

# 金属系生体材料評価のための溶出試験における疑似体液中微量元素の分析<sup>\*1</sup>

芦野 哲也<sup>1,\*2</sup> 大津直史<sup>2</sup> 我妻和明<sup>1</sup>

<sup>1</sup>東北大学金属材料研究所

<sup>2</sup>北見工業大学機器分析センター

J. Japan Inst. Metals, Vol. 73, No. 9 (2009), pp. 728-731

© 2009 The Japan Institute of Metals

## Trace Analysis of Released Metallic Ions in Static Immersion Test for Characterization of Metallic Biomaterials

Tetsuya Ashino<sup>1,\*2</sup>, Naofumi Ohtsu<sup>2</sup> and Kazuaki Wagatsuma<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute for Material Research, Tohoku University, Sendai 980-8577

<sup>2</sup>Instrumental Analysis Center, Kitami Institute of Technology, Kitami 090-8507

For characterization of corrosion resistance of metallic biomaterials, determination of trace amounts of metallic ions released from the materials in static immersion into simulated body fluids were investigated. In a pre-treatment method by sulfuric acid, sensitive, precise and accurate determination of the trace metallic elements in simulated body fluids could be performed by an inductively coupled plasma-optical emission spectrometry. For accurate analysis, it was necessary to employ a matrix-matched solution for the calibration. Moreover, usage of a vessel made of tetrafluoro ethylene-perfluoro alkylvinyl ether copolymer in the static immersion test was recommended for the prevention of contamination. Thus, it was possible to determine  $\mu\text{g dm}^{-3}$  order of elements in simulated body fluids and evaluate nano-gram order of the released metallic ions.

(Received April 13, 2009; Accepted June 8, 2009)

**Keywords:** metallic biomaterials, static immersion test, inductively coupled plasma-optical emission spectrometry, simulated body fluid

## 1. 緒 言

人工歯根、顎補綴プレート、人工関節の骨頭及びシステム等、骨埋入材料及び硬組織代替材料としての生体材料の研究は医学的に非常に必要性が高いものである。現在、生体材料として金属、セラミックス、高分子材料等が使用されている。その中で、セラミックス、高分子材料は生体機能性を付与することが容易であるが、機械的強度に問題がある。それに対し金属材料は機械的強度にも優れており、これらの部位には金属材料の使用が必須となっている。しかし、金属系生体材料が長時間体内に埋め込まれた場合、生体内において金属イオンの溶出が起こることが考えられる。その上金属イオンの種類によっては、極微量でもアレルギー発症、発癌、催奇形、炎症等の原因となることが指摘されている<sup>1-6)</sup>。従って、高い耐食性を持った金属系生体材料が求められており、その研究・開発を支える上で耐食性評価方法の確立は必要不可欠である。

金属系生体材料の耐食性評価方法として、使用環境を考慮し体内環境を模擬する生理食塩水、緩衝生理的塩類溶液、細胞培養液、血清水溶液、人工唾液等の疑似体液中に試料を一定

期間浸漬した後、溶液内に溶出した金属イオン濃度を定量する方法(浸漬実験)が用いられている。その浸漬実験において溶出した金属イオン量を評価するためには  $\mu\text{g dm}^{-3}$ (ppb)レベルの疑似体液中金属イオンの定量分析が必要であり、ICP-OES(Inductively Coupled Plasma-Optical Emission Spectrometry: 誘導結合プラズマ発光分光法)や ICP-MS(Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry: 誘導結合プラズマ質量分析法)が用いられている<sup>6,7)</sup>。

