

## Analysering af titanium i serum med ICP-MS

Studerende har i bachelorprojekt som de første i Danmark påvist, at det er muligt at analysere titanium i serum med samme teknik, som bruges til at måle krom og kobolt i vævet hos patienter med implantater

Denne artikel beskriver et bachelorprojekt udført på Klinisk Immunologisk og Biokemisk Afdeling, Vejle Sygehus.

Der har det seneste år har været megen snak om implantater, der indeholder krom og kobolt, de såkaldte MoM (metal on metal)-hofter. Disse implantater blev mistænkt for at frigive krom og kobolt til det omkringliggende væv. Derfor indførte bestyrelserne for Dansk Ortopædisk Selskab samt Dansk Selskab for Hofte- og Knæalloplastikkirurgi et udredningsprogram for patienter med disse implantater, der kræver gentagne målinger af krom og kobolt ved hjælp af Inductively Coupled Plasma – Mass Spectrometry, ICP-MS (1). Da titanium også bruges til fremstilling af implantater, ville det være interessant at finde ud af, om det er muligt ved hjælp af samme teknik at analysere titanium i serum for derved at kunne opnå viden om, hvorvidt titanium frigives til det omkringliggende væv.

### Titanium

Titanium er grundstof nummer 22. Det er et stærkt og holdbart metal med en lille massefylde. Det er lige så stærkt som stål, men vejer 45 % mindre. Titanium findes dog ikke på metalform i naturen, men hovedsageligt som titaniummineraleerne ilmenit og rutil (2).

Størstedelen af mineralet rutil består af titaniumdioxid, TiO<sub>2</sub>. Dette bruges til at give hvid pigment i blandt andet maling, plast, papirer og mad, her har det nummer E171. Titaniumdioxid er godt til at blokere lys og de farlige ultraviolette stråler fra solen, derfor bruges det også i solcreme.

Når rent titanium udsættes for ilt, O<sub>2</sub>, dannes der et tyndt lag titaniumdioxid på overfladen af metallet. Dette tynde lag titaniumdioxid beskytter mod yderligere reaktion med ilt og gør, at metallet kan modstå de fleste ætsende kemikalier. Endvidere kan dette lag reparere sig selv, hvis det bliver beskadiget (2).



Af bioanalytiker //  
**Susan Peyk Sørensen**  
Klinisk Biokemisk afdeling,  
Haderslev sygehus

### Titanium i implantater

Biomaterialer er materialer, der er specialiseret til brug som erstatning for kropsdele. Dette er et vigtigt område, da disse biomaterialer er med til at forbedre livskvaliteten og levetiden for mennesker. Inden for hofteimplantater findes der forskellige typer af implantater, eksempelvis keramik-keramik og MoM. Siden 1930'erne har krom-kobolt-legeringer været brugt, og i 2006 udgjorde de en stor del af de anvendte ortopædiskirurgiske implantater (3, 4).

Implantater skal kunne holde længe uden at blive afstødt af kroppen, og derudover skal de have bestemte egenskaber. Der stilles krav til de mekaniske egenskaber, biokompatibiliteten, knogleintegration, og så skal materialet have høj slidstyrke og korrosionsresistens (3).

Titanium er særdeles biokompatibelt, hvilket vil sige, at det ikke er toksisk for kroppen, og desuden har titanium en høj korrosionsresistens. Derudover er titaniums evne til at modstå elastisk deformation tættere på knoglers evne end andre implantatmaterialer, hvilket betyder mindre stress og belastning omkring implantatet. Som tidligere skrevet, reagerer titanium med ilt, og der vil derfor altid forekomme en stabil oxidoverflade på titaniumimplantatet ved klinisk brug. Det betyder, at vævet omkring implantatoverfladen er eksponeret for en titanium oxidoverflade og ikke direkte for titaniummetallet (4).

### Analyseprincip

Til forsøget blev der brugt analyseprincippet ICP-MS, Inductively Coupled Plasma – Mass Spectrometry (iCAP Q fra Thermo Scientific).

