

Organiske utlekkstoffer fra resinbaserte tannrestaureringsmaterialer

*Utvikling av analysemetode ved bruk av kombinert
gasskromatografi-massespektrometri og kjemisk ionisasjon*

Øystein Nerbøberg Kolflåth



Avdeling for Legemiddelkjemis, Institutt for Farmasi

Det medisinske fakultet

Universitetet i Tromsø

2009

Forord:

Arbeidet som presenteres i denne oppgaven er utført ved Avdeling for Legemiddelkjemi, Institutt for Farmasi, Universitetet i Tromsø, i perioden 2008-09. Oppgaven har tatt utgangspunkt i doktorgradsavhandlingen til Vibeke Barman Michelsen om utlekkstoffer fra resinbaserte tannrestaureringsmaterialer.

Gjennom oppgavens løp har jeg mottatt hjelp og støtte fra flere personer som jeg ønsker å takke spesielt:

Einar Jensen, min veileder, som har introdusert meg for den fantastiske verdenen som er GC-MS. Takk for all oppmuntring og støtte, interessante diskusjoner, teknisk bistand og korrekturlesing. Din tro på arbeidet har betydd mye. Alltid hyggelig å være sammen med deg.

Min biveileder, Vibeke Barman Michelsen. Takk for hjelp med referansesubstanser, interessante møter og hyggelig samvær. Uten deg hadde mine kunnskaper om tannfyllingsmaterialer vært små. Takk for nyttige innspill i skriveprosessen.

En takk til Marianne Nygårdsvoll og Ulf Örtengren for stimulerende diskusjoner, samarbeidsmøter og hyggelige lag. Takk for lån av Scotchbond 1 XT bonding. Lykke til med eget prosjekt på bondingmaterialer.

En liten takk til alle mine kjære venner som stiller opp og er der når man trenger dem.

Til slutt en takk til mine kjære foreldre og søsken som alltid er støttende og positive. Takk for at dere har tro på meg, og alltid oppmuntrer og støtter.

Sammendrag:

Polymerbaserte resiner har i dag erstattet amalgam som tannfyllingsmateriale. Kvikksølv, en hovedkomponent i amalgam, har negative miljøeffekter og har antatte skadelige effekter på pasienter og tannlegepersonell. Norge innførte 1. januar 2008 forbud mot all bruk av kvikksølv i produkter, herunder kvikksølvamalgam som tannfyllingsmateriale. Forbudet omfatter alle bruksområder som ikke er gitt spesifikt unntak, eller som allerede er regulert. Samtidig har studier vist at innholdsstoffer og nedbrytingsprodukter kan lekke fra de polymerbaserte tannfyllingsmaterialene. Noen av disse stoffene har vist cytotoxiske, genotoksiske eller hormonhermende effekter in vitro.

Det er mange ulike polymerbaserte tannfyllingsmaterialer på markedet og stadig nye blir tilgjengelige. Ulike materialer bør derfor testes for hvilke stoffer som lekker ut og i hvilke mengder. Både kvantitativ og kvalitativ informasjon om utlekkstoffene må inngå i en vurdering av et produkts biokompatibilitet.

Analyser av disse stoffene har hittil i all hovedsak blitt utført med kombinert gaskromatografi-massespektrometri (GC-MS) og elektron-ionisering (EI). Noen av ulempene med denne metoden er at de ulike stoffene har intensiv fragmentering og gir lite eller ingenting av molekylion. Kvantitative analyser må da baseres på målinger av fragment med lave masser som gir lite selektive metoder. Målet med denne oppgaven var å utvikle mer selektive metoder for kvantifisering av stoffer fra resinbaserte odontologiske materialer basert på GC-MS (og GC-MS/MS) og kjemisk ionisasjon (CI). Vi ønsket også å forsøke å derivatisere aktuelle forbindelser for å få mer flyktige og temperaturstabile stoffer.

Vi har vist at GC-MS med kjemisk ionisasjon er en velegnet teknikk for analyser av resinbaserte tannfyllingsmaterialer, selv om den har noen ulemper. Vi har vist at selektivitet og sensitivitet ved analyser på resinbaserte materialer kan forbedres ved bruk av CI fremfor EI. I kombinasjon med silylering gav metoden for enkelte forbindelser svært sensitive og selektive analyser. Metoden kan anvendes også på andre polymerbaserte odontologiske materialer som for eksempel bondingmaterialer. En ulempe med metoden er at det ikke finnes referansebibliotek med massespektra for substanser på samme måte som for EI, slik at for ukjente substanser vil EI fortsatt være en velegnet metode.

Innholdsfortegnelse:

Forord:	3
Sammendrag:	4
Innholdsfortegnelse:	5
1.1 Resinbaserte materialer:	9
1.2 Stoffer:	11
1.3 Gasskromatografi:	14
1.4 Massespektrometri:	17
1.5 Derivatisering:	19
1.6 Validering:	20
2. Mål:	21
3. Metode og materialer:	23
3.1 Standarder, reagenser og løsemidler:	23
3.2 Derivatisering:	23
3.3 Intern standard:	24
3.4 Analytisk metode:	25
3.5 Validering:	28
4. Resultater og diskusjon:	29
4.1 GC og LC:	29
4.2 Selektivitet:	29
4.3 Sensitivitet:	34
4.4 Derivatisering:	37
4.5 SIM/MRM-program:	43
4.6 Intern standard:	44
4.7 Validering:	45
4.8 Kvalitativ analyse av et bondingmateriale:	47

4.9 Biologiske vurderinger:	49
5. Konklusjon:.....	51
6. Referanser:.....	52

1. Introduksjon:

Odontologiske materialer som plasseres i munnen kan komme i kontakt med tannvev, bløtvev eller benvev. Det benyttes et stort mangfold av materialer til restaurering av tenner. Ingen materialer er uten risiko for bivirkninger, derfor må risiko veies mot positive effekter. Bivirkninger fra odontologiske materialer kan være lokale eller systemiske. Både pasienter og tannhelsepersonell kan få skadevirkninger fra odontologiske materialer [1]. Hos pasienter opptrer lokale effekter i munnhulen, hos tannhelsepersonell sees lokale reaksjoner oftest på fingre og hender som berører materialene [1-4].

Amalgam er tradisjonelt det vanligste fyllingsmaterialet og har vært benyttet som tannfyllingsmateriale siden 1832. Det inneholder rundt 50 prosent kvikksølv, et av de mest toksiske, ikke-radioaktive metaller vi kjenner til [5]. Grunnstoffet (Hg) kvikksølv har et bredt spekter av toksiske effekter på celle- og organnivå, deriblant produksjon av frie radikaler, enzymhemming, forstyrret ionetransport over cellemembraner, og endret produksjon av neurotransmittorer, hormoner og cytokiner [5, 6].

De siste tiårene har resinbaserte tannfyllinger overtatt plassen for amalgamfyllinger. Resinbaserte tannrestaureringsmaterialer formulert som kompositter ble introdusert tidlig på 60-tallet etter introduksjonen av Michael Buonocores syreetsetteknikk og Dr. Rafael Bowens patent på Bis-GMA [7]. Ankepunkter var dårlige fysikalske egenskaper og usikker toksisitet. Komposittmaterialer har siden vært gjenstand for stor forskning og utvikling med klinisk imponerende resultater [8]. I følge Skandinaviske studier benyttes tannfargede materialer i mellom 65 – 94 prosent av tannrestaureringene [9-13] og er i dag førstevalg i mange land. En økende frykt for bivirkninger fra kvikksølvinnholdet i amalgamfyllinger og bekymring for hvilke skadelige effekter amalgamavfall kan ha for miljøet har bidratt til dette, samt et ønske om mer estetiske tannrestaureringer.

En rapport om dentale materialer i Norge som ble publisert i 1998 av Statens helsetilsyn [14] ble etterfulgt av nye nasjonale kliniske retningslinjer fra Sosial- og helsedepartementet i 2003 [15]. Retningslinjene fra 2003 slår blant annet fast at amalgam ikke skal være førstevalg ved tannrestaureringer. Et krav om mer estetiske tannfyllinger, samt et større fokus på å bevare tannens struktur er andre grunner til at komposittmaterialer er foretrukket. På grunn av lime-teknikken som benyttes for feste av materialet, reduseres prepareringen av tannen til et minimum, dermed bevares tannsubstans og mulige skader på tannmargen reduseres. Fra januar 2008 ble det forbudt å produsere, importere, eksportere, omsette og bruke kvikksølvholdige produkter i Norge. Frem til desember 2010 gjelder ikke forbudet for amalgam til bruk i tannbehandling av pasienter som må behandles i narkose, eller som er allergiske mot ingredienser i andre tannfyllingsmaterialer [16].

En rapport sammenstilt av *EUs Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks* (SCENIHR) konkluderer med at eksponering for kvikksølv er en toksikologisk

risiko, men at der samtidig ikke fins vitenskapelige bevis for at amalgam i tannfyllinger gir generelle bivirkninger eller systemiske sykdommer. Andre tannrestaureringsmaterialer ble også vurdert. Resinbaserte materialer ble vurdert til å ha kliniske begrensninger og toksikologiske risikoer, men at det er lite tegn til kliniske bivirkninger av betydning [17].

Resinbaserte materialer til dental restaurering er komplekse polymerer som består av fyllpartikler av ulik størrelse og art, omsluttet av en organisk, resinbasert matriks. Denne matriksen er vanligvis basert på metakrylatkjemi og kan inneholde et mangfold av monomerer, samt initiatorer, aktivatorer, stabiliseringsstoffer, plastmyknere og andre tilsetninger. Ved polymeriseringen dannes bindinger og kryssbindinger mellom monomerene, og et rigid polymernettverk blir resultatet [18]. Denne kryssbindingen begrenser sirkulasjonen av molekylene i nettverket og vil medføre at en signifikant mengde monomerer og andre stoffer fanges uten å bindes i det herdede materialet [19]. En komplett polymerisering vil derfor være umulig å oppnå. På grunn av eluering, degradering og erosjon vil stoffer som ikke er bundet i matriksen, i tillegg til degraderingsprodukter, kunne lekke ut i munnhulen [20-22]. Stoffer kan også diffundere gjennom dentinet og inn i tannmargen [23, 24]. Matriksens kjemiske sammensetning og grad av kryssbinding, omfang av nedbrytning, påvirkning fra miljøet og tid har betydning for nedbryting, utlekk og erosjon [19, 21, 25, 26].

Det er kjent fra studier in vitro at innholdsstoffer og nedbrytningsprodukter fra resinbaserte materialer kan ha cytotoxisk [23, 27-31], genotoksisk [32-36] eller østrogen potensial [22, 37-39]. Mengdene som avgis av slike stoffer, er imidlertid antatt å være små. Om lavdoseeksponering for hormonhermere kan gi uheldige helseeffekter, har vi lite kunnskap om i dag [40]. Dette bør avklares, særlig med tanke på mulige addisjonseffekter fra stoffer i miljøet med tilsvarende virkninger. Uherdede eller ufullstendig polymeriserte materialer kan forårsake allergisk kontaktdermatitt eller toksiske reaksjoner hos tannlegepersonell og pasienter på grunn av frigjøring av potente sensitiviserende/irriterende substanser [1-4]. Håndtering av uherdet resin ser ut til å innebære størst risiko for allergiutvikling for tannhelsepersonell [41].

Bivirkningsgruppen for odontologiske biomaterialer ble opprettet som en prosjektgruppe av Helsedirektoratet i 1992 under Det odontologiske fakultet ved Universitetet i Bergen. Utgangspunktet var den pågående amalgamdebatten. Fra 1. januar 1999 ble gruppen permanent med finansiering over statsbudsjettet. Bivirkningsgruppen mottar rapporter om mulige bivirkninger relatert til odontologiske materialer som fylles ut av tannlege, tannpleier eller lege. Andelen bivirkningsrapporter relatert til kompositter/sementer hadde økt fra 22,5 % i 2007 til 43,5 % i 2008 [42]. Dette er ingen alarmerende økning av rapporter om pasientreaksjoner på plastbaserte tannfyllingsmaterialer, men man ønsker å overvåke utviklingen.