ICP-OESは、多元素同時分析が可能なことや検量線直線範囲(ダイナミックレンジ)が広いことなどの利点がある反面、試料溶液に含まれるマトリックス成分や試料溶液の粘性が分析値への影響を及ぼすことが知られている<sup>8,9)</sup>。疑似体液は、NaClやKClなどのアルカリ金属塩類やアミノ酸やグルコースなどの有機物を多量に含有しており、かつpHが7から8前後の粘性を持った溶液である。このことは、ICP-OES分析の精確さ並びに感度に対し大きな影響を及ぼすことが考えられる。従って疑似体液中微量金属元素を高精度かつ高感度に分析するためにも適切な疑似体液の試料前処理方法の確立は極めて重要である。しかし、日本工業規格(JIS)<sup>7)</sup>において試料前処理法は規定されていない。

一方化学分析において、試薬や実験器具からの分析元素の混入(コンタミネーション)が測定ブランク値の上昇や分析値に対する誤差要因となる<sup>10)</sup>。従って、浸漬実験に用いられ

<sup>\*1</sup> Mater. Trans. 49(2008) 1342-1345 に掲載

<sup>\*2</sup> Corresponding author, E-mail: ayustet@imr.tohoku.ac.jp

る試薬や実験器具に起因する混入元素量の評価<sup>11,12)</sup>や、その低減方法の検討も高精度かつ高感度な分析値を得るためには必要である。

著者らは、簡便で高精度かつ高感度な ICP-OES による疑似体液中微量元素の分析法を確立するため、硫酸白煙処理による試料前処理法の検討を行った<sup>13)</sup>。本法により、試料溶液を酸性にすること、粘性を低下させること、及び含有有機化合物を除去することができ、疑似体液中  $\mu\text{g dm}^{-3}$  オーダーの金属元素の分析が可能となる。本研究では、試料溶液に含有する主成分元素である Na と、浸漬実験における分析元素のコンタミネーションの ICP-OES による疑似体液中微量元素分析への影響を検討した。また、金属試料を乳酸溶液に浸漬させ溶出した金属元素の分析を行った。

## 2. 実験

### 2.1 分析装置と実験器具

ICP-OES 分析装置は、Thermo Fisher Scientific, Inc. 製 IRIS Advantage DUO を使用した。装置の使用条件と分析に用いた発光線を Table 1 に示す。内標準元素として Y を使用し<sup>8,14)</sup>、内標準ミキシングキットを用いて ICP-OES 分析を行った<sup>15)</sup>。試料前処理には、石英ビーカーとハロゲンランプヒーターを使用した。また、浸漬実験にはヤマト科学製恒温槽と PFA(テトラフルオロエチレン・パーフルオロアルキルビニルエーテル共重合体)容器を使用した。

### 2.2 試薬

試料前処理には和光純薬製電子工業用硫酸及び硝酸を、疑似体液調製には、ナカライテック製特級試薬を用いた。また溶液調製用の水は、Millipore 製超純水製造装置を用いて精製した。分析元素標準溶液 ( $1 \text{ g dm}^{-3}$ ) は、99.9%以上の純度を持つ純金属や化合物を適宜、酸に溶解して調製した。浸漬実験に用いた疑似体液は、HBSS(ハンクス緩衝塩類溶液)、PBS(-)(リン酸緩衝塩類溶液)、E-MEM(イーグル細胞培養液)及び 1%乳酸溶液で、それぞれ用時試薬を水に溶解して調製した<sup>13)</sup>。

### 2.3 浸漬実験用供試材

浸漬実験には、住友金属工業製 Ti-6Al-4V 合金とニラコ製 SUS 316 を使用した。供試材は  $10.0 \text{ mm} \times 10.0 \text{ mm} \times 1.0 \text{ mm}$  に切断し、使用直前に 1200 番エメリー紙で研磨した後、エタノール中で超音波洗浄を行った。

### 2.4 試料前処理方法

疑似体液  $25 \text{ cm}^3$  を石英ビーカーに正確に量り取り、そこへ硫酸  $2.5 \text{ cm}^3$  を添加する。この溶液を硫酸の白煙が生じるまで加熱する。E-MEM 及び 1%乳酸溶液の前処理には、更に硝酸  $25 \text{ cm}^3$  を添加し、硫酸の白煙が生じるまで加熱する。その後、時計皿でビーカーにふたをして有機物が完全に分解するまで加熱を続ける。この溶液を室温まで冷却後メスフラスコに移し、水で正確に  $25 \text{ cm}^3$  に希釈する。この溶液を Table 1 に示した条件で ICP-OES 測定を行う。

