

电感耦合等离子体质谱基体匹配法研究

静脉支架镍离子释放规律

郝格格, 梁艳, 雷晓彤, 周国庆

(西安交通大学大型仪器设备共享实验中心, 西安 710049)

摘要: 静脉支架是静脉流出道梗阻的微创介入治疗方法, 静脉支架的使用必须要经过对支架材料在人体内的释放规律研究基础上的安全性评估, 才能形成可靠产品投入临床应用。本工作采用电感耦合等离子体质谱法对镍制静脉支架在人体模拟液磷酸盐平衡生理盐水 (PBS 溶液) 中的镍离子释放规律进行了研究。将某公司产品在 PBS 溶液中多次浸提, 采用基体匹配法定量测定浸提液中微量镍离子的浓度, 再根据浸提时间得到了镍离子的释放规律, 为镍制静脉支架在人体中的镍离子释放的安全性评估提供了可靠的依据。

关键词: 电感耦合等离子体质谱; 静脉支架; 镍离子; 基体匹配法; 模拟体液

1 引言

镍作为过渡金属被广泛应用于医疗器械领域, 尤其是其镍钛合金因具有良好的生物相容性、耐腐蚀性、形状记忆性和超弹性等优点, 被广泛的应用于医疗器械领域^[1-4]。同时镍离子也是一种重金属离子, 摄入过多的镍, 会引起中枢性循环和呼吸紊乱, 使心肌、脑、肺、肾出现水肿、出血或变性, 还可能使白血病、癌症的发病率升高^[5]。制造假体所使用的不锈钢中通常含有 8.5%~14% 的镍, 最高可达到 35%^[6-8]。钛合金也广泛应用于外科假体制造, 其中也含有不同浓度的镍元素。由于各国已经开展了大量关于镍元素毒性的研究, 因此这些合金在医疗器械中的使用备受争议。目前已知镍合金在医疗领域使用时产生的不良反应都与合金发生腐蚀或者摩擦导致其中镍离子的释放有关^[9]。

镍钛合金静脉支架植入人体后, 镍钛合金在体内的镍离子释放速度和释放量, 是评价其临床使用安全性的重要内容。然而由于存在体内测试时间长、成本高、测试结果准确率低 (机体对实验结果的干扰较大) 等因素, 在临床前评价阶段, 宜通过建立镍离子体外释放模型, 形成镍离子释放方法。本工作采用电感耦合等离子体质谱法 (ICP-MS) 对镍制静脉支架在人体模拟液磷酸盐平衡生理盐水 (PBS 溶液) 中的镍离子释放规律进行了研究。从短期接触、长期接触、持久性接触来测试镍钛合金静脉支架在模拟生理环境 PBS 溶液中镍离子的释放速率和释放量来评价其临床使用的安全性。

2 实验部分

2.1 原理与方法

实验采用对同一静脉支架在 PBS 溶液中进行多次浸提的方式，首先将静脉支架放置于装有模拟生理环境的 PBS 溶液的锥形瓶中，在生理温度范围（ 37 ± 1 ） $^{\circ}\text{C}$ 内进行浸提。达到预定时间，取出全部 PBS 浸提液，用 ICP-MS 定量分析其中的 Ni 离子含量；再注入新的 PBS 浸提液，重复上述过程，直至完成所有设定时间点的浸提和测定。这种方法保证了在每个时间间隔内都是新鲜的浸提液，而不用考虑由于浸提液的长期使用影响到浸提效果。

由于 PBS 溶液中有大量的 K 盐和 Na 盐，在进行 ICP-MS 分析时会产生严重的基体效应，这会使得：（1）Ni 离子的分析灵敏度受到抑制，从而大大影响分析的检出限，这样可能会使得 PBS 溶液中低浓度的 Ni 不能检出；（2）采用传统的外标法进行分析时，由于标准与样品的基体不同会导致灵敏度的差异，这会导致分析结果失真。在本工作中（1）首先将浸提液用 2%稀硝酸定量稀释（预先用条件实验确定最佳稀释比：最小检出限）以减小基体效应对 Ni 离子信号的抑制；（2）采用基体匹配法进行 PBS 中 Ni 离子的定量测定，即用与浸提液相同浓度的 PBS 溶液配制标准曲线，这样使得样品和标准在同一基体条件下测定，保证了结果的可靠性。