Innholdet i dentale plastfyllingsmaterialer er ofte vanskelig å få klarlagt i detalj fordi det ikke kreves at fabrikantene skal angi innholdet nøyaktig. Informasjon fra produsenter om innholdsstoffer i et produkt gis i produktdatabladet, men disse er ofte ufullstendige og i

noen tilfeller villedende [43]. Ved innhold av helseskadelige stoffer må ingredienser på over 1 vektprosent oppgis i produktdatabladet. Mange av tilsetningsstoffene og noen monomerer er til stede i lavere konsentrasjoner, og oppgis derfor ikke i databladet. Eksponering for stoffer i lave konsentrasjoner (under 1 %), kan likevel ikke utelukkes som årsak til allergi eller andre bivirkninger. I tillegg kan nedbrytningsprodukter som dannes under eller etter herding, og urenheter fra produksjonsprosessen være tilstede den polymeriserte matriksen. Både kvantitativ og kvalitativ informasjon om utlekkstoffene må inngå i en vurdering av et produkts biokompatibilitet [21, 43].

Det har vært benyttet flere analytiske metoder for å karakterisere utlekkstoffer fra resinbaserte tannrestaureringsmaterialer [20, 21, 44-52]. Slike studier gir verdifull kunnskap om stoffer som kan lekke fra materialene. For å kunne vurdere utlekkstoffer og risikoen disse utgjør, trenger vi pålitelige analysemetoder for å fastslå hva som lekker og hvor mye som lekker. Det er utført noen studier som har kvantifisert utlekkstoffer fra resinbaserte materialer [53-56].

1.1 Resinbaserte materialer:

Resinbaserte materialer benyttes i dag til en lang rekke dentale applikasjoner, alt fra restaureringsmaterialer og adhesiver til ortodontiske og prostodontiske materialer [57]. Denne oppgaven har tatt utgangspunkt i arbeidet til Michelsen et al. [21, 54, 55] med dentale resinbaserte restaureringsmaterialer til direkte applisering, aktivert med lys-indusert polymerisering. Analysemetoden er utviklet til bruk på slike materialer, men kan benyttes til analyser av utlekkstoffer fra andre resinbaserte materialer. På grunn av de ulike materialenes kompleksitet vil denne oppgaven konsentrere seg om resinbaserte restaureringsmaterialer.

Det finnes fire hovedtyper resinbaserte restaureringsmaterialer: Kompositter, kompomerer, resinmodifiserte glassionomerer og organisk modifiserte keramiske materialer [57, 58]. I tillegg er nå epoksybaserte materialer på markedet, kalt siloraner [59]. De fleste av disse materialene er lysherdende, men også rent kjemisk herdende og såkalt dual-herdende (både lys- og kjemisk herdende) materialer finnes [60]. Opprinnelig var komposittene et to-komponentsystem, men ulemper med begrenset arbeidstid før herding førte til at en-komponentsystemer, som herdet først ved eksponering for UV-lys, ble introdusert på 70-tallet. Senere på 70-tallet ble materialer som herdet ved eksponering for synlig lys tatt i bruk. Fotopolymeriseringen initieres med halogenlamper med emisjon i bølgeområdet 380-500 nm. Nylig har også andre typer herdelamper blitt introdusert, som plasmabue- og LED-lamper [58].

De vanligste organiske monomerene i resinbaserte materialer er alifatiske og aromatiske metakrylater. Bis-GMA (Bisfenol-A-glycidylmetakrylat), Bis-EMA (Etoxyleret Bisfenol-A-dimetakrylat) og UDMA (Uretan dimetakrylat) er eksempler på monomerer som er vanlige

bestanddeler. For å senke viskositet og øke antall kryssbindinger tilsettes monomerer med lav molekylvekt som TEGDMA (trietylglykol dimetakrylat), EGDMA (etylenglykol dimetakrylat) og TMPTMA (trimetylolpropan trimetakrylat) [61].

Monomersystemet behøver kjemikalier for å sette i gang polymeriseringsreaksjonen. Materialer med lysindusert polymerisering inneholder en fotoinitiator og co-initiator. Fotoner fra lyskilden eksiterer elektroner i initiatoren som deretter kan interagere med co-initiatoren for å danne frie radikaler. De frie radikalene reagerer med monomerene og polymeriseringen starter. Kamforokinon (CQ) er den mest brukte initiatoren, benyttet i konsentrasjoner på 0,2-1 %. Denne initiatoren absorberer lys med bølgelengder på 400-500 nm [58].

For å unngå at polymeriseringsreaksjonen skal skje før lysindusering igangsettes, inneholder tannfyllingsmaterialet inhibitorer som kan reagere med frie radikaler, og beskytte mot for tidlig polymerisering. MEHQ (hydrokinon monometyleter) og BHT (butylert hydroxytoluen) er mye benyttet. I tillegg inneholder produktene ofte små mengder UV-stabilisatorer som skal forhindre at matriksen misfarges av UV-lyseksposering ved oksidering etter at fyllingen er på plass [61]. Til dette er bl.a. HMBP (oxybenzon) mye benyttet.

Ulike uorganiske materialer benyttes som fyllpartikler i resinbaserte tannfyllinger, som kvarts, glass og keramikk, men også prepolymeriserte resinpartikler blir benyttet. På grunn av fyllpartiklers store påvirkning av materialets fysiske egenskaper blir tannfyllingsmaterialer ofte klassifisert etter partiklenes størrelse og type: makrofillere, minifillere, nanofillere eller hybrider av disse [58]. For å øke bindingen mellom fyllpartiklene og den organiske matriksen benyttes et tverrbindingsmiddel. Tverrbindingsmiddelet dekker fyllpartiklene og kan danne kovalente bindinger med resinfasen under polymeriseringen. Organosilaner (silaner) er mye benyttet som tverrbindingsmiddel [61].

Det er dokumentert at resinmaterialer kan lekke ureagerte komponenter etter polymerisering. Nedbryting kan føre til at resinkomponenter og degraderingsprodukter avgis [40]. Studier har vist at noen av substansene kan ha cytotoksiske, genotoksiske eller hormonhermende (østrogen) effekter in vitro [22, 23, 27-39]. En evaluering av cytotoksitet in vitro av 35 komponenter i resinbaserte kompositter indikerte cytotoksiske effekter hos flere [29]. Å vurdere hvilken risiko disse materialene representerer in vivo er vanskelig, da effekt er doseavhengig. TEGDMA (trietylglykol dimetakrylat) og HEMA (2-hydroxyetyl metakrylat) har gitt genmutasjoner in vitro [32, 34-36]. Men også andre innholdsstoffer og degraderingsprodukter har vist genotoksitet. Mekanismen er uklar, men man antar at mekanismen er ulik for de forskjellige substansene [39, 40, 62].

Noen av stoffene som kan lekke fra resinbaserte tannfyllinger har vist seg å ha østrogen effekt [38, 39]. Bisfenol-A (BPA) og Bisfenol-A dimetakrylat (Bis-DMA) er blant stoffene som har vist en slik effekt. På tross av at østrogen effekt er vist både in vitro og in vivo tror man at konsentrasjonen i spytt er så lav, at risikoen for østrogen aktivitet fra BPA-baserte resiner på

kort sikt vil være ubetydelig [39], men langtidseffekter er ikke klarlagt. Også noen andre stoffer har vist østrogen aktivitet, som fotostabilisatoren HMBP og inhibitoren BHT, men det ble konkludert med at effekter in vivo var usannsynlig siden kun svært lave konsentrasjoner kunne detekteres [39].

Det har vært en økning de siste ti årene i antall rapporterte bivirkninger beskrevet som allergiske reaksjoner hos pasienter og tannhelsepersonell [4, 63, 64]. Allergi synes å være den primære bivirkningen fra de resinbaserte materialene. Prevalensen blant pasienter er lav, men blant tannhelsepersonell er der en høyere risiko for å utvikle kontaktdermatitt. Dette skyldes delvis eksponering for metakrylatmaterialet, særlig uherdet materiale. Flere av monomerene har evne til å diffundere gjennom hansker i løpet av relativt kort tid [65]. Rapporter om astma forårsaket av inhalering av metakrylater er også publisert [66]. Type IV hypersensitivitet eller kontaktdermatitt er de vanligste allergiske reaksjonene i forbindelse med resiner [64], men Type I allergireaksjoner forekommer.

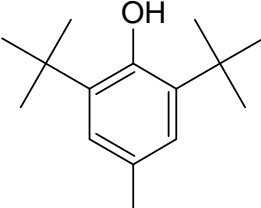
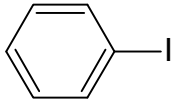
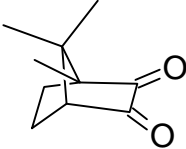
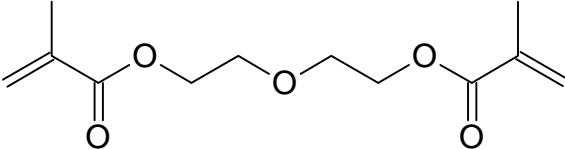
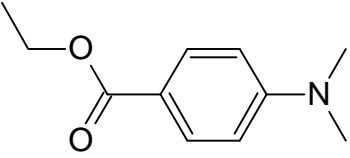
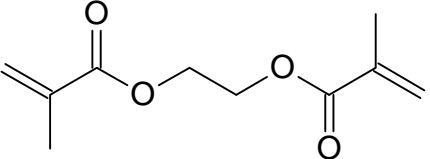
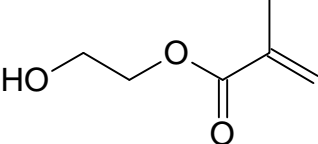
Tannfyllingsmaterialer regnes som medisinteknisk utstyr og skal derfor CE-merkes i henhold til lov om medisinsk utstyr [67]. I tillegg kan materialene prøves etter aktuell ISO-standard, men det er ikke krav om dette. Standarden ISO 4049 [68] stiller krav til kompositt fyllingsmaterialer. Standardene beskriver de krav som ISO (International Organization for Standardization) har satt til materialer av den aktuelle typen og som skal sikre funksjonell og sikker bruk av materialet for pasienten.

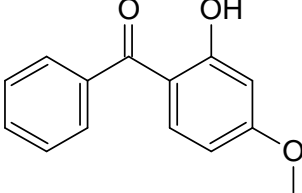

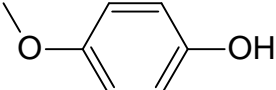
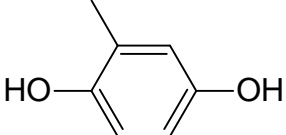
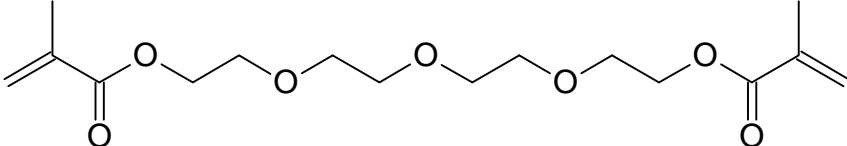
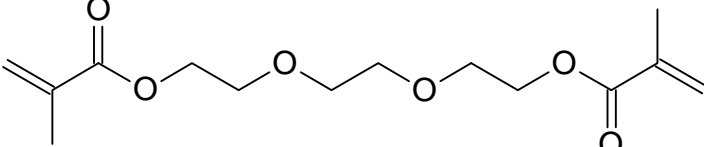
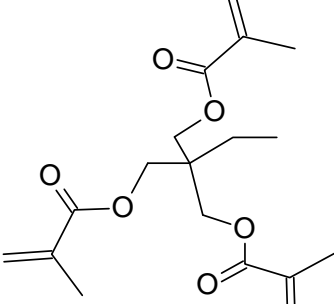
1.2 Stoffer:

I resinbaserte materialer benyttes en stor mengde ulike monomerer og tilsetningsstoffer. I en studie av Michelsen et al. ble 32 eluerende substanser identifisert fra fire polymerbaserte tannfyllingsmaterialer [21]. Innholdet i dentale plastfyllingsmaterialer er ofte vanskelig å få klarlagt i detalj fordi det ikke kreves at fabrikantene skal angi innholdet nøyaktig.

Materialene kan også inneholde forurensninger som fabrikanten kan ha liten kjennskap til [43]. Analysemetoden utviklet i denne oppgaven er basert på referansesubstansene i Tabell 1.