I ICP-delen genereres en plasma, der når temperaturer mellem 5.000 og 9.000 °C, ud fra argon. Prøvematerialet føres igennem den varme plasma, hvorved prøvematerialet adskilles i atomer og ioniseres. For at eliminere interfererende stoffer bruges der en kollisioncelle, hvor teknikken Kinetic Energy Discrimination, KED, benyttes. Denne teknik gør brug af den inaktive gas helium, som kolliderer med polyatomiske molekyler, således at disse ikke kommer med videre i quadropolen, hvor ionerne sorteres ud fra forholdet mellem masse og ladning. Ionerne detekteres ved hjælp af en elektron-multiplier-detektor (5).

Titanium findes som flere forskellige isotoper, se i tabel 1 for deling af isotopernes forekomst. Desværre er der flere af dis-

se isotoper, der har samme vægt som isotoper af andre grundstoffer, som derfor kan interferere (6).

Det kan ses i tabel 1, at den hyppigst forekommende isotop  $^{48}\text{Ti}$  interfereres af calcium, der gør det umuligt at analysere på  $^{48}\text{Ti}$ . I stedet blev benyttet  $^{47}\text{Ti}$  og  $^{49}\text{Ti}$ .

**TABEL 1** fordelingen af titaniumisotopers forekomst og interferenser (7)

Isotop	Forekomst	Interferenser
$^{46}\text{Ti}$	8,25 %	$\text{NO}_2$
$^{47}\text{Ti}$	7,44 %	$\text{PO}$ , $\text{NO}_2\text{H}$
$^{48}\text{Ti}$	73,72 %	$\text{Ca}$ , $\text{SO}$
$^{49}\text{Ti}$	5,41 %	$\text{CaH}$ , $\text{SO}$ , $\text{SOH}$
$^{50}\text{Ti}$	5,18 %	$\text{SO}$ , $\text{SOH}$ , $\text{Cr}$

### Metode

Til at bestemme, om titanium kunne analyseres på iCAP Q, blev der udvalgt parametre fra Klinisk Immunologisk og Biokemisk Afdelings skabelon for metodevalidering.

Korrekthed er bestemt ved hjælp af genfindingsforsøg, hvor en serumpool blev spiket i fire niveauer. De spikede prøver samt en uspiket prøve blev analyseret syv gange i syv analyseserier.

Intermediær præcision blev bestemt ved analyse af fire forskellige kontroller. Der blev analyseret over ni dage i 11 analyseserier.

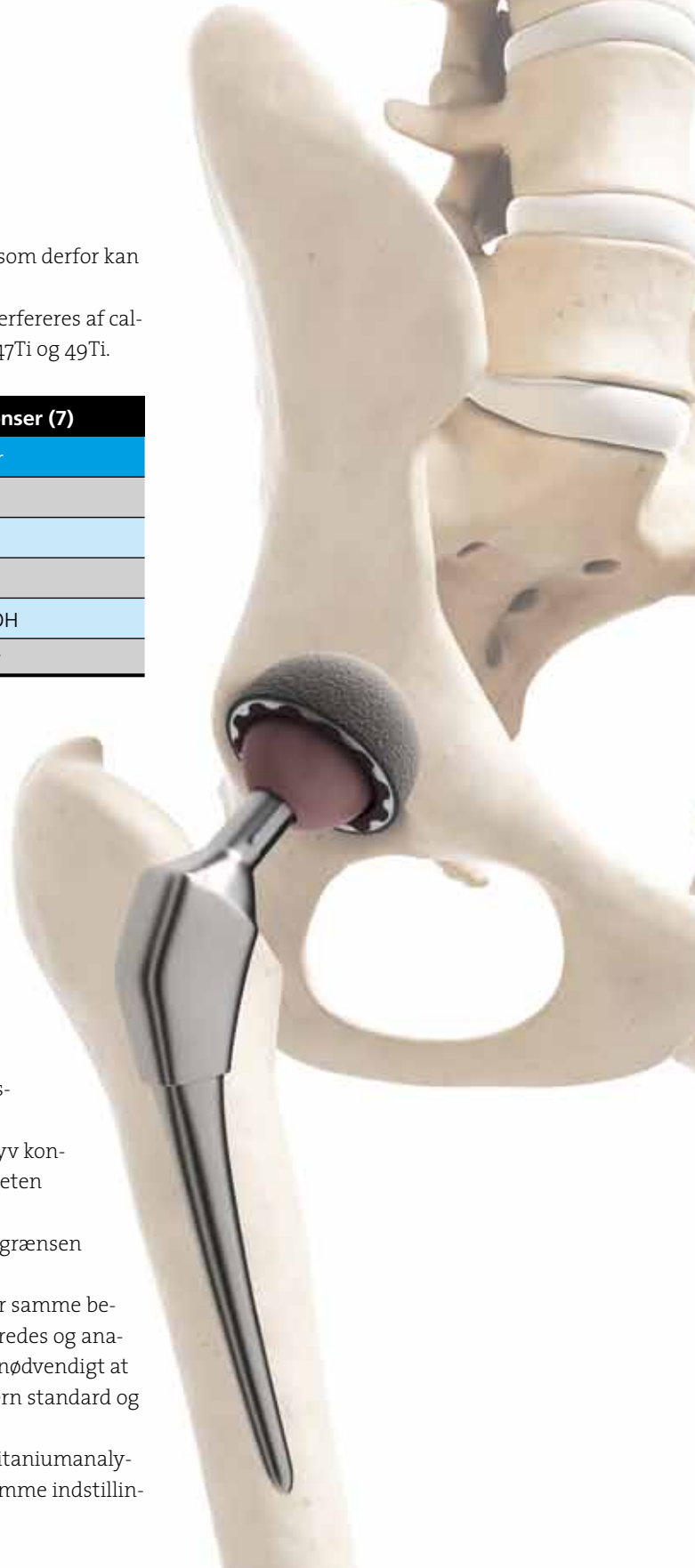
Kvantifikationsgrænsen blev bestemt gennem en præcisionsprofil, hvor serum med kendt titaniumkoncentration blev fortyndet i tre niveauer. Der blev analyseret 10 gange i én analyseserie. Kvantifikationsgrænsen er fastsat som den koncentration, hvor CV-% var maks. 20.