2.2 实验器材与试剂

实验过程中用到的仪器如表 1，试剂见表 2。

表 1. 实验仪器

设备名称	设备型号
电感耦合等离子体质谱仪	PE NexION 350D
水浴恒温振荡器	SHY-2
纯水仪	IQ Element 7010
酸纯化仪	DST-1000

表 2. 实验试剂

试剂	厂家
PBS 磷酸盐缓冲液速溶颗粒	国药集团化学试剂有限公司
硝酸(优级纯)	国药集团化学试剂有限公司
硝酸(工艺超纯)	国药集团化学试剂有限公司
镍标准物质 GBWE08618	1000ug/mL

其它实验器材包括：塑料镊子、塑料锥形瓶、塑料容量瓶、离心管。所有容器在使用前均需仔细清洗。

2.3 试剂配制

PBS 缓冲溶液配制（参照《中国药典》2020 年版四部 3303 鼠源性病毒检查法）：1 包 PBS 磷酸盐缓冲液速溶颗粒溶于超纯水中，定容至 1L 容量瓶中，混匀。

2.4 实验过程



图 1. 静脉支架样品

(1) 对 3 个静脉支架编号并拍照留存后放入 250mL 的锥形瓶中（图 1）。

(2) 在 3 个装有静脉支架的锥形瓶及 1 个空白对照锥形瓶中各加入 250mL PBS 溶液，密封，然后置于恒温水浴振荡器上， $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ ，72rpm，往复回旋，一直振荡至预定时间。

(3) 振荡浸提至预定时间后，取出所有浸提液。清洗样品和容器后，加入同体积 250mL 的 PBS 溶液，按（2）重复操作。（浸提实验时间记录见表 3 和表 4）

(4) 将浸提液定量稀释后用 ICP-MS 基体匹配法测定其中的 Ni 离子浓度。

表 3. 浸提时间表

《GB/T16886.1》的 5.3 规定	本次选取时间天数（共 60d）				
	短期接触：在 24h 以内一次、多次或重复使用	1d	/	/	/
长期接触：在 24h 以上 30d 以内一次、多次或重复长期使用	2d	4d	7d	14d	21d
持久性接触：超过 30d 以上一次、多次或重复长期使用	30d	45d	60d	/	/

表 4. 浸提实验详细日期

浸提开始时间	浸提结束时间	Ni 测试日期	浸提容器及标识照片
2022.04.25	2022.04.26	2022.04.26	
2022.04.26	2022.04.27	2022.04.27	
2022.04.27	2022.04.29	2022.04.29	
2022.05.10	2022.05.13	2022.05.13	
2022.05.13	2022.05.20	2022.05.20	
2022.05.20	2022.05.27	2022.05.27	
2022.05.27	2022.06.05	2022.06.05	
2022.06.05	2022.06.20	2022.06.20	
2022.06.20	2022.07.05	2022.7.05	

3 实验结果与讨论

3.1 定量稀释比的确定

如前文所述，为获得尽可能好的检出限水平，所有浸提液先经过定量稀释后再进行测试。首先测定了不同稀释倍数下，基体匹配法对 Ni 离子的检出能力。结果如表 5 所示。

表 5. 镍离子在不同稀释条件下的检出限

PBS 稀 释倍数	PBS 对应浓 度[10 ⁻³ g/L]	Ni 浓度 [10 ⁻⁶ g/L]	相对标准 偏差	检出限 [10 ⁻⁶ g/L]	Ni 离子灵敏 [cps/(ng/mL)]
10	462	0.466	0.019	0.59	4163.3