## 3. 結果と考察

### 3.1 主成分元素の ICP-OES 分析に及ぼす影響

疑似体液には、NaCl, KCl,  $\text{CaCl}_2$  のようなアルカリ金属塩やアルカリ土類金属塩が多量に含まれている。そこで著者らは主成分元素である Na の ICP-OES 分析に及ぼす影響について調査した。試料溶液として疑似体液と同等濃度となる  $8 \text{ g dm}^{-3}$  (0.8%) の NaCl と、 $2 \text{ mg dm}^{-3}$  (ppm) の各分析元素 (Ti, Ca, Fe, Cr, Ni, Al, Co, Mo, V, Zn, Pd, Pt, Au) を含んだ溶液を調製し、各元素の発光強度を測定した。各元素の発光強度と発光強度比(元素/Y)を Fig. 1 に示す。なお、発光強度及び発光強度比は NaCl を含まない場合を 1 として規格化した。

各元素の発光強度は、Al と Pd については 1 以上、これらを除いては 1 以下であった。また Y を用いた内標準法による補正を行った場合、Au, Ca, Cr, Ti, V, Zn についてのみ発光強度比が約 1 となり、これらの元素に対してのみ補正可能であることがわかった。このことから、疑似体液と同等濃度の Na は ICP-OES における分析線の発光強度に影響を及ぼし、精確な分析を行うためにはマトリックス・マッチングした検量線作成用標準溶液が必要となることがわかった。

Table 1 Operating conditions of instrument and spectral lines.

Instrument		IRIS Advantage DUO (Thermo Fisher Scientific, Inc.)								
Plasma conditions										
RF frequency		27.12 MHz								
RF power		1.15 kW								
Argon gas flow rate										
Plasma gas		15 L min <sup>-1</sup>								
Auxiliary gas		0.5 L min <sup>-1</sup>								
Nebulizer gas		1.9 × 10 <sup>5</sup> Pa								
Wavelength		Ca	II	393.366 nm	Mo	II	204.598 nm	Au	I	242.795 nm
		Ti	II	338.376 nm	Al	I	396.152 nm	Nb	II	316.340 nm
		Fe	II	238.204 nm	V	II	311.071 nm	Ta	II	240.063 nm
		Cr	II	283.563 nm	Zn	II	213.856 nm	Zr	II	343.823 nm
		Ni	II	231.604 nm	Pd	I	360.955 nm	Y	II	224.306 nm
		Co	II	238.892 nm	Pt	II	214.423 nm		II	371.030 nm

(as Internal)

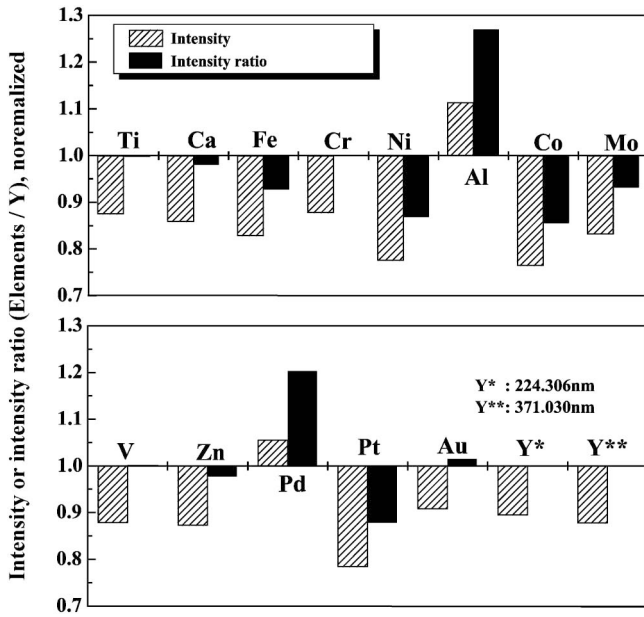


Fig. 1 Intensity and intensity ratio of analyte elements by ICP-OES in  $8 \text{ g dm}^{-3}$  NaCl solution: Both the intensities and the intensity ratios are normalized as unity when containing no NaCl.