Tabell 1: Referansesubstanser benyttet i denne oppgaven

Forbindelse, CAS, kjemisk formel og funksjon	Struktur
Butylert hydroxytoluen (BHT) $C_{15}H_{24}O$ 128-37-0 Stabilisator	
Benzeniodid (BI) C_6H_5I 591-50-4 Degraderingsprodukt	
Kamforokinon (CQ) $C_{10}H_{14}O_2$ 10373-78-1 Initiator	
Dietylglykol dimetakrylat (DEGDMA) $C_{12}H_{18}O_5$ 2358-84-1 Monomer	
Etyl 4-(dimetylamino) benzoat (DMABEE) $C_{11}H_{15}NO_2$ 10287-53-3 Co-initiator	
Etylglykol dimetakrylat (EGDMA) $C_{10}H_{14}O_4$ 97-90-5 Monomer	
2- hydroxyetyl metakrylat (HEMA) $C_6H_{10}O_3$ 868-77-9 Monomer	

<p>Oxybenzon (HMBP) $C_{14}H_{12}O_3$ 131-57-7 UV-stabilisator</p>	
<p>Hydrokinon (HQ) $C_6H_6O_2$ 123-31-9 Inhibitor</p>	
<p>Hydrokinon monometyleter (MEHQ) $C_7H_8O_2$ 150-76-5 Inhibitor</p>	
<p>Methylhydrokinon (MHQ) $C_7H_8O_2$ 95-71-6 Inhibitor</p>	
<p>Tetraetylglykol dimetakrylat (TEGDMA) $C_{16}H_{26}O_7$ 109-17-1 Monomer</p>	
<p>Trietylglykol dimetakrylat (TEGDMA) $C_{14}H_{22}O_6$ 109-16-0 Monomer</p>	
<p>Trimetylolpropan trimetakrylat (TMPTMA) $C_{18}H_{26}O_6$ 3290-92-4 Monomer</p>	

1.3 Gasskromatografi:

Kromatografi er et samle navn på separasjonsmetoder som benyttes til å separere stoffer i en prøve. Det benyttes en væske eller gass (mobil fase) for å transportere stoffblandingen over en stasjonær fase. Stoffene vil interagere med den stasjonære fasen i ulik grad. Stoffe som retarderes forskjellig separeres. Når mobilfasen er gass kalles teknikken gasskromatografi (GC), og når det er en væske, væskrokromatografi (LC). Et stort utvalg stasjonære faser finnes for begge metodene. Ved GC vil analyttens flyktighet og interaksjoner med stasjonærfaser bestemme retensjonstiden. Stoffe kan separeres dersom retensjonen på stasjonærfasen er tilstrekkelig forskjellig og spredningen av stoffet i kolonnen er tilstrekkelig liten (smale toppe). Resultatet av en kromatografisk separasjon presenteres vanligvis i et kromatogram (Figur 1).

Gasskromatografi egner seg for separasjon av stoffer som er flyktige og termisk stabile, eller hvor det kan dannes flyktige, stabile derivater. Store, polare molekyler som mange legemidler, peptider, proteiner og andre biomolekyler kan ikke separeres med GC. Stoffene som vanligvis er løst i et flyktig løsningsmiddel, injiseres i injektoren og stoffene fordampes umiddelbart. Mobilfasen, også kalt bæregass, frakter stoffene i gassform til kolonnen (Figur 2). I kolonnen fordeler stoffene seg mellom bæregassen og stasjonærfasen. Stasjonærfasen er vanligvis en ikke-flyktig væske, men kan også være et fast stoff. Det benyttes to ulike kategorier av kolonner, pakke kolonner og kapillærkolonner. Kapillærkolonner er mest benyttet. Pakkede kolonner er vanligvis 2-3 m lange med en indre diameter på 2-5 mm og er fylt med partikler som er dekket med stasjonærfase. Kapillærkolonner har en indre diameter i området 200-500 μm , ofte 250 eller 320 μm . Stasjonærfasen ligger som en tynn film på innsiden av kolonnen (Figur 3). Filmtykkelsen er i området 0,05-10 μm . Tynnere filmer gir redusert retensjon. For å oppnå god separasjon er smale toppe avgjørende. Toppenes bredde i forhold til retensjonstid er et uttrykk for kolonnenes effektivitet. Båndbredde uttrykkes av parameteren N , antall teoretiske plater. Kapillærkolonner har lite trykfall i kolonnen ved gjennomstrømming av gass og kan derfor være lange uten at trykket i kolonnen blir for høyt. Kolonnelengder på 10-30 m er normalt, noe som gjør GC med kapillærkolonner til en av de kraftigste separasjonsmetodene som eksisterer.

I kolonnen fordeler stoffer seg mellom bæregass og stasjonærfase. Økende temperatur vil gi redusert retensjon siden temperaturen vil drive fordelingen mot gassfasen. De fleste GC-analyser utføres ved temperaturprogrammering. Bæregassen er et inert transportmedium for stoffene. Nitrogen, helium og hydrogen benyttes. Høyest effektivitet oppnås ved optimal gasshastighet og denne er ulik for gassene. I kapillærkolonner foretrekkes vanligvis helium som bæregass da den er sikrere i bruk enn hydrogen og analysetiden reduseres betraktelig i forhold til for nitrogen.

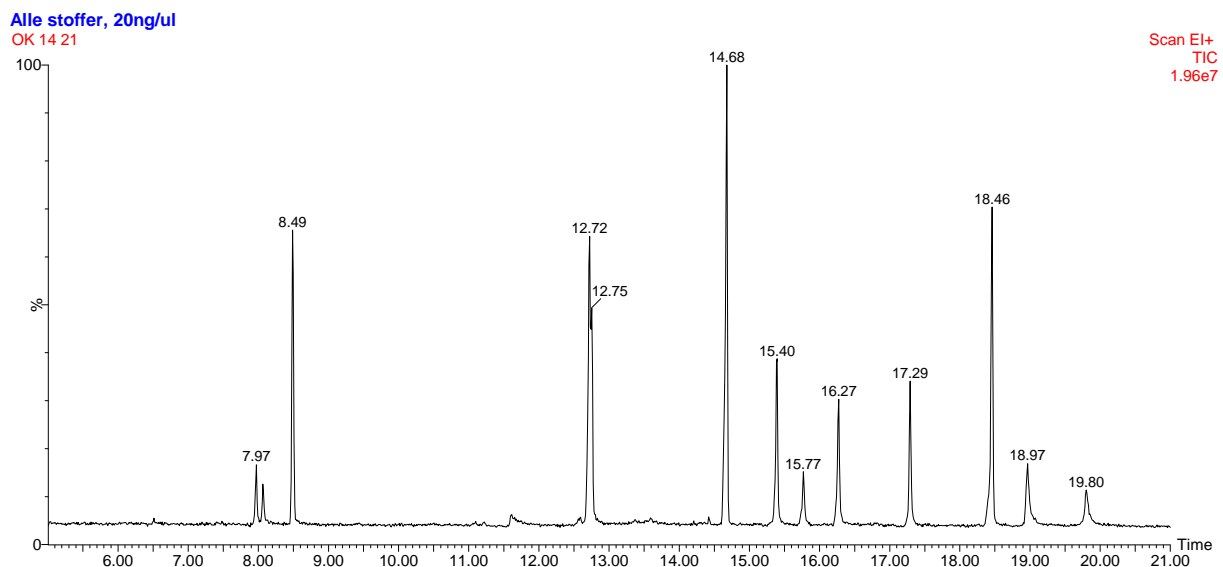
Stasjonærfaser i GC er temperaturstabile væsker og polysiloksanene utgjør de viktigste stasjonærfasene. Polydimetylsiloksan er en upolar stasjonærfase som kan brukes i

temperaturer opp til 350 °C. Ved å innføre polare grupper som fenylgrupper kan polariteten økes. Innføring av polare grupper reduserer temperaturstabiliteten noe.

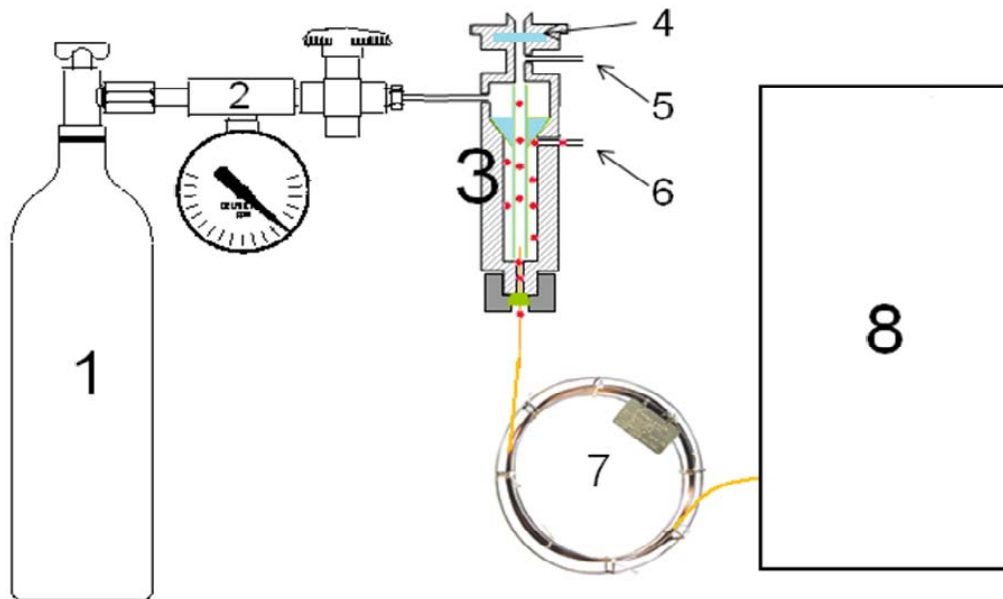
De viktigste parameterne som styrer en GC-separasjon er:

- Temperatur i injektor, kolonne og detektor
- Type og mengde stasjonærfase
- Kolonnetype
- Type bæregass og hastighet

Det finnes en lang rekke detektorer i GC som flammeionisasjonsdetektor (FID) og varmeledningsevnedetektor (TCD), men mye benyttet er massespektrometer (MS). Et massespektrometer kan benyttes både som detektor og kan gi strukturinformasjon om stoffene. Molekylene ioniseres og fragmenteres. Et massespektrum er et plot av relativ intensitet av ionene som funksjon av masse/ladningsforhold (m/z). Dette spekteret er svært karakteristisk og GC-MS er derfor standard metode i blant annet doping- og rettstoksikologisk analyse.

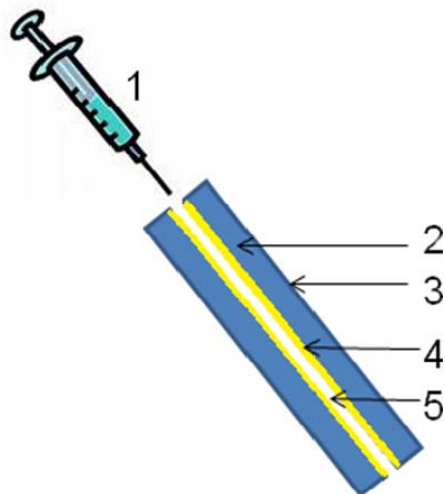


Figur 1: Eksempel på kromatogram



Figur 2: Gasskromatograf skjematisk.

1. Bæregass, 2. Reduksjonsventil, 3. Injektor, 4. Septum, 5. Septumspyling, 6. Splitterventil, 7. Kappillærkolonne, 8. Detektor



Figur 3: Krysseksjon av kolonne. 1. Injektor, 2. "Fused silica" 3. Ytre lag (polyimid), 4. Stasjonærfase, 5. Mobilfase

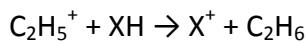
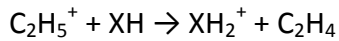
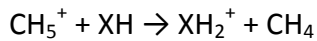
1.4 Massespektrometri:

Massespektrometri (MS) involverer separering av ioner i gassfase etter deres masse/ladningsforhold (m/z). Massespektrometer består av en ionekilde, et massefilter og en detektor. I kombinasjon med GC ioniseres analyttene under vakuumbetingelser i ionekilden. Dette kan skje ved elektronionisasjon (EI), hvor analytten bombarderes med elektroner, eller ved kjemisk ionisasjon (CI) hvor analytten reagerer med ladede reagensioner. Molekylioner (M^{+}) som dannes vil deretter i varierende grad fragmenteres til ioner med lavere masser. Ionene separeres på bakgrunn av masse/ladningsforhold i en masseanalysator og detekteres av en detektor. Resultatet fra analysen presenteres i et massespektrum (Figur 4), hvor intensiteten av ioner plottes som funksjon av m/z . Generelt kan et massespektrometer opereres etter to prinsipper, opptak av spektre (alle ioner som blir produsert i ionekilden vil detekteres) og selektiv ionemonitorering (ett eller flere ioner detekteres). Opptak av spektre gir mye strukturinformasjon og man kan sammenligne med spekter fra bibliotek, men sensitiviteten er begrenset. Ved selektiv ionemonitorering (SIM) måler massespektrometeret på en eller noen få masser og dette gir svært sensitive og selektive analyser av kjente forbindelser. Mange massespektrometere benytter to eller flere massefiltere for tandem massespektrometri (MS/MS).