8	578	0.368	0.010	0.24	3618.5
6	770	0.508	0.007	0.14	3624.1
4	1155	0.747	0.021	0.26	2277.7
2	2310	1.549	0.042	0.26	1462.2

由结果可知：PBS 稀释 6 倍时，获得最低方法检出限为 0.14ng/mL，可以满足静脉支架中镍离子释放的测试。在测试静脉支架中镍离子释放的浓度时，以每次的流程空白为基体，稀释 6 倍配制镍离子标准曲线，样品同时稀释 6 倍上机测试，计算静脉支架中镍离子释放的浓度。

3.2 浸提实验结果

样品每次浸泡镍离子的释放量 m ，数值以每天每立方厘米的微克数 $[\mu\text{g}/(\text{cm}^2 \cdot \text{d})]$ 表示：

$$m = \frac{v (c_1 - c_2)}{1000sd}$$

式中： m -样品每天每立方厘米的微克数 $[\mu\text{g}/(\text{cm}^2 \cdot \text{d})]$

V -浸提介质体积，mL；

s -样品测试面积， cm^2 ；

c_1 -样品浸提液中的镍离子浓度， $\mu\text{g/L}$ ；

c_2 -空白试样浸提液中的镍离子浓度， $\mu\text{g/L}$ ；

d -每次的浸提天数。

静脉支架 PBS 浸提实验参数见表 6，浸提液定量分析结果见表 7，换算到日平均释放量的结果见表 8。

表 6. 浸提实验参数

实验条件		样品信息及方法参数	
浸提温度	37°C	样品表面积	43.6 cm^2
振荡频率	72rpm	浸提液体积	250mL
实验室温度	20°C~23°C	浸提比例	0.174 cm^2/mL
实验室湿度	48%~73%	检出限	0.14ppb
振荡方式	往复回旋	定量限	0.42ppb

表 7. 浸提液测试结果 (10⁻⁶g/L)

时间	1#	2#	3#	4#BLK (空白对照)
1d	3.43	6.1	4.07	0.22
2d	3.08	5.27	3.65	0.23
4d	4.26	6.83	5.04	0.11
7d	3.99	5.48	4.68	0.18
14d	3.34	3.91	4.25	0.37
21d	2.16	2.4	2.63	0.75
30d	2.32	2.88	2.63	0.2
45d	3.12	3.64	3.35	0.09
60d	1.41	1.18	1.09	0.34

表 8. 镍离子日平均释放量 [μg/d]

日期	1#	2#	3#
1d	0.80	1.47	0.96
2d	0.71	1.26	0.86
4d	0.52	0.84	0.62
7d	0.32	0.44	0.38
14d	0.11	0.13	0.14
21d	0.05	0.06	0.07
30d	0.06	0.07	0.07
45d	0.05	0.06	0.05
60d	0.02	0.01	0.01