Lineariteten blev vurderet ud fra målinger på serumkalibratorer i syv koncentrationsniveauer, analyseret i 11 analyseserier over 9 dage. Lineariteten blev vurderet visuelt ud fra XY-plot og tilhørende tendenslinjer.

Måleintervallet blev fastsat som intervallet mellem kvantifikationsgrænsen og øverste grænse for lineariteten.

Inden forsøgets start var håbet, at titanium kunne analyseres under samme betingelser som krom og kobolt, således at alle tre analyser kunne forberedes og analyseres samtidigt. Dog viste det sig ved første analyseserie, at det var nødvendigt at ændre på fortyndingsforholdet mellem galliumopløsningen som intern standard og prøveserum.

Krom- og koboltprøver fortyndes 1+19, dette blev ændret til 1+9 til titaniumanalysen for at få bedre signal. Derudover blev titanium analyseret med samme indstillinger som krom og kobolt.



I tabellen ses de samlede **RESULTATER** fra valideringen af titaniumanalysen.

	Valideringsresultater				Krav til resultatet
	Seronom L1	Seronom L2	Lav kontrol	Genfinding 100	
Intermediær præcision	8,6 %	10,2 %	10,2 %	6,0 %	CV på maks. 10 %
Korrekthed (genfinding)	20 nmol/l	50 nmol/l	100 nmol/l	200 nmol/l	Bias på maks. 15 %
	14,5 %	13,6 %	5,1 %	12,6 %	
Kvantifikationsgrænse	5 nmol/l	10 nmol/l	20 nmol/l		CV på maks. 20 %
	24 %	21 %	13 %		
Linearitet					Vurderes visuelt
Måleinterval	20 – 383,7 nmol/l				

## Diskussion

Forsøgsperioden lå midt i en periode med ombygning af laboratoriet. Dette betød blandt andet, at apparaturet blev flyttet. Da titanium findes mange steder i omgivelserne, kan ombygningen muligvis have været årsag til noget forurening.