Mange ulike ionekilder og massefiltere er tilgjengelige. I denne oppgaven er det benyttet en GC-MS/MS med mulighet for både EI- og CI-kilde og massefilteret er en trippel kvadrupol. Et kvadrupol massefilter består av fire metallstaver som ligger parallelt og symmetrisk rundt aksene (Figur 5). Kvadrupolen bruker elektrisk spenning for å skille ionene, ved å la ladningen oscillere mellom fire poler, to anoder og to katoder. Ved å kontrollere ladning, spenning og oscillerende frekvens vil alle ioner (eller selekterte ioner) styres mot detektoren. Et trippelkvadrupol massespektrometer har tre kvadrupoler arrangert parallelt med innkommende partikler (Figur 6). Den første kvadrupolen (Q1) opptrer som massefilter. Den andre (Q2) opptrer som en kollisjonscelle hvor utvalgte ioner fragmenteres. Den siste kvadrupolen (Q3) kan enten ta opp spektre eller monitorere selekterte masser. MRM (Multiple Reaction Monitoring) er en svært selektiv kvantitativ metode innenfor massespektrometri, som kan gi veldig sensitive analyser, såfremt stoffet ikke har intens fragmentering i kollisjonscellen.

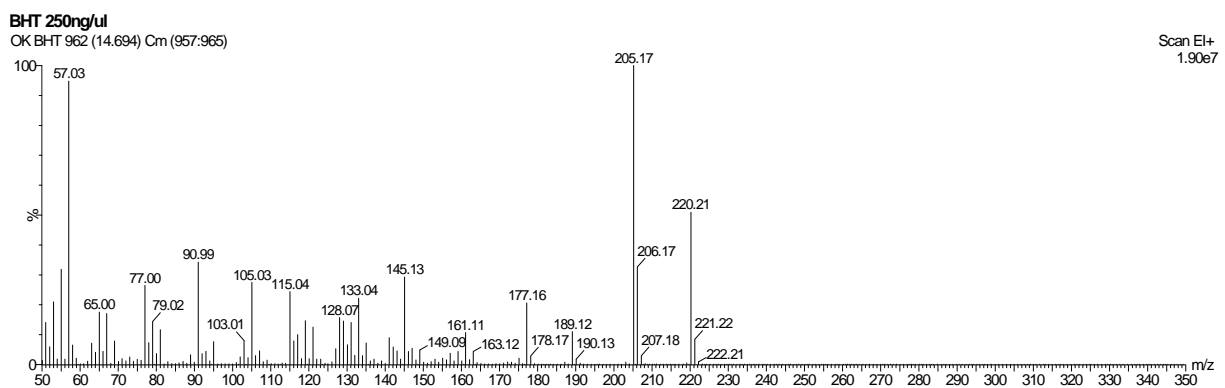
Når stoffene etter separasjon i GC-instrumentet entrer massespektrometeret i gassfase kan ioniseringen skje ved EI eller CI. I EI dannes ioner ved at analytten bombarderes med elektroner med høy energi (70 eV) og et elektron tapes fra molekylet. De ladede partiklene ledes via elektroniske linser inn i massefilteret. Dempster beskrev EI-kilden allerede i 1918 [69]. En fordel med EI er at utseende til et stoffs spektrum er stort sett instrumentuavhengig, noe som gjør det mulig å samle store biblioteker med referansespektre. I noen tilfeller er molekylionene som dannes i EI så ustabile at de fragmenterer fullstendig og man vil ikke finne molekylionet i massespekteret. Dette er en stor ulempe ved identifisering og gir lavere selektivitet ved kvalitative analyser ved SIM.

Dersom EI ikke gir tilstrekkelig med molekylioner ($M^{+\bullet}$) kan man benytte CI. Ved å tilføre en reagensgass i ionekilden reduseres elektronenes energi. Reagensgasser som benyttes er for eksempel metan, propan, ammoniakk og isobutan. Ofte er reagensgassen som benyttes metan (CH_4). Elektronene i ionekilden vil nesten utelukkende ionisere reagensgassen. Med metan som reagensgass vil det dannes CH_5^+ og $C_2H_5^+$ som er svært reaktive og i utstrakt grad vil reagere med analytten (XH) etter følgende reaksjoner:

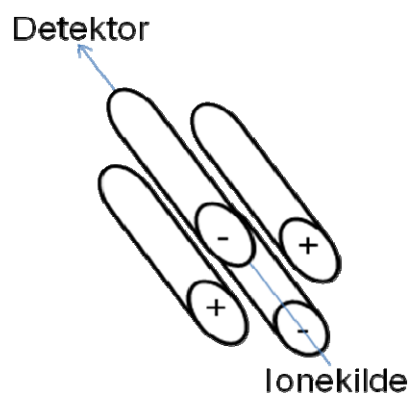


Ved CI med metan dannes normalt ioner med masse $[M+1]$ eller $[M-1]$ som er relativt stabile og vil gi signaler med høyere intensitet. Den lavere energien som benyttes under ioniseringen gir mindre fragmentering og ofte et enklere spekter enn ved EI.

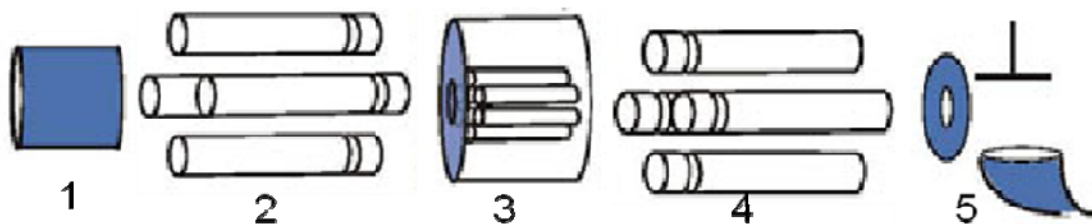
Fragmenteringen ved CI vil i stor grad avhenge av hvilken reagensgass som benyttes og massespektrene vil påvirkes av dette. Det finnes derfor ikke databaser med referansespekter i samme grad som for EI. CI ble først beskrevet av Munson og Field i 1966 [70].



Figur 4: Massespektrum av BHT ved EI. ($M^{+\bullet} = 220$ m/z)



Figur 5: Kvadrupol analysator



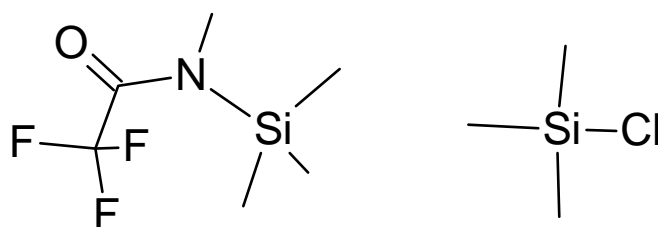
Figur 6: Skjematisk diagram av tandem massespektrometer.

1. Ionekilde, 2. Kvadrupol massefilter (Q1), 3. Kollisjonscelle (Q2), 4. Kvadrupol massefilter (Q3) 5. Detektor

1.5 Derivatisering:

Mange substanser har funksjonelle grupper som hydroksylgrupper, fenolgrupper, aminogrupper og karboksylsyregrupper. Slike grupper nedsetter stoffers flyktighet og forårsaker adsorpsjon til overflater og gir brede topper med haledannelse i kromatograferingen. Hensikten med derivatisering er å danne flyktige og stabile derivater som er bedre egnet for GC ved å omdanne polare grupper til upolare grupper. Vanlige metoder er alkylering, acetylering og silylering.

Silylering erstatter aktive hydrogenatomer med en trimetylsilylgruppe. (fig, fig) Alkoholer, karboksylsyrer og aminer er egner seg godt til silylering. Derivatene er termisk stabile, flyktige og velegnet til GC. I denne oppgaven har vi benyttet MSTFA + 1 % TMCS (N-metyl-N-trimetylsilyltrifluoroacetamid + 1 % trimetylklorosilan) (Figur 7). MSTFA er det mest flyktige av TMS-amidene og biproduktet N-metyltrifluoroacetamid har kort retensjonstid. Dette gjør at MSTFA og biprodukt eluerer tidlig og vil sjelden interferere med analyttene. Amider, mange sekundære aminer og sterisk hindrede hydroksylgrupper vil ikke la seg derivatiseres av MSTFA alene. TMCS blir derfor tilsatt i konsentrasjoner fra 1-10 % for å øke MSTFAs reaktivitet.



Figur 7: MSTFA + TMCS (N-metyl-N-trimetylsilyltrifluoroacetamid + trimetylklorosilan)

1.6 Validering:

Ved utvikling av en metode til bruk for kvantifisering av eluerende substanser fra dentale materialer ved bruk av GC-MS, er metodens pålitelighet avgjørende. Valideringsparametere for kvantifisering med GC-MS er presentert i Tabell 2.

Tabell 2: Valideringsparametere for GC-MS kvantifisering

Deteksjonsgrense (LOD): Den laveste konsentrasjon av analytt som kan detekteres
Kvantifiseringsgrense (LOQ): Den laveste konsentrasjon hvor analytten kan kvantifiseres
Linearitet: Egenskapen metoden har til å gi standardkurver hvor responsen er en lineær funksjon av konsentrasjonen. Dette dokumenteres ved lineær regresjon. Regresjonskoeffisienten uttrykker metodens linearitet.
Nøyaktighet: Overensstemmelse mellom målt verdi og sann verdi
Presisjon: Et mål for spredning i resultatene ved gjentatte målinger av samme prøve

Kvantitative analyser av utlekkstoffer har hittil i all hovedsak blitt utført med GC-MS og elektronionisering (EI). Noen av ulempene med denne metoden er at de ulike stoffene har intensiv fragmentering og gir lite eller ingenting av molekyllion. Kvantitative analyser må da baseres på målinger av fragment med lave masser og dette gir lav selektivitet. En del av de mer polare forbindelsene egner seg dårlig for GC-MS og gir dårlige kromatogram. Ved å derivatisere disse, dannes mer flyktige og temperaturstabile analytter som egner seg bedre for GC. Derivatisering av utlekkstoffer fra resinbaserte odontologiske materialer er ikke beskrevet tidligere.

2. Mål:

Formålet med oppgaven var å forbedre eksisterende analysemetoder for utlekkstoffer fra resinbaserte tannrestaureringsmaterialer ved å:

1. Utvikle en analysemetode for resinbaserte tannrestaureringsmaterialer og andre resinbaserte odontologiske materialer ved bruk av GC-MS og kjemisk ionisasjon (CI).
2. Derivatisere aktuelle forbindelser ved silylering for å danne substanser som lettere lar seg analysere på en god måte med GC-MS.
3. Gjøre analyser på utlekkstoffer fra resinbaserte tannfyllingsmaterialer.

Underveis fattet Institutt for Klinisk Odontologi interesse for metoden og de ønsker å benytte den til analyser på bondingmaterialer. Disse materialene har noe lik sammensetning som resinbaserte tannfyllingsmaterialer. Bondingmaterialer skal gi god adhesjon mellom tannfyllingsmaterialet og tannsubstansene emalje og dentin. Dette oppnås ved å polymerisere et metakrylatbasert resin som gir mikromekaniske interaksjoner til en porøs, syrebehandlet tannoverflate. Vi ønsket derfor å:

4. Gjøre en kvalitativ analyse av innholdsstoffer fra et resinbasert bondingmateriale.

3. Metode og materialer:

3.1 Standarder, reagenser og løsemidler:

Alle standarder som er benyttet som referansesubstanser (Tabell 1) ble skaffet fra Sigma-Aldrich, Oslo, Norge. Etyl acetat, metanol og n-heksan er kjøpt fra Merck, Darmstadt, Tyskland. Diklormetan er levert av VWR International, Oslo, Norge.

