化器
雾室	Cyclonic 玻璃雾室
雾化器流量	≈ 1 L/min
射频功率	1600 W
QID 电压	设为 ⁴⁸ Ti ⁺ 最大偏转
驻留时间	50 ms（总钛分析） 50 μs（SP-ICP-MS）
反应气	NH ₃ （1.0 mL/min）
RPq	0.25

结果和讨论

血清中总钛测定

过往研究结果² 显示我们能够在反应模式—质量转移模式下变为氨团簇（m/z 131）的钛进行测量。而在当前研究中，在优化 NH₃ 流速后（图 2），可以通过扫描确认是否存在 Ti-NH₃ 团簇（m/z 131）（图 3）。

在本研究中，QID 电压设为 m/z 48 最大偏转频率（基于钛最大丰度同位素），而分析四极杆设为筛选 m/z 131，即 Ti-NH₃ 团簇。通过 QID 电压和四极杆的质量筛选，可以在分析反应产物时优化分析信号，同时去除潜在干扰。

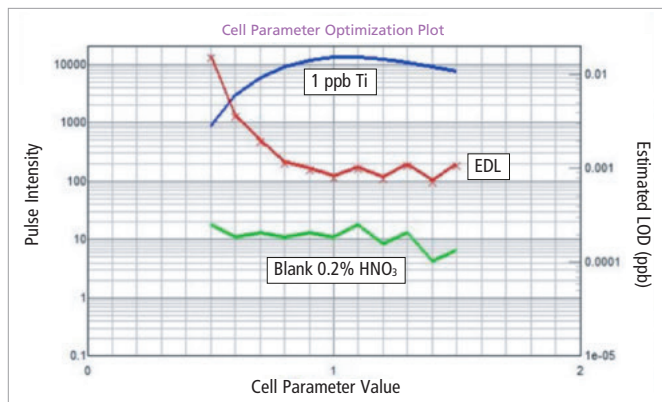


图 2 用于生成钛团簇 (m/z 131) 的 NH_3 流速优化 (mL/min)。预计钛检出限 (EDL) 为 1 ppt。

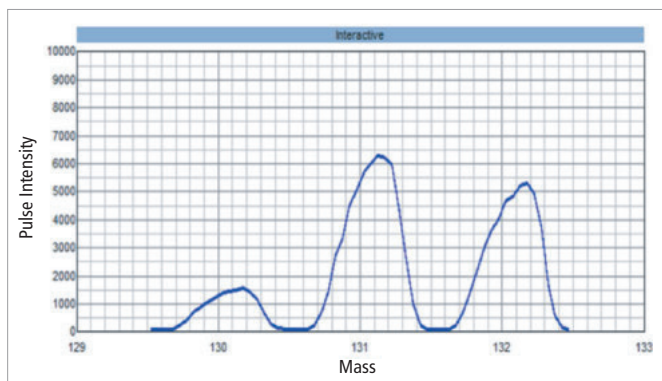


图 3. 在 130-132 质量范围内扫描 Ti-NH_3 团簇。钛浓度为 1 ppb。

虽然氩也有 m/z 130、131 和 132 的同位素，但是氩能够通过电荷转移与 NH_3 发生快速反应，因此在这些质量下只会余下极低 cps 的背景。

样品中总钛分析使用标准加入法，标准曲线使用的 20 倍稀释的 UTAK 血清中加入 0.5、1 和 2 $\mu\text{g/L}$ 钛标准溶液。图 4 展示了曲线的相关系数为 0.99996。

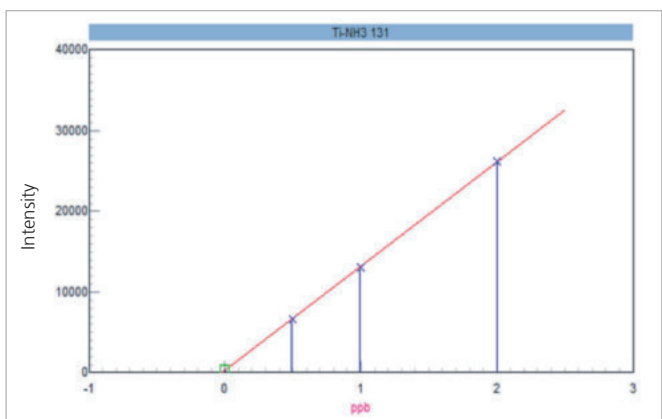


图 4. 20 倍稀释血清中的钛标准加入法曲线 (m/z 131)。

对三个样品进行了分析：一个是血清标准物质 (UTAK，没有对钛定值)，另外两个来自接受髌关节植入的患者——其中一个为血清，另一个为髌关节抽出物（植入体周围抽取的体液）。这三个样品（稀释 20 倍）的结果参见表 2。UTAK（正常血清）标准物质中的钛含量没有标准值，但是结果较低，在 20 倍稀释血清中估算检出限大约为 0.004 $\mu\text{g/L}$ 。

对 UTAK 血清中进行钛加标 0.5 $\mu\text{g/L}$ ，回收率为 98%，证明此方法是准确的。患者样品中的钛含量更高，特别是在血清中。

表 2. 20 倍稀释样品中钛分析结果。

样品	钛浓度 ($\mu\text{g/L}$)	% RSD
UTAK 血清	0.008	9.2
UTAK 血清 +0.5 $\mu\text{g/L}$	0.498	1.3
患者血清	1.22	2.0
患者抽出物	0.109	1.9