一方 K や Ca については、疑似体液と同等濃度において発光強度及び発光強度比に対し影響は見られなかった。このことから疑似体液中微量元素分析において、ICP-OES 分析に及ぼす主成分元素の影響については Na のみを考慮すればよいといえる。また ICP-OES 分析において、硫酸濃度は測定感度に影響を及ぼす<sup>16)</sup>。従って、2.3 項で述べた硫酸白煙-試料前処理法を用いて ICP-OES 分析を行うためには、硫酸濃度は  $1.8 \text{ mol dm}^{-3}$ 、Na 濃度は NaCl 換算で  $8 \text{ g dm}^{-3}$  となるようにマトリックス・マッチングした検量線作成用標準溶液を調製すればよいことがわかった。

### 3.2 浸漬実験用疑似体液に含有する元素の分析

浸漬実験により正確な溶出金属イオン量評価を行うためには、使用する疑似体液について、測定ブランク値に相当する含有する分析元素濃度をあらかじめ評価することが必要である。そこで著者らは調製した 4 種類の疑似体液に含有する元素を分析した。疑似体液に含有する各元素濃度を Fig. 2 に示す。

著者らが調製した疑似体液から  $\mu\text{g dm}^{-3}$  オーダーの Al, Ca, Co, Cr, Fe, Mo, Ni, V, Zn が検出された。これらの元素は、元来水や試薬に含まれているもの、並びに溶液調製の際に実験環境から混入したものと考えられる。一方 Au, Nb, Pd, Pt, Ta, Ti, Zr は検出されなかった。このことから、疑似体液を調製する際には分析元素の混入を最小限にする必要があり、調製用の水や試薬のチェックや管理、実験環境の清浄に保つことが重要である。

### 3.3 実験器具に起因するコンタミネーションの影響

浸漬実験では疑似体液を密閉容器に入れて長期間放置する。このため使用する容器から分析元素が混入することが予

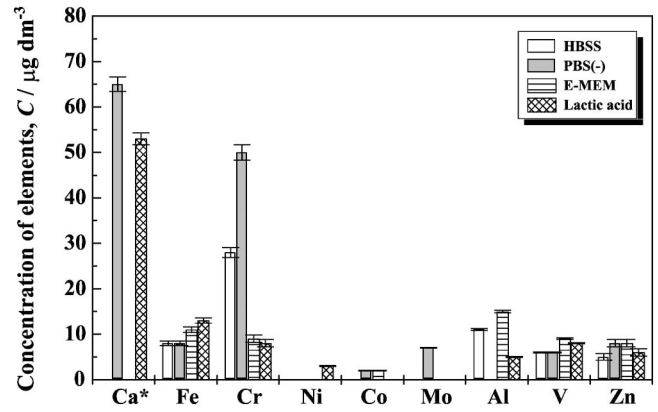


Fig. 2 Concentration of elements in SBFs: Ca\* in HBSS and E-MEM is  $\text{g dm}^{-3}$  order.

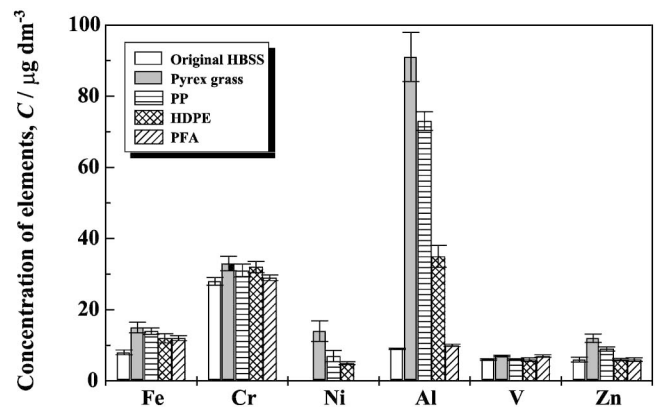


Fig. 3 Concentration of elements in HBSS after leaving.