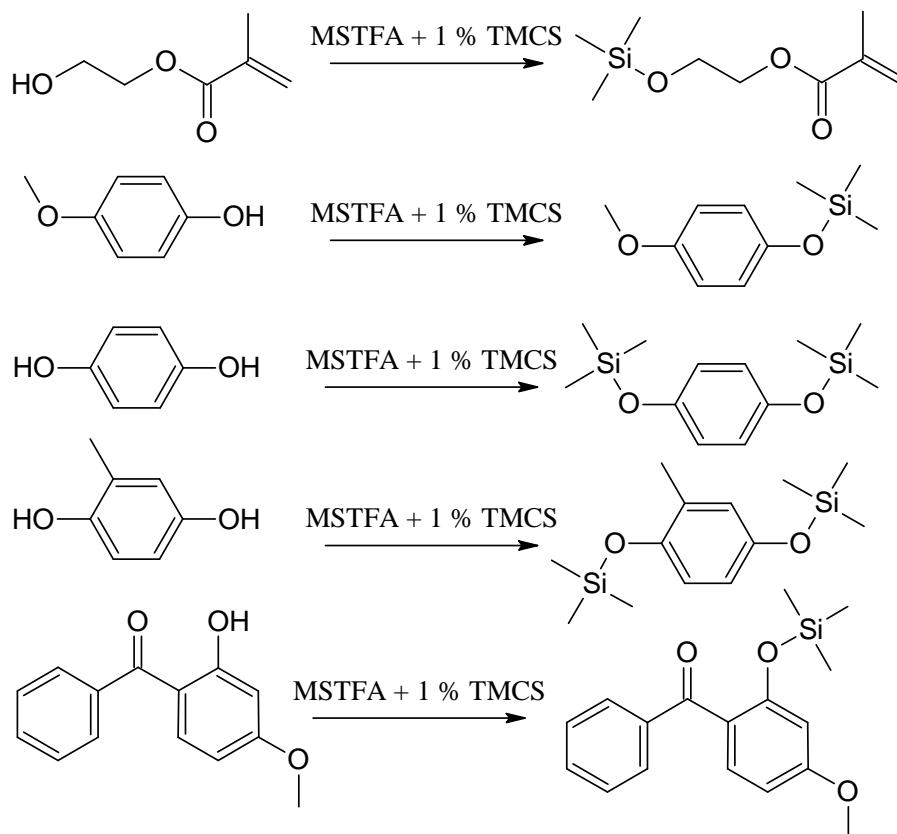
Argon (Ar) og helium (He) er levert av Yara, Norge. Metan (CH₄) er levert av Hydrogass Norge AS. Til produksjon av intern standard (hydrogenering av TEGDMA) ble hydrogengass (¹H₂) fra Yara, Norge benyttet. 10 % Pd/kull var skaffet fra Merck, Darmstadt, Tyskland, og Celite 545 var fra Kebo lab, Stockholm, Sverige. MSTFA + 1 % TMCS (N-metyl-N-trimetylsilyltrifluoroacetamid + 1 % trimetylklorosilan) er benyttet til derivatisering (QB Perbio; Pierce, Toronto, Canada). Prøvevialer (Glass vialer med kork og PTFE/silikon septum) til GC-MS er levert av Waters.

3M Espe Adper Scotchbond 1 XT bondingmiddel er levert av 3M, Norge.

Alle løsemidler og standarder ble analysert med fullscan GC-MS for å utelukke interfererende substanser.

3.2 Derivatisering:

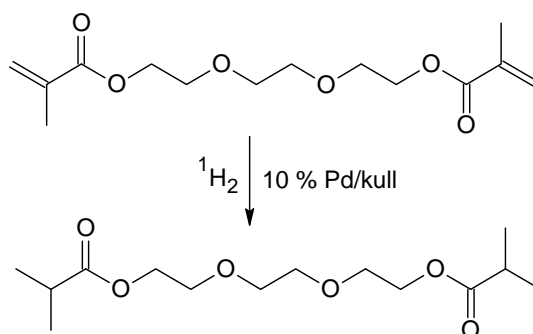
Alle analytter med derivatiserbare hydroksylgrupper ble forsøkt derivatisert med MSTFA + 1 % TMCS. Det ble tilsatt 10 µl MSTFA per 200 µl prøve. Etter tilsetting av MSTFA og intern standard ble prøvene varmet ved 60 °C i 2 timer (Figur 8). Forsøk viste at opprinnelig substans var udetekterbar etter 2 timer, men etter kortere tid kunne uderivatiserte analytter detekteres. BHT ville ikke la seg derivatisere fullstendig, sannsynligvis på grunn av sterisk hindring, og ble derfor videre behandlet som en uderiviserbar substans.



Figur 8: Derivatisering av HEMA, MEHQ, HQ, MHQ og HMBP

3.3 Intern standard:

Det ble benyttet en skreddersydd intern standard: Etan-1,2-diylbis(oxyetan-2,1-diyl) bis(2-metylpropanoat) (IS-TH). Den ble syntetisert på følgende måte: TEGDMA (0,5 ml, 1,6 mmol) ble løst i metanol (15 ml) og redusert ved hydrogenering med $^1\text{H}_2$ gass over 10 % Pd/kull ved 1 atm i 2 timer (Figur 9). Produktet ble filtrert gjennom en kolonne (Pasteur pipette) fylt med Celite 545. Analyse ble utført for å utelukke forurensinger. Deretter ble IS-TH fortynnet (1:10) for å gi passende detektorrespons. 1 μl intern standard ble tilsatt per 50 μl prøve under prøveopparbeidelse før hver analyse.



Figur 9: Hydrogenering av TEGDMA

3.4 Analytisk metode:

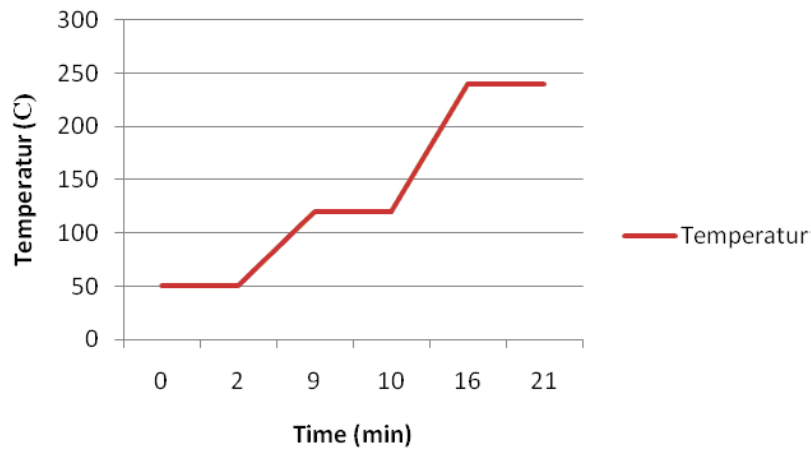
Alle analyser ble utført ved kombinert GC-MS og GC-MS/MS. Instrumentet var et Agilent Technologies 6890N Network GC system kombinert med Waters Micromass Quattro micro GC Mass Spectrometer. Instrumentet var utstyrt med Agilent Technologies 7683 Autosampler og 7683B series injector. Instrumentkontroll og databehandling utføres med programvaren MassLynx v4.1 (Waters Corp., Milford, Massachusetts, U.S.A.). Kolonnen som ble benyttet for kromatografisk separasjon er en "wall-coated open tubular (WCOT) low bleed fused silica" kapillærkolonne med kolonnenlengde 30 m, 0,25 mm indre diameter og filmtykkelse på 0,25 μm ((5% fenyl)-metylpolysiloksan) (DB-5MS, J&W Scientific). Helium er benyttet som bærergass med statisk trykk på 60kPa. Splittløs injeksjon ble benyttet med injektortemperatur på 250 °C og septumspyling med trykk på 50 kPa etter 2 minutter.

For å oppnå tilfredsstillende separasjon ble følgende temperaturprogram brukt: Starttemperatur på 50 °C i 2 min, deretter økes temperaturen med en rate på 10 °C/min til 120 °C hvor den holdes i 1 minutt. Så økes temperaturen med en rate på 20 °C/min til 240 °C hvor den holdes i 5 minutter. Total tid er 21 minutter (Figur 10).

Injeksjonssprøyten ble før og etter injisering vasket først med diklormetan x 3 og deretter n-heksan x 3. Ved kjemisk ionisasjon (CI) ble metan benyttet som ionisasjonsgass med gasstrøm på 24ml min⁻¹. Elektronenergien var 70 eV ved EI og 30 eV ved CI. Ved MS/MS ble argon (Ar) brukt som kollisjonsgass (3×10^{-4} mbar).

Alle forbindelser ble løst i etylacetat. Det ble tatt opp massespekter for referansesubstanser og intern standard i deteksjonsområdet 50-320/350 (50-350 for enkelte forbindelser) m/z. For hver av substansene, inkludert derivatiserte, ble to karakteristiske fragmenter selektert til bruk i SIM-modus (Tabell 3, Tabell 4). Dette ble gjort med både EI og CI som ionekilde. Det ble også gjort forsøk med GC-MS/MS og CI. Et karakteristisk fragment ble selektert for hver forbindelse. Det ble utført datterscan av alle forbindelser med varierende kollisjonsenergi, for å fastslå hva som gav mest hensiktsmessig fragmentering (få og intense ioner). MRM (*Multiple Reaction Monitoring*) ble deretter utført med selekterte masser og kollisjonsenergi som vist i Tabell 5. Ioner ble selektert for å gi best kompromiss mellom sensitivitet og selektivitet. Det ble kun utført bestemmelse av LOD/LOQ ved MRM.

Temperaturprogram



Figur 10: Temperaturprogram GC

Tabell 3: Karakteristiske og intense fragmenter ved GC-MS (SIM), EI og CI

Forbindelse	Molekylion (m/z)	SIM	
		EI (m/z)	CI (m/z)
BHT	220	205 ^a , 220	205 ^a , 220
BI	204	127, 204 ^a	78, 204 ^a
CQ	166	95 ^a , 138	139, 167 ^a
DEGDMA	242	69 ^a , 113	69, 113 ^a
DMABEE	193	148 ^a , 193	148, 194 ^a
EGDMA	198	69 ^a , 113	69, 113 ^a
HEMA	130	69 ^a , 87	69 ^a , 131
HMBP	228	151, 227 ^a	151, 229 ^a
HQ ^b	110	82 ^a , 108 & 81 ^a , 110	82, 109 ^a & 61, 111 ^a
MEHQ	124	109 ^a , 124	108, 124 ^a
MHQ ^b	124	94, 122 ^a & 95 ^a , 124	94, 123 ^a & 95, 125 ^a
TEGDMA	330	69 ^a , 113	69, 113 ^a
TEGDMA	286	69 ^a , 113	69, 113 ^a
TMPTMA	338	69 ^a , 253	69, 253 ^a

^a Det mest intense ionet, brukt til kvantifisering, ^b Eluerer i to topper

Tabell 4: Karakteristiske og intense fragmenter for derivatiserbare forbindelser benyttet i SIM, EI og CI

Forbindelse	Molekylion (m/z)		SIM			
			EI (m/z)		CI (m/z)	
	Uderivatisert	Derivatisert	Uderivatisert	Derivatisert	Uderivatisert	Derivatisert
HEMA	130	202	69 ^a , 87	88, 103 ^a	69 ^a , 131	113 ^a , 187
HMBP	228	300	151, 227 ^a	269, 285 ^a	151, 229 ^a	285 ^a , 301
HQ ^b	110	254	82 ^a , 108 & 81 ^a , 110	239, 254 ^a	82, 109 ^a & 61, 111 ^a	239, 254 ^a
MEHQ	124	196	109 ^a , 124	181 ^a , 196	108, 124 ^a	181, 196 ^a
MHQ ^b	124	268	94, 122 ^a & 95 ^a , 124	237, 268 ^a	94, 123 ^a & 95, 125 ^a	253, 268 ^a

^a Det mest intense ionet, brukt til kvantifisering, ^b Eluerer i to topper

Tabell 5: Karakteristiske og intense fragmenter for GC-MS/MS og MRM med CI, og kollisjonsenergi brukt

Forbindelse	Foreldreion (m/z)	Kollisjonsenergi (eV)	Datterion (m/z)
BHT	205	10	177
BI	204	15	77
CQ	167	10	139
DEGDMA	113	10	69
DMABEE	194	10	166
EGDMA	113	10	69
HEMA TMS (derivat)	187	10	69
HMBP TMS (derivat)	285	25	242
HQ TMS (derivat)	254	15	239
MEHQ TMS (derivat)	196	15	181
MHQ TMS (derivat)	268	20	179
TEEGDMA	113	10	69
TEGDMA	113	10	69
TMPTMA	253	10	69

3.5 Validering:

Metoden skulle valideres i følge Tabell 2: Valideringsparametere for GC-MS kvantifisering. Dessverre oppstod en feil med MS-instrumentet slik at det ikke var mulig å få CI-gass inn i ionekilden. Metoden har derfor ikke latt seg validere som planlagt.