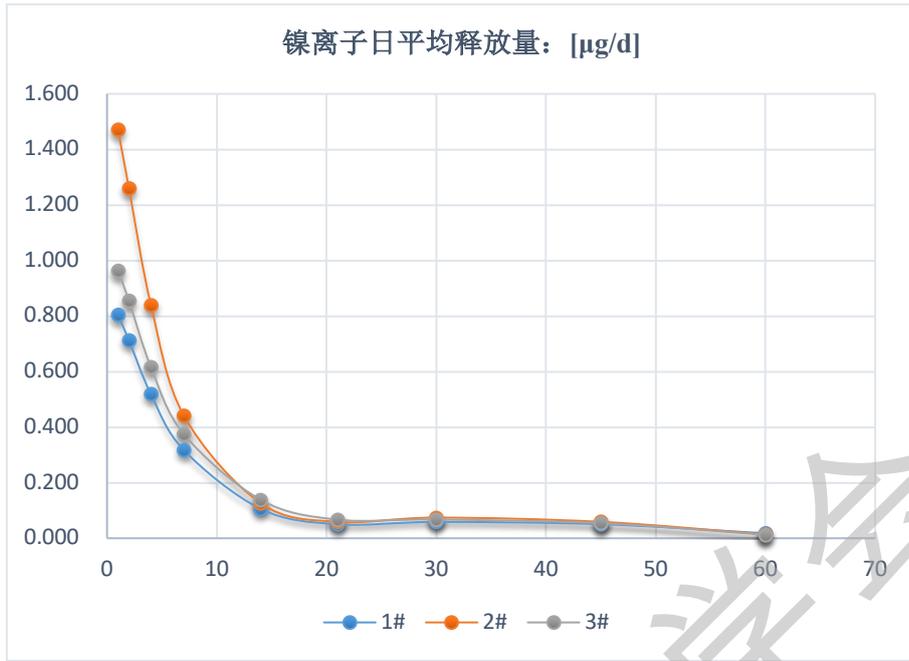


图 2. 镍离子日平均释放量曲线图

表 9. 镍每天每立方厘米的释放量 [$\mu\text{g}/(\text{cm}^2 \cdot \text{d})$]

时间	1#	2#	3#
1d	0.01843	0.03374	0.02210
2d	0.01635	0.02890	0.01962
4d	0.01190	0.01927	0.01414
7d	0.00728	0.01013	0.00860
14d	0.00243	0.00290	0.00318
21d	0.00115	0.00135	0.00154
30d	0.00135	0.00170	0.00155
45d	0.00116	0.00136	0.00125
60d	0.00041	0.00032	0.00029

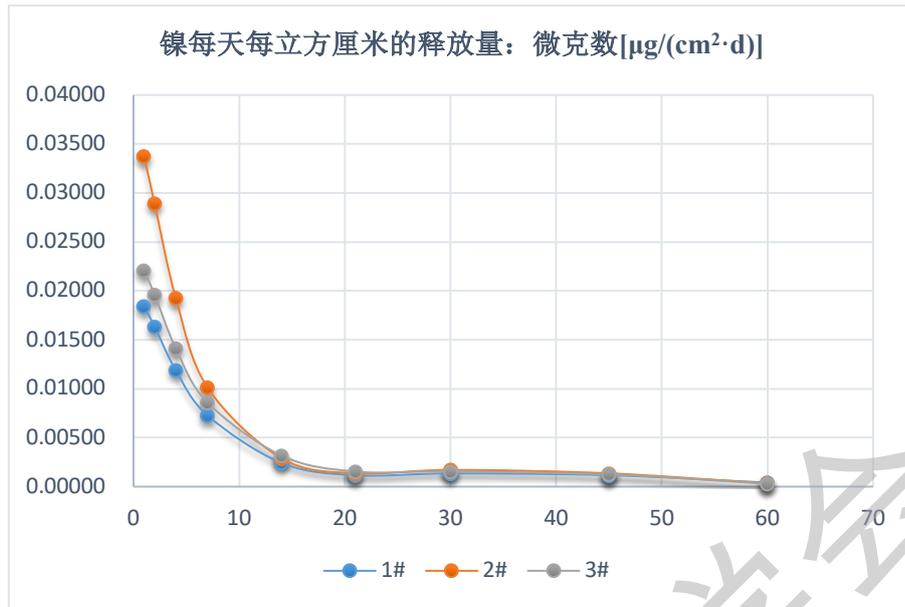


图 3. 镍每天每立方厘米的释放量曲线图

总累计镍释放量: 试验周期内镍离子的总累积释放量, 为每个时间点释放的镍离子的含量之和, 单位: μg 。

表 10. 总累积镍释放量 [μg]

日期	1#	2#	3#
1d	0.80	1.47	0.96
2d	1.52	2.73	1.82
4d	2.55	4.41	3.05
7d	3.51	5.74	4.18
14d	4.25	6.62	5.15
21d	4.60	7.03	5.62
30d	5.13	7.70	6.22
45d	5.89	8.59	7.04
60d	6.16	8.80	7.23