想される。そこで著者らは材質の違いによる容器からの分析元素の混入について調査した。使用した容器の材質は、Pyrex<sup>®</sup> (ホウケイ酸ガラス)、PP (ポリプロピレン)、HDPE (高密度ポリエチレン) 及び PFA である。あらかじめ硝酸及び水に漬け置き洗浄したこれらの容器に HBSS を入れ、恒温槽内に 310 K で 20 日間放置した後 HBSS に溶出した元素を分析した。放置前と放置後に HBSS に含有される各元素濃度を Fig. 3 に示す。

Pyrex, PP, HDPE 容器を用いた場合、Al, Cr, Fe, Ni, Zn は濃度の上昇が見られ、放置中に容器から混入したと考えられる。特に Pyrex における Al 濃度の上昇は顕著であり、また Ni は放置前の HBSS から検出されなかったのに対し、放置後は  $\mu\text{g dm}^{-3}$  オーダーの Ni が検出された。一方、V は放置前後で濃度が変化しなかったことから容器から V の混入はないと考えられる。

ところが PFA 容器を用いた場合、各分析元素の混入はほとんど見られなかった。このことから著者らは、浸漬実験において正確な溶出元素量評価のためにも分析元素の混入のほとんどない PFA 容器の使用を推奨する。

### 3.4 浸漬実験において供試材から溶出した元素の分析

著者らは、Ti-6Al-4V 合金と SUS 316 を用いて浸漬実験を行い、供試材から溶出した元素の分析を行った。PFA 容

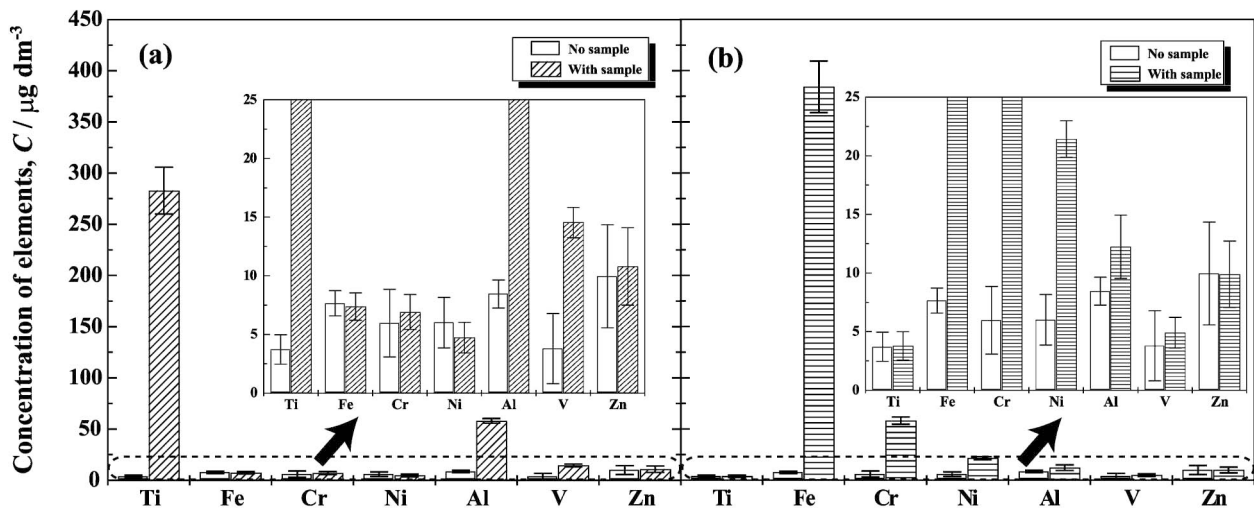


Fig. 4 Concentration of elements released in lactic acid after static immersion test (a) Ti-6Al-4V, (b) SUS 316.