接着，在三个样品中分别加入 1 $\mu\text{g/L}$ TiO_2 纳米颗粒（等同于 0.6 $\mu\text{g/L}$ 钛），并再次测定。表 3 所列结果显示平均回收率为 71%，但更值得注意的是 RSD 比没有加标纳米颗粒 TiO_2 （表 2）的血清样品高出许多。这表明很可能血清钛分析中观察到的 RSD 升高是由于样品中存在钛纳米颗粒。

表 3. 加入 1 $\mu\text{g/L}$ 钛纳米颗粒到血清后钛分析结果。

样品	钛浓度 ($\mu\text{g/L}$)	% 回收率	% RSD
UTAK + Ti 纳米颗粒	0.430	72	67
血清 + Ti 纳米颗粒	1.65	72	11
抽出物 + Ti 纳米颗粒	0.413	69	35

血清中钛颗粒的单颗粒分析

为了确认能够在 m/z 131 质量下能测定 $\text{TiNH}(\text{NH}_3)_4^+$ 钛纳米颗粒，我们对 0.2% HNO_3 中的 1 $\mu\text{g/L}$ TiO_2 纳米颗粒悬浮液进行分析。图 3 显示实时信号与时间曲线图、粒径与频率柱状图，说明最大概率粒径为 80 nm，与 NIST 认证中所示的 71-83 nm 非常接近。

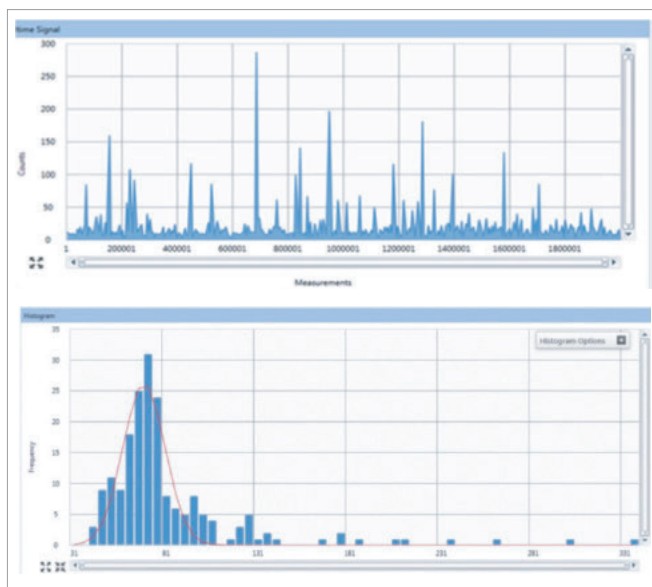


图 5. 以 $\text{TiNH}(\text{NH}_3)_4^+$ （顶部）和对应的 TiO_2 粒径分布（底部）测量 TiO_2 纳米颗粒。

接着对 UTAK 有证标准物质血清、患者抽出物和患者血清进行 Ti 纳米颗粒和溶解态钛评估。

表 4 显示 UTAK 血清三次独立分析的 SP-ICP-MS 结果。其中就如同预计的标准物质一样几乎没有检测到钛颗粒。此结果与所有测量数据均保持一致。

表 4. UTAK 血清中钛的 SP-ICP-MS。

样品	最大概率粒径 (nm)	峰值编号	颗粒浓度 (PART/mL)	溶液溶度 (µg/L)
1	111	15	192	0.027
2	105	13	166	0.025
3	119	10	128	0.027
平均值	111	13	162	0.026

最后分析取自患者人工髋关节的样品。如表5所示，患者样品中的颗粒远远高于标准物质，很可能是由于人工髋关节中钛磨损所致。除此之外，患者血清中溶解钛浓度与总钛分析的测量结果十分相近。

表 5. 患者血清样品的 SP-ICP-MS 结果。

样品	最大概率粒径 (nm)	峰值编号	颗粒浓度 (PART/mL)	溶液溶度 (µg/L)
血清 1	61	123	2151	1.28
血清 2	87	121	2116	1.23
血清 3	51	119	2081	1.27
平均值	66	121	2116	1.26
抽出物 1	53	67	1172	0.03
抽出物 2	82	64	1119	0.02
抽出物 3	87	67	1172	0.02
平均值	74	66	1154	0.02

结论

本研究证明我们能够利用 NexION 2000 ICP-MS 的反应 - 质量转移分析功能准确测量血清中低含量的钛。通过将 NH_3 作为反应池气体， Ti^+ 能够高效反应形成 $\text{TiNH}(\text{NH}_3)_4^+$ (m/z 131) 来避免 Ti^+ 同位素的一般干扰。此外，事实证明该反应能够有效测量血清中的钛纳米颗粒。综合起来，这些结果表明钛同时以溶解态和颗粒物状态存在于取自患者人工髋关节的样品中。但是还需要开展进一步研究以确定是否可以使用 SP-ICP-MS 进行植入体磨

损的早期检测，但是初步研究显示这有很大希望。

参考文献

1. Wikipedia, Search - Titanium biocompatibility.
2. "The Advantages of the NexION 300D/350D ICP-MS for the Determination of Titanium in Serum", Application Brief, PerkinElmer 2014.