Deteksjonsgrense (LOD) og kvantifiseringsgrense (LOQ): LOD er definert som $S/N > 3$ (signal-til-støy-forhold). LOQ er definert som $S/N > 10$.

LOD og LOQ ble bestemt ved å analysere referansesubstanser i konsentrasjoner fra 0,001 til $50 \mu\text{g ml}^{-1}$ for de tre ulike metodene (GC-MS EI og CI, GC-MS/MS)

Linearitet: Hver av referansesubstansene skulle analyseres i 5 konsentrasjoner (Tabell 6). Standardkurver hvor forholdet mellom arealet til analytten i forhold til intern standard plottes mot analyttens konsentrasjon.

Nøyaktighet: Alle forbindelsene skulle testes i 2 konsentrasjoner, 3 paralleller.

Presisjon: Skulle beregnes for alle forbindelsene i 2 konsentrasjoner og gis som standardavvik (S.D.) og relativt standardavvik (R.S.D.) mellom gjentatte analyser og analyser utført ulike dager.

Tabell 6: Konsentrasjoner for bestemmelse av linearitet GC-MS CI

Forbindelser	Konsentrasjoner ($\mu\text{g ml}^{-1}$)
HQ TMS, MHQ TMS	0,001 – 0,01 – 0,1 – 1 – 10
MEHQ TMS	0,01 – 0,1 – 1 – 5 – 25
BHT, BI, CQ, HEMA TMS	0,1 – 1 – 5 – 25 – 50
DMABEE, HMBP TMS, TMPTMA	1 – 5 – 10 – 25 – 50
DEGDMA, EGDMA	5 – 10 – 15 – 25 – 50
TEEGDMA, TEGDMA	10 – 20 – 30 – 40 – 50

4. Resultater og diskusjon:

4.1 GC og LC:

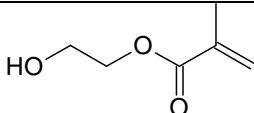
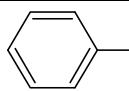
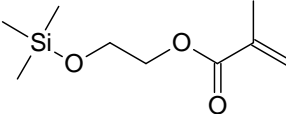
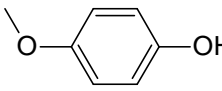
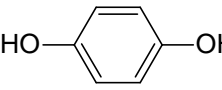
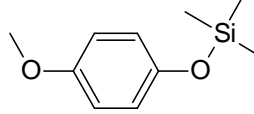
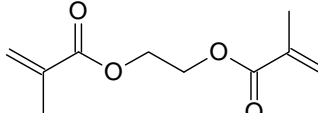
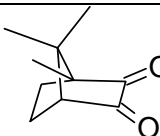
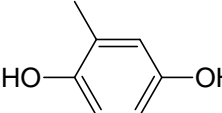
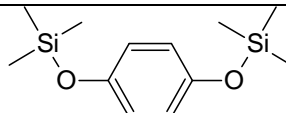
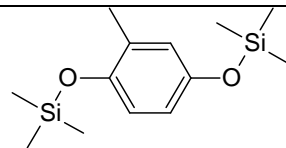
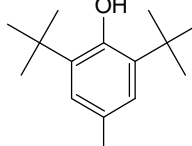
På tross av at kompositter er tannfyllingsmaterialene som dominerer i bruken i Skandinavia, er disse materialene ikke stabile mot degradering og erosjon. Det er rapportert bivirkninger både hos pasienter og tannhelsepersonell. For å utvikle sikre arbeidsrutiner og sikrere resinbaserte materialer er evaluering av disse nødvendig [3, 4, 64]. Organiske forbindelser som lekker ut fra resinbaserte materialer, har blitt identifisert i mange studier [19-21, 24, 26, 44-56]. GC-MS har vist seg å være en velegnet metode for analyser av lipofile substanser med lav molekylvekt [21, 45, 51, 54, 55]. Analyser med GC-MS krever forbindelser som er flyktige og stabile under typiske GC-forhold. Mer polare monomerer og monomerer med høy molekylvekt, som Bis-GMA, Bis-EMA og UDMA, egner seg dårlig til GC. Det er antatt at disse desintegrerer ved injektortemperaturer som benyttes ved GC. Av denne grunnen har mange studier benyttet væskechromatografi (LC, HPLC) ved analyse av odontologiske materialer [24, 39, 46, 48, 49, 52, 56]. Ved bruk av kun GC-MS oppnår en derfor ikke et komplett bilde av utlekkstoffene, men ved å kombinere med moderne LC-MS kan man oppnå et mer fullstendig bilde.

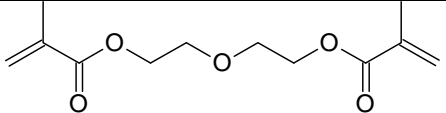
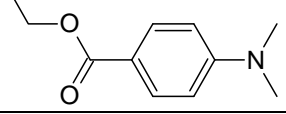
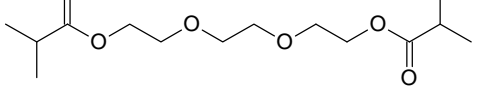
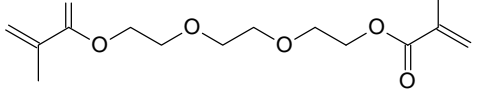
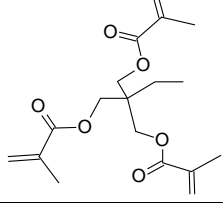
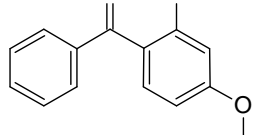
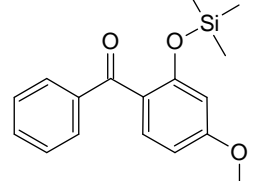
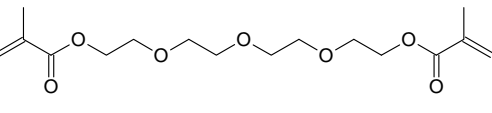
4.2 Selektivitet:

Ulike detektorer har vært benyttet ved analyser av resinbaserte materialer. Ved bruk av en ikke-selektiv detektor, som UV, vil identifikasjon ofte være basert kun på retensjonstid. Ulike forbindelser kan ha samme retensjonstid og man vil kunne få uriktig identifisering og systematiske feil i kvantifiseringen. Ved å benytte MS som detektor, kan dette problemet unngås og vi får både en selektiv og sensitiv deteksjon.

Ved identifisering av eluerende substanser fra tannfyllingsmaterialer vil en identisk retensjonstid, og et identisk massespekter til en referansesubstans kunne bekrefte identitet. For noen forbindelser har vi ikke tilgang til en referansesubstans fordi stoffene ikke er kommersielt tilgjengelige. Dette vanskeliggjør en sikker identifisering. Dersom det ikke finnes referansespektra i bibliotekene og referansesubstanser ikke er tilgjengelige, kan man manuelt tolke massespektrene for å få strukturinformasjon. Ved karakterisering av massespektra er det naturlig å ta utgangspunkt i de høyeste massene, da disse vil være mest strukturspesifikke. Den høyeste massen vi kan finne er molekylionets (M^{+}) masse, eventuelt det protonerte molekylionet ($[M+H]^{+}$) ved Cl. Enkelte forbindelser gav også addukter med Cl-gass (HQ TMS, MHQ TMS, DMABEE) og gav fragment med masse $[M^{+}+29]$ (Figur 16, Figur 17). Dette skyldes reaksjon med $C_2H_5^{+}$.

Tabell 7: Retensjonstid, monoisotopisk masse, molkeyl- og strukturformel for analyttene og intern standard

Forbindelse	RT (min)	Monoisotopisk masse (Da)	Molekylformel	Strukturformel
HEMA	8,0	130.06	C ₆ H ₁₀ O ₃	
BI	8,5	203.94	C ₆ H ₅ I	
HEMA TMS	10,4	202.10	C ₉ H ₁₈ O ₃ Si	
MEHQ	11,5	124.05	C ₇ H ₈ O ₂	
HQ	12,5	110.04	C ₆ H ₆ O ₂	
MEHQ TMS	12,5	254.12	C ₁₂ H ₂₂ O ₂ Si ₂	
EGDMA	12,7	198.09	C ₁₀ H ₁₄ O ₄	
CQ	12,8	166.10	C ₁₀ H ₁₄ O ₂	
MHQ	13,3	124.05	C ₇ H ₈ O ₂	
HQ TMS	13,6	254.12	C ₁₂ H ₂₂ O ₂ Si ₂	
MHQ TMS	14,2	268.13	C ₁₃ H ₂₄ O ₂ Si ₂	
BHT	14,7	220.18	C ₁₅ H ₂₄ O	

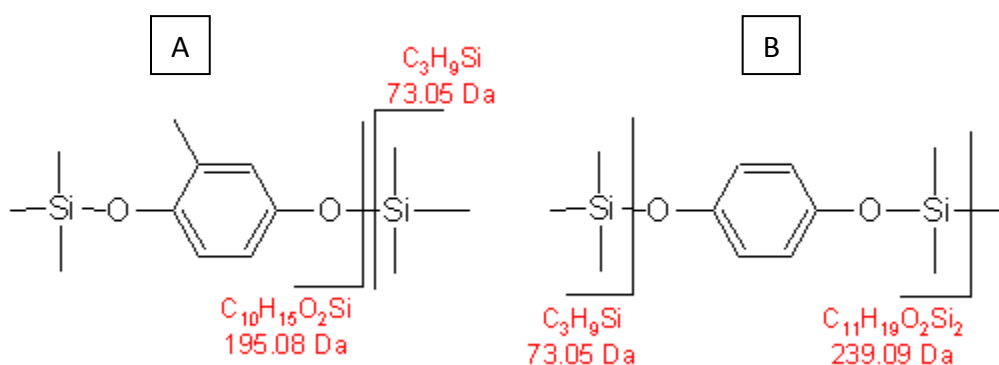
DEGDMA	15,4	242.12	C ₁₂ H ₁₈ O ₅	
DMABEE	16,3	193.11	C ₁₁ H ₁₅ NO ₂	
IS-TH	16,9	290.17	C ₁₄ H ₂₆ O ₆	
TEGDMA	17,3	286.14	C ₁₄ H ₂₂ O ₆	
TMPTMA	18,5	338.17	C ₁₈ H ₂₆ O ₆	
HMBP	19,0	228.08	C ₁₄ H ₁₂ O ₃	
HMBP TMS	19,4	300.12	C ₁₇ H ₂₀ O ₃ Si	
TEEGDMA	19,8	330.17	C ₁₆ H ₂₆ O ₇	

Et problem med flere av substanser som benyttes i tannfyllingsmaterialer er at de fragmenteres lett ved EI og gir lite eller ikke noe molekylion (Figur 12, Figur 13, Figur 14). Kvantitative analyser må da baseres på målinger av fragmenter med lave masser som gir lite selektive metoder. Bruk av CI gir en mer skånsom fragmentering av molekylet i ionekilden, og dermed fragmenter med høyere masse. I motsetning til EI kunne molekylionet [M]⁺ eller det protonerte molekylionet [M+H]⁺ alltid detekteres ved bruk av CI (Figur 12). Molekylionet vil være analyttens mest selektive fragment, og vil sammen med retensjonstid kunne gi en rimelig sikker identifisering (Tabell 7). CI gir derfor mer selektive analyser enn EI. En ulempe med CI er at massespekteret ikke inneholder tilstrekkelig fragmenteringsinformasjon til å være søkbare i et bibliotek i de tilfeller hvor ukjente forbindelser er tilstede.