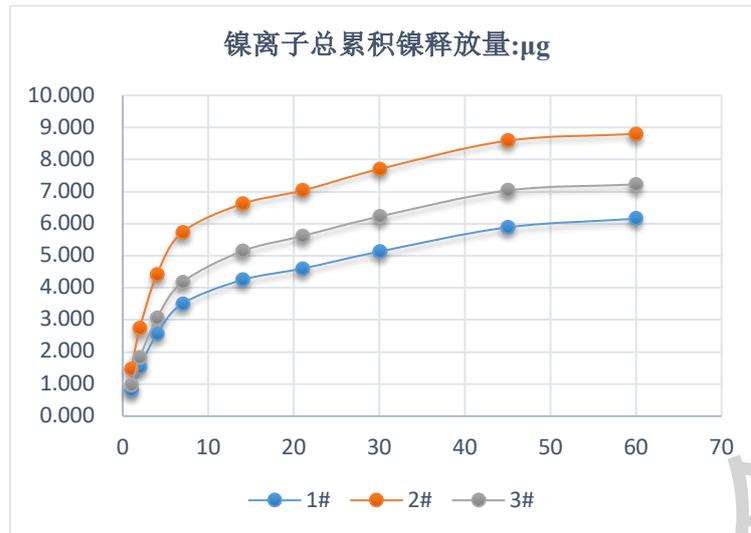


图 4. 总累积镍释放量曲线图

静脉支架属于持久类接触器械，必须满足持久类接触器械镍释放量的要求。本次实验的静脉支架镍离子日均释放量均小于 $7\mu\text{g}/\text{d}$ ；前 24h 释放总量小于 0.14mg ；前 30d 释放总量小于 0.21mg ；前 60d 释放总量小于 0.42mg 。

4 小结

随着现代医学的进步，植入疗法被广泛应用，各种植入材料被开发出来。但这些材料在临床前评价阶段，一般需通过建立体外释放模型进行人体释放的测定。这种评价实验由于周期长、受干扰因素多，需要高灵敏、高可靠性的实验方法。本工作建立的基于 ICP-MS 基体匹配法的镍合金静脉支架在模拟体液（PBS 溶液）中的释放规律的研究方法，有效消除了高盐溶液的基体效应对分析结果的影响，结果真实可靠，对其它植入材料的人体释放评价有广泛的借鉴意义。

参考文献：

- [1] Elkiran O, Karakurt C, Kocak G, et al. Serum Nickel and Titanium Levels after Transcatheter Closure of Atrial Septal Defects with Amplatzer Septal Occluder[J]. Cardiology Research and Practice, 2019, (2): 1-6.
- [2] 崔跃, 张宝祥, 马连彩, 等. 镍钛合金在医疗器械领域应用和表面改性研究进展[J]. 材料导报, 2017, 31(30): 197-200.
- [3] K S Cameron, V Buchner, P B Tchounwou. Exploring the Molecular Mechanisms of Nickel-induced Genotoxicity and Carcinogenicity: A Literature Review[J]. Reviews on Environmental

Health,2011,26(2):81-92.

- [4] Titanium Levels after Transcatheter Closure of Atrial Septal Defects with Amplatzer Septal Occluder[J]. *Cardiology Research and Practice*,2019,(2):1-6.
- [5] 国家药品监督管理局. 心血管植入物 镍钛合金镍离子释放试验方法: YY/T 1823-2022[S]. 北京: 中国标准出版社, 2022.
- [6] Samitz MH, Katz SA. Nickel dermatitis hazards from prostheses[J]. *Br J Dermatol*,1975, 92(3): 287-290.
- [7] Burrows D, Cresswell S, Mereu JD. Nickel, hands and hipprostheses[J]. *Br J Dermatol*, 1981, 105(4): 437-444.
- [8] Merritt K, Brown SA. Metal sensitivity reactions to orthopedic implants[J]. *Int J Dermatol*, 1981, 20(2): 89-94.
- [9] Werner Geurtsen. Biocompatibility of dental casting alloys[J]. *Crit Rev Oral Biol Med*, 2002, 13(1): 71-84.

中国仪器仪表学会