器に1%乳酸溶液を25 cm<sup>3</sup>添加し、そこへこれらの供試材をそれぞれ浸漬させて恒温槽内に310 Kで20日間放置した後1%乳酸溶液に溶出した元素を分析した。浸漬実験後溶出した1%乳酸溶液に含有する各元素濃度をFig. 4に示す。なお、供試材を浸漬させず同様の条件で放置した1%乳酸溶液を対照試料とした。硫酸白煙-試料前処理法を用いることでμg dm<sup>-3</sup>オーダーの溶出元素の分析が可能であった。

#### 4. 結 論

著者らは金属系生体材料を疑似体液に浸漬させて、溶出した金属イオン濃度を硫酸白煙-試料前処理法を用いてICP-OESによる分析する方法を検討した。その結果以下の結論を得た。

(1) 疑似体液に含有する主成分元素であるNaはICP-OESにおける分析線発光強度に影響を及ぼす。よって正確な分析を行うためには、検量線作成用標準溶液の調製する際にNa濃度をマッチングさせる必要である。

(2) 疑似体液の調製や浸漬実験において分析元素のコンタミネーションが起こり得る。このことをできるだけ低く抑えるためには、分析元素の含有が少ない純度の高い試薬や水を使用しそれらを管理すること、また分析元素の溶出の少ない容器を使用することなどが重要である。

著者らが提案した試料前処理法を用いることで、浸漬実験

において溶出したngレベルの定量分析が可能となった。このことは金属系生体材料の耐食性評価に大きく貢献できる。

#### 文 献

- 1) F. W. Sunderman Jr, S. M. Hopfer, T. Swift, W. N. Rezukey, L. Ziebka, P. Highman, B. Edwards, M. Folick and H. R. Gossling: *J. Orthop. Res.* **7**(1989) 307-315.
- 2) F. F. Hennig, H. J. Raithel, K. H. Scaller and J. R. Dohler: *J. Trace Elem. Electrolytes Health Dis.* **6**(1992) 239-243.
- 3) K. L. Waper: *Clin. Orthop. Relat. Res.* **271**(1991) 12-20.
- 4) Y. Okazaki, S. Rao, S. Asao, T. Tateishi, S. Katsuda and Y. Furuki: *Mater. Trans., JIM* **39**(1998) 1053-1062.
- 5) Y. Okazaki and E. Nishimura: *Mater. Trans., JIM* **41**(2000) 1247-1255.
- 6) Y. Okazaki and E. Gotoh: *Biomaterials* **26**(2005) 11-21.
- 7) Japan Industrial Standard (JIS) T 0304, (2002).
- 8) T. Ashino and K. Takada: *Anal. Sci.* **9**(1993) 737-739.
- 9) M. Ishikuro and K. Wagatsuma: *Bunseki Kagaku* **56**(2007) 933-938.
- 10) M. Rosner, R. L. Rower and A. Meixner: *Anal. Bioanal. Chem.* **382**(2005) 120-124.
- 11) T. Ashino, K. Takada, K. Wagatsuma and K. Abiko: *Matériaux & Techniques, Numéro Hors érie-Décembre* (2003) 31-36.
- 12) N. Ohtsu, T. Ashino and K. Asami: *Mater. Trans.* **45**(2004) 550-553.
- 13) N. Ohtsu, T. Ashino, K. Takada, H. Kimura and T. Hanawa: *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **18**(2007) 429-433.
- 14) Japan Industrial Standard (JIS) G 1258, (1999).
- 15) M. Ishikuro: *Bunseki Kagaku* **54**(2005) 297-300.
- 16) T. Ashino, F. Sakamoto and K. Takada: *Technical Research Report of Technical Service Division in IMR* **21**(2005) 11-15.