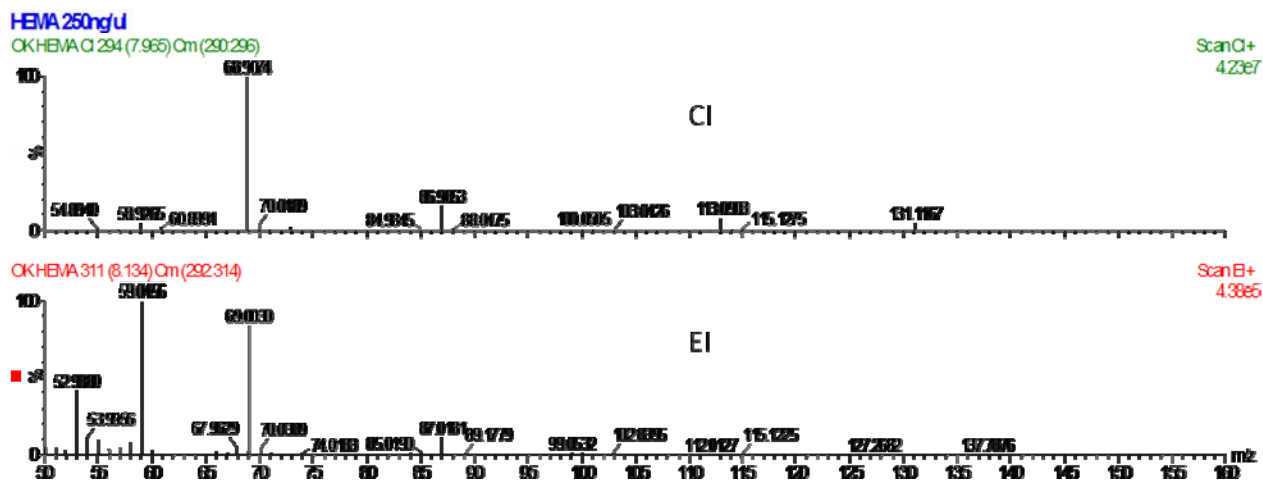
To karakteristiske ioner selekteres for SIM (Tabell 3, Tabell 4). Karakteristiske fragmenter med høy masse prioriteres fremfor fragmenter med høyere intensitet, men med lav, mindre selektiv masse. Om høyre sensitivitet ønskes kan et mer intenst fragment selekteres for skanning (med påfølgende tap av selektivitet). Der to stoffer eluerer sammen må unike fragmenter velges. Det mest intense fragmentet brukes til kvantifisering, mens det andre er et kvalifiseringsion for å kunne utelukke eventuelle ukjente, samtidig eluerende substanser. Intensitetsforholdet mellom fragmentene er karakteristisk for analytten. Et problem er at ved svært lave konsentrasjoner kan kvalifiseringsion være udetekterbart og selektivitet blir noe redusert.

GC-MS/MS og MRM vil kunne gi enda mer selektive analyser siden man da monitorerer og detekterer karakteristiske massefragment-overganger. Det mest intense, karakteristiske ionet velges som foreldreion og fragmenteres i kollisjonscellen. Ved å studere massespektra av denne fragmenteringen kunne karakteristiske massetap identifiseres og datterion selekteres. Et lite problem med de silylerte forbindelsene var at de mest intense ionene gav massetap som ikke kommer fra opprinnelig molekyl, men stammer fra fragmentering av trimetylsilyl-gruppen (Figur 11, Figur 14, Figur 17). Fragmenter eller massetap som stammer fra trimetylsilyl-gruppen er ikke selektive for det opprinnelige molekylet og vil kunne stamme fra interfererende substanser. En avveing mellom selektivitet og sensitivitet ble gjort.

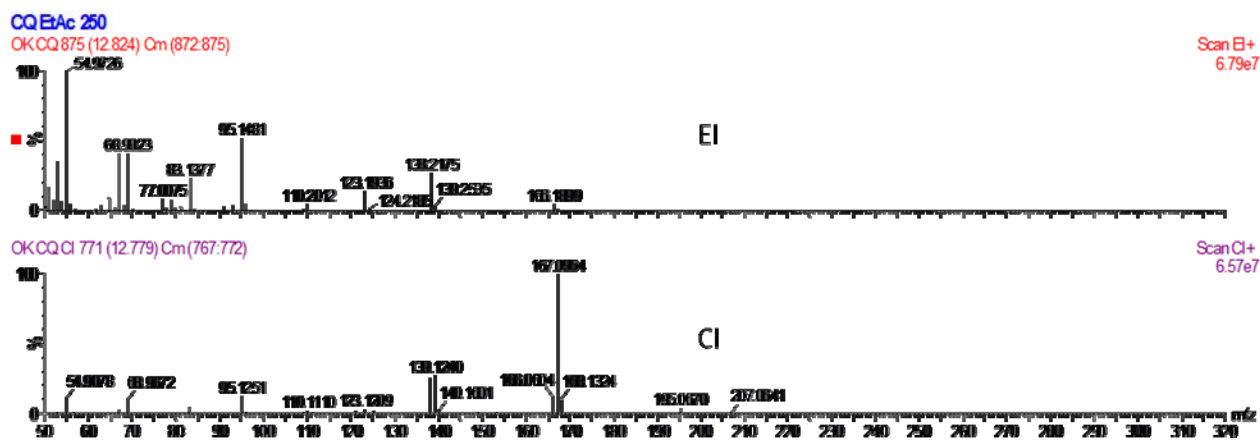
Det ble gjort forsøk med MRM og CI, men med stort fall i sensitivitet for flere forbindelser i forhold til SIM ble MRM-metoden ikke videreutviklet (Tabell 8, Tabell 9). Videre arbeid kan trolig optimalisere betingelsene for MS/MS (særlig i kollisjonscellen) slik at sensitivitet kan bevares og selektivitet i forhold til singel MS og SIM økes.



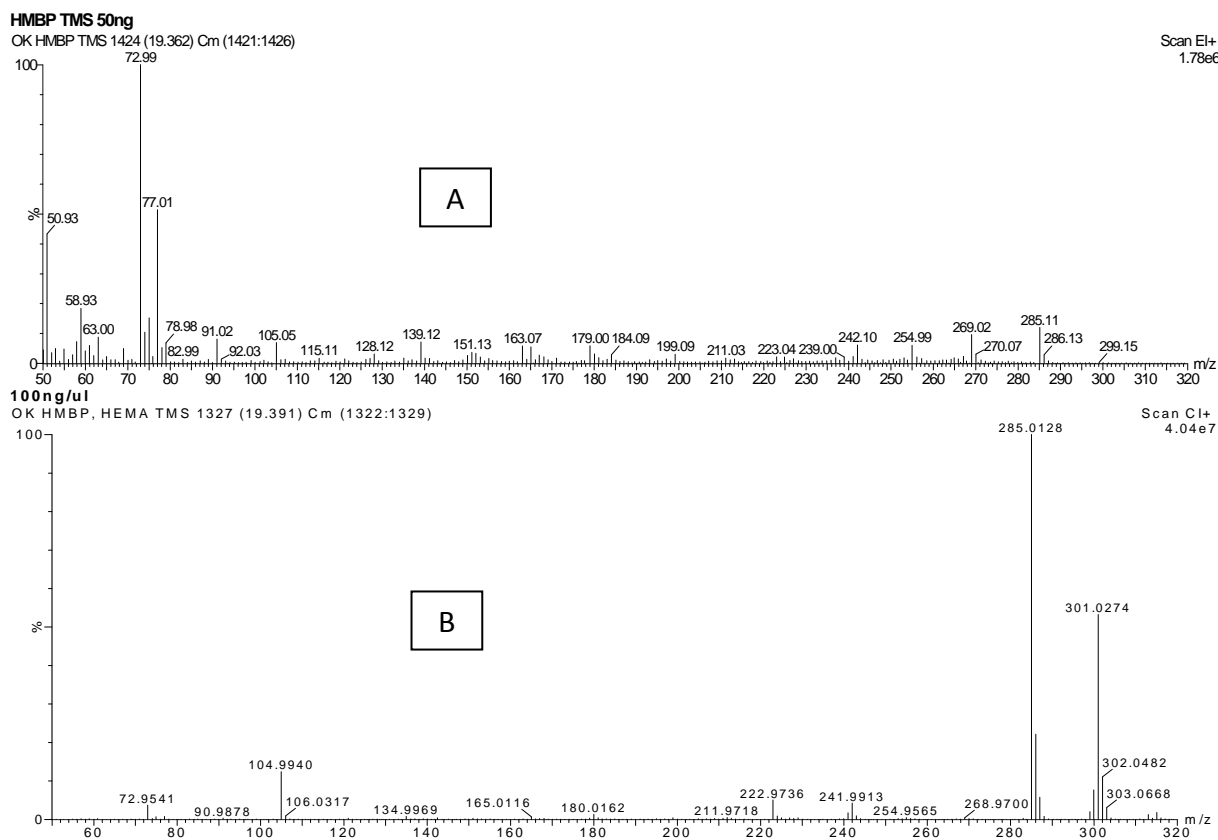
Figur 11: MRM fragmentering av MHQ TMS (A) og HQ TMS (B)



Figur 12: Massespektra av HEMA med CI og EI. ($M^{++} = 130.1$ Da, $[M+H]^+ = 131,1$ Da)



Figur 13: Massespektra av CQ med EI og CI. ($M^{++} = 166.1$ Da, $[M+H]^+ = 167.1$ Da)



Figur 14: EI- (A) og CI- (B) spektra av HMBP TMS ($M^{**}=300.1$ Da, $[M+H]^+ = 301.1$ Da). Figuren viser at EI gir fragment med høy intensitet ved $m/z=73$. Dette er trimetylsilyl-gruppen og ikke selektiv for HMBP TMS.

4.3 Sensitivitet:

Det ble vist at CI er en mer følsom metode for kvantifisering av resinbaserte utlekkstoffer for flere av forbindelsene, enn EI. Skånsom ionisering, med påfølgende mindre fragmentering gir fragmenter med høyere masse og med større intensitet (Figur 13). Når den totale ionestrømmen fordeles på færre fragmenter medfører dette en økning i sensitiviteten til metoden. Fragmentet som benyttes til kvantifisering ved SIM har for flere av forbindelsene stor økning i intensitet i forhold til EI (Tabell 8, Tabell 9, Figur 13- 17). CI i kombinasjon med silylerte analytter gav spesielt god sensitivitet. Det kan tyde på at temperaturstabilitet fra derivatiseringen i kombinasjon med mer skånsom ionisering gir svært intense fragmenter med høy masse, noe som da gir bedre sensitivitet og selektivitet. (Figur 17). Silylert HQ og MHQ kunne detekteres i konsentrasjoner ned til 1 ng ml^{-1} (2 pg på kolonnen) (Figur 24).

Et ønske var å utvikle en GC-MS/MS-metode (MRM) med økt selektivitet og sensitivitet. Fragmenteringen av foreldreionet er avhengig av både gasstrykket i kollisjonscellen og kollisjonsenergien. Ulike trykk i kollisjonscellen i kombinasjon med ulike kollisjonsenergi ble forsøkt for å finne en kombinasjon som gav de beste datterscan med få og intense ioner. Sensitivitet oppnås hovedsakelig ved at mesteparten av støy fjernes og dermed senkes LOD

og LOQ. I dette tilfellet ble støyen halvert, men samtidig tap av intensitet gjorde sensitiviteten dårligere enn ved bruk av GC-MS, særlig for silylerte forbindelser.