Inden forsøget blev der søgt information om, hvilken isotop der ville være mest anvendelig at analysere til formålet. Ud over videnskabelige artikler var der kontakt med Thermo Scientific for at høre, om det efter deres mening overhovedet ville være muligt at analysere titanium på deres apparatur, og hvilken isotop der eventuelt ville være bedst. Ud fra råd fra firmaet samt de fundne artikler valgte vi  $^{47}\text{Ti}$  og  $^{49}\text{Ti}$ . Derfor blev apparatet sat op til det, men for interessens skyld blev det også sat op til at analysere  $^{48}\text{Ti}$ , da dette ikke ville tage længe tid at analysere, og det ville være spændende at se, hvilken betydning calcium ville have. Derudover ville det være mest optimalt at kunne analysere på den hyppigst forekommende isotop. Allerede ved første serie stod det klart, at analysering på  $^{48}\text{Ti}$  var umuligt, selvom der i opsætningen var mulighed for at bede apparaturet om at tage højde for calciuminterferensen ved samtidig at måle en anden calciumisotop.  $^{48}\text{Ti}$ 's kalibreringskurve var nærmest vandret, på grund af at calciumindholdet er meget højere end titaniumindholdet i prøverne, og korrektionen derfor er alt for upræcis.

$^{49}\text{Ti}$  i dette forsøg viste ret hurtigt tegn på at være ustabil, og efter 5 serier varierede det beregnede o-punkt med næsten 30 %, mens  $^{47}\text{Ti}$  var stabil.

Inden forsøgets start var det planen at lave metodesammenligning, men da analysen ikke bliver lavet nogen steder i Danmark, har det ikke været muligt at sammenligne med et andet laboratorium. Derfor blev det undersøgt, om der fandtes en ekstern kvalitetskontrol for titanium, som kunne fungere som metodesammenligning, men det gjorde der ikke. At der ikke findes en ekstern kvalitetskontrol, er problematisk, da der ikke er nogen sikkerhed for, at resultater fra forskellige laboratorier kan sammenlignes. Denne problematik har også givet sig til udtryk i de fundne artikler, hvor der er stor uenighed om, hvor normalniveauet er.

En artikel har analyseret  $^{47}\text{Ti}$  på en kontrolgruppe og på personer med titaniumimplantater. I kontrolgruppen var middelværdien under 8 nmol/l, og i den anden gruppe lå den på ca. 125 nmol/l (8). En anden artikel skriver, at normalniveauet for titanium i serum er mindre end 3,133 nmol/l (9). Denne sidste kilde oplyser ikke, hvilken isotop de har analyseret på, hvilket gør artiklen mindre troværdig, da det ikke er muligt at finde ud af, hvordan resultaterne er fremkommet.

Kalibratorernes niveau blev baseret på artiklen med det lave niveau, da der var endnu en artikel (10), der havde titaniumkoncentrationer i dette område, og de to købte kontroller til krom og kobolt havde ift. indlægssedlen anslåede titaniumværdier på henholdsvis 234 og 270 nmol/l. Vores resultater var henholdsvis 296 og 328 nmol/l, hvilket afviger 26,6 og 21,5 % fra den angivne værdi.

## Konklusion

Før forsøgets start var der ingen, der vidste, om det var muligt at bruge iCAP Q til analysering af titanium i serum. Formålet

med forsøget var derfor at finde ud af, om dette er muligt, og hvilken metodeopsætning der skulle bruges. Forsøget har vist, at det er muligt at analysere titanium i serum. Til trods for at apparatet blev flyttet i forsøgsperioden, opfylder analysen kravene til metodevalidering på Klinisk Immunologisk og Biokemisk Afdeling, Vejle Sygehus, dog med en bemærkning om, at der skal holdes øje med, at afvigelsen på intermedieær præcision falder til maks. 10 % inden for overskuelig fremtid.

Inden analysen kan tages i brug, er det nødvendigt at udføre en fuld metodevalidering.

## Tak

En kæmpe tak til gruppen af bioanalytikere i lægemidler og metabolitter på Klinisk Immunologisk og Biokemisk Afdeling, Vejle Sygehus for godt samarbejde, for at måtte lave projektet hos dem og for deres fantastiske opbakning. En tak til laborant Louise Bogh-Neilsen for fremstillingen af nogle reagenser til projektet. Tak til superbrugeren af iCAP Q, bioanalytiker Berit B. Jørgensen, der har stået til rådighed med vejledning i brugen af apparatet. En særlig tak til afdelingens utrættelige kemiker, Anne V. Schmedes, der har fulgt projektet hele vejen og stillet sin store ekspertise og erfaring til rådighed. Derudover tak til de frivillige personer på KIBA, der har doneret serum til projektet.

Alle har vist stor begejstring og interesse for projektet, hvilket har været til stor inspiration under udførelsen af projektet.

En særlig stor tak til min medstuderende, Helga Blohm, for godt samarbejde i alle projektets fællesfaser.

Selvfølgelig også en tak til vejlederne Henrik Pedersen (UC Syd) og Helene Bundgård (Vejle Sygehus) for godt samarbejde.

1. DANSK ORTOPÆDISK SELSKAB OG DANSK SELSKAB FOR HOFTE- OG KNÆALLOPLASTIKKIRURGI. METAL-METAL (MOM) - UDREDNINGSPROGRAM FOR PATIENTER MED MOM [INTERNET]. 2012 FEB. AVAILABLE FROM: [HTTP://WWW.ORTOPAEDI.DK/FILEADMIN/REFERENNCIPROGRAM/METAL-METAL/UDREDNINGSPROGRAM\\_MOM\\_DSO\\_DSHK\\_2-3-2012.PDF](http://www.ortopaedi.dk/fileadmin/referennciprogram/metal-metal/udredningsprogram_mom_dso_dshk_2-3-2012.pdf).
2. HENRIKSEN, H., PAWLIK, E. BOGEN OM GRUNDSTOFFERNE. [KBH.]: GYLDENDAL; 2006.
3. GEETHA, M., SINGH, A.K. ET AL. TI BASED BIOMATERIALS, THE ULTIMATE CHOICE FOR ORTHOPAEDIC IMPLANTS – A REVIEW. PROGRESS IN MATERIALS SCIENCE. 2009 MAY; 54(3): 397-425.
4. DANSK ORTOPÆDISK SELSKAB & DANSK SELSKAB FOR HOFTE- OG KNÆALLOPLASTIKKIRURGI. TOTAL HOFTEALLOPLASTIK. 2006 [CITED 2012 NOV 19]; AVAILABLE FROM: [HTTP://ORTOPAEDI.DK/FILEADMIN/REFERENNCIPROGRAM/THA-REFERENCEPROGRAM.PDF](http://ortopaedi.dk/fileadmin/referennciprogram/tha-referenceprogram.pdf).
5. THERMO FISHER SCIENTIFIC. THERMO SCIENTIFIC iCAP Q ICP-MS [INTERNET]. THERMO FISHER SCIENTIFIC; 2012 [CITED 2012 NOV 22]. AVAILABLE FROM: [HTTPS://STATIC.THERMOSCIENTIFIC.COM/IMAGES/D20722~.PDF](https://static.thermoscientific.com/images/d20722~.pdf).
6. MAY, T.W., WIEDMEYER, R.H. A TABLE OF POLYATOMIC INTERFERENCES IN ICP-MS. ATOMIC SPECTROSCOPY. 1998 SEP; 150-5.
7. NELMS, S. TRACE MEASUREMENT OF TI IN SERUM USING THE iCAP Q ICP-MS. THERMO FISHER SCIENTIFIC; 2012.
8. NUEVO-ORDÓÑEZ, Y., MONTES-BAYÓN, M. ET AL. TITANIUM RELEASE IN SERUM OF PATIENTS WITH DIFFERENT BONE FIXATION IMPLANTS AND ITS INTERACTION WITH SERUM BIOMOLECULES AT PHYSIOLOGICAL LEVELS. ANALYTICAL AND BIOANALYTICAL CHEMISTRY. 2011 JUL 23; 401(9): 2747-54.
9. MCGARRY, S., MORGAN, S.J. ET AL. SERUM TITANIUM LEVELS IN INDIVIDUALS UNDERGOING INTRAMEDULLARY FEMORAL NAILING WITH A TITANIUM IMPLANT. THE JOURNAL OF TRAUMA: INJURY, INFECTION, AND CRITICAL CARE. 2008 FEB; 64(2): 430-3.
10. RYLANDER, L.S., MILBRANDT, J.C., ET AL. TRACE METAL ANALYSIS FOLLOWING LOCKED VOLAR PLATING FOR UNSTABLE FRACTURES OF THE DISTAL RADIUS. IOWA ORTHOP J. 2010; 30: 89-93.