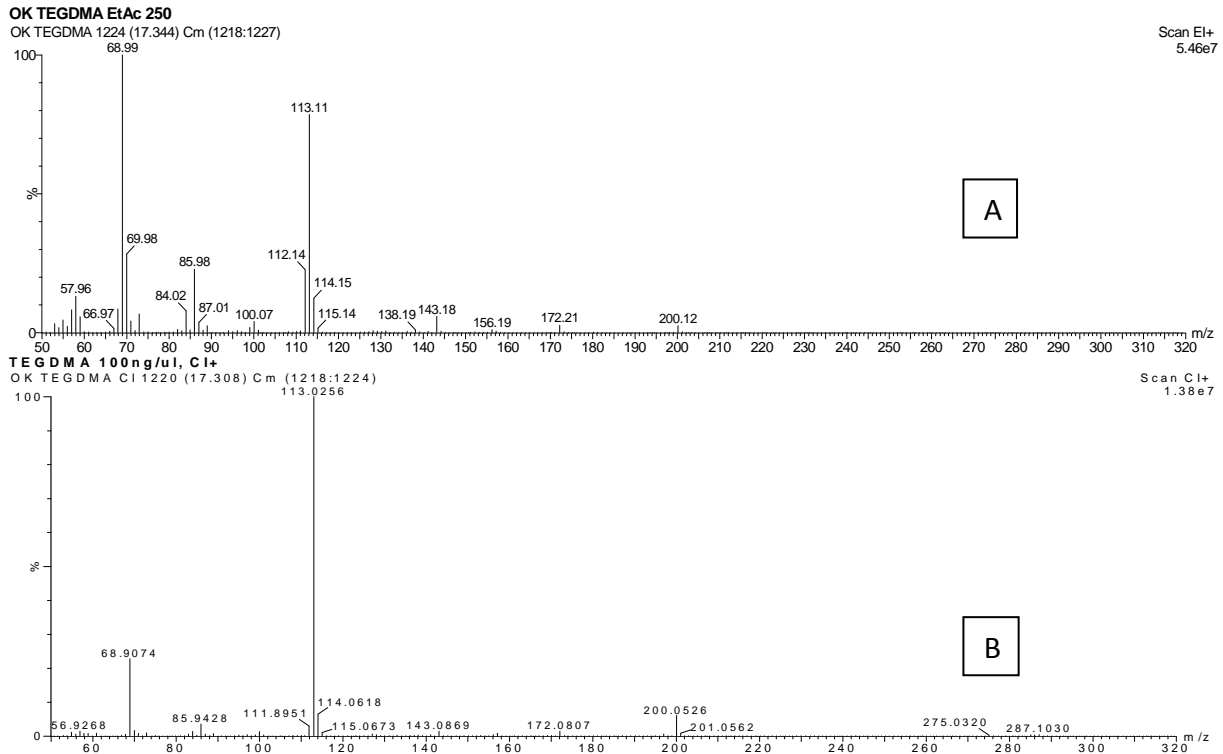
LOD for de ulike forbindelsene varierte veldig; fra 2 pg på kolonnen (LOQ) for HQ TMS og MHQ TMS ved CI, til ca. 20 ng på kolonnen for enkelte av monomerene ved EI (Tabell 8, Tabell 9). Et generelt trekk er at monomerene gir dårligere kromatografi ved svært lave konsentrasjoner og vi får haledannelse og lignende. Noen av stoffene gir symmetriske, smale topper ned til LOD, særlig BHT, BI, CQ og de derivatiserte forbindelsene.

Tabell 8: LOD for referansesubstanser (antall ng på kolonne) for alle metodene

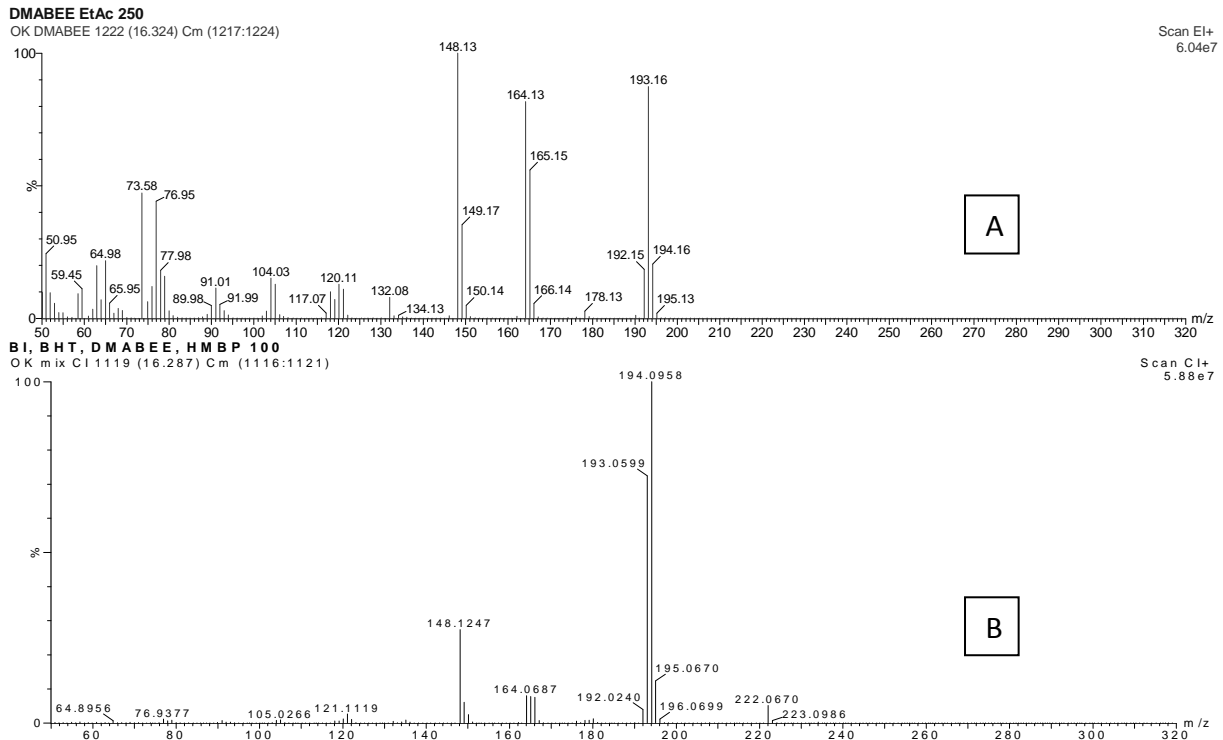
Forbindelse	SIM		MRM
	EI (ng på kolonne)	CI (ng på kolonne)	CI (ng på kolonne)
BHT	<5	<0,1	0,2
BI	<<5	<0,1	2
CQ	<2	<0,1	0,2
DEGDMA	5	1	20
DMABEE	10	0,1	2
EGDMA	<5	1	2
TEEGDMA	10	>2,5	20
TEGDMA	10	2,5	20
TMPTMA	<5	0,25	2

Tabell 9: LOD for silylerte referansesubstanser (antall ng på kolonne) for alle metodene

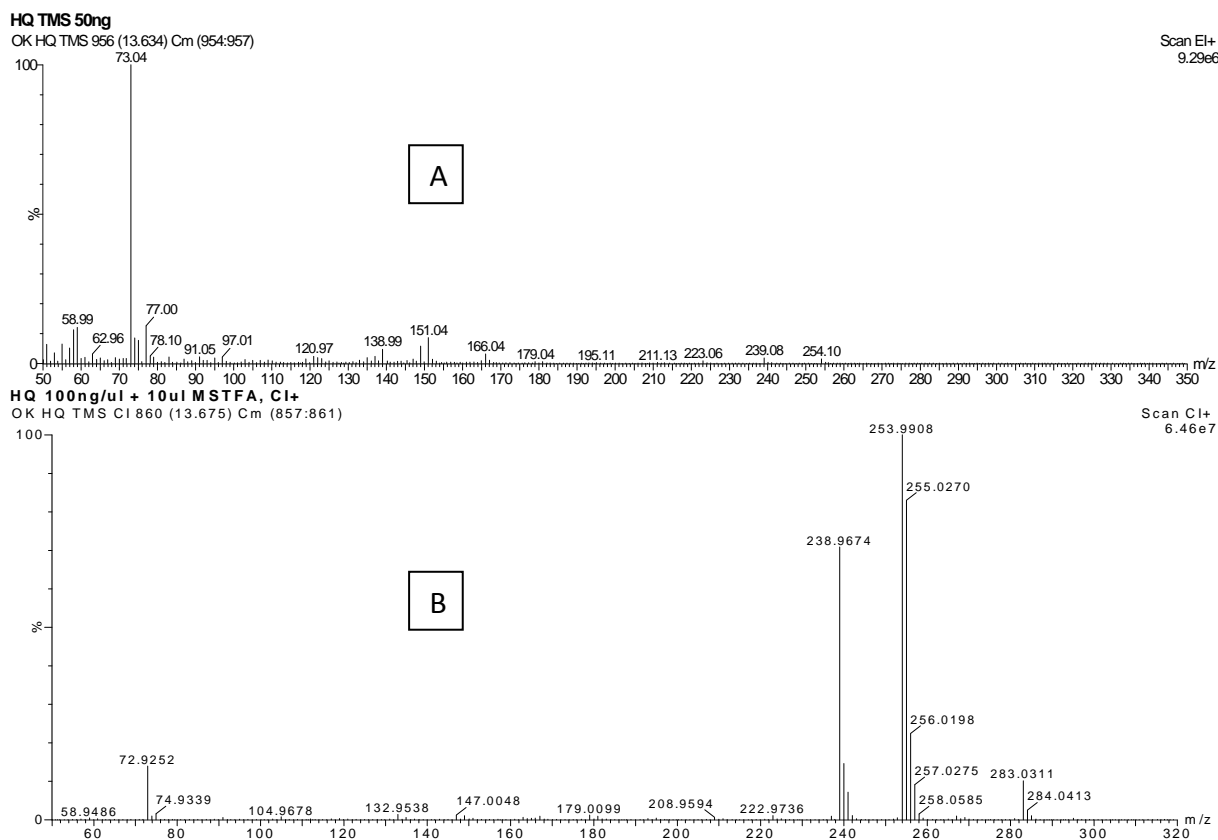
Forbindelse	MS				MS/MS
	EI		CI		CI
	Uderivatisert (ng på kolonne)	Derivatisert (ng på kolonne)	Uderivatisert (ng på kolonne)	Derivatisert (ng på kolonne)	Derivatisert (ng på kolonne)
HEMA	5-20	<1	5	0,02	1
HMBP	20	2,5-10	>5	<2	1
HQ	To topper	<1	To topper	<0,002	0,1
MEHQ	5	1	---	0,002	1
MHQ	To topper	<1	To topper	<0,002	0,1



Figur 15: EI- (A) og CI- (B) spektra av TEGDMA. Figuren viser tydelig at CI-spektra gir et svakt $[M+H]^+$ -signal ($m/z=287,1$), samt mindre grad av fragmentering enn i EI spekteret.



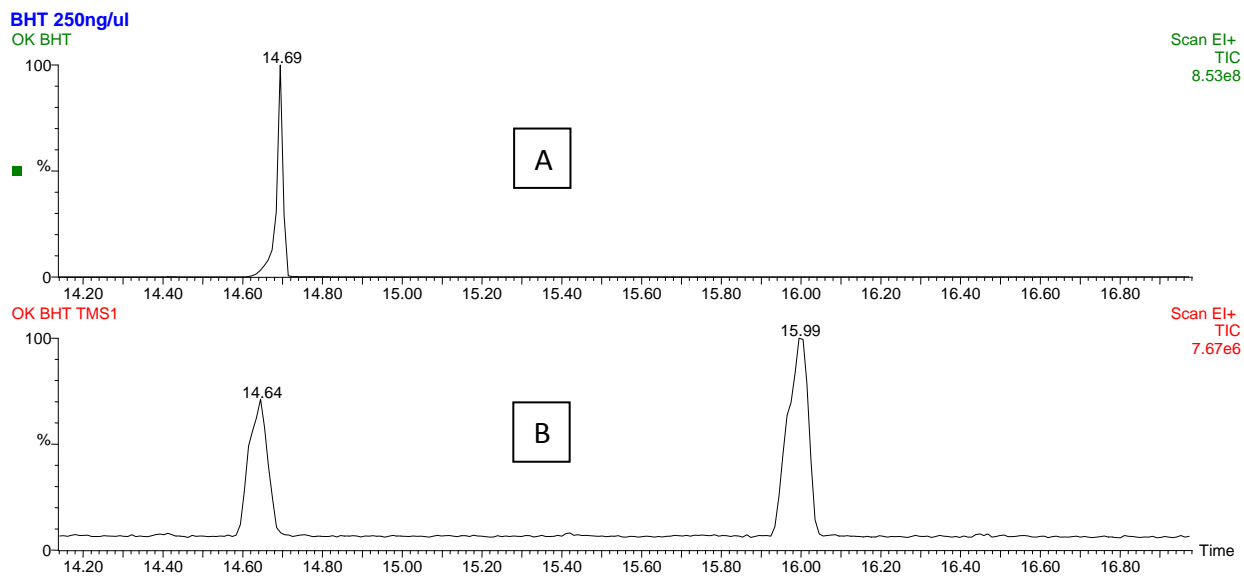
Figur 16: EI- (A) og CI- (B) spektra av DMABEE ($M^+=193.1$ Da, $[M+H]^+ = 194.1$ Da). Figuren viser klart mindre grad av fragmentering ved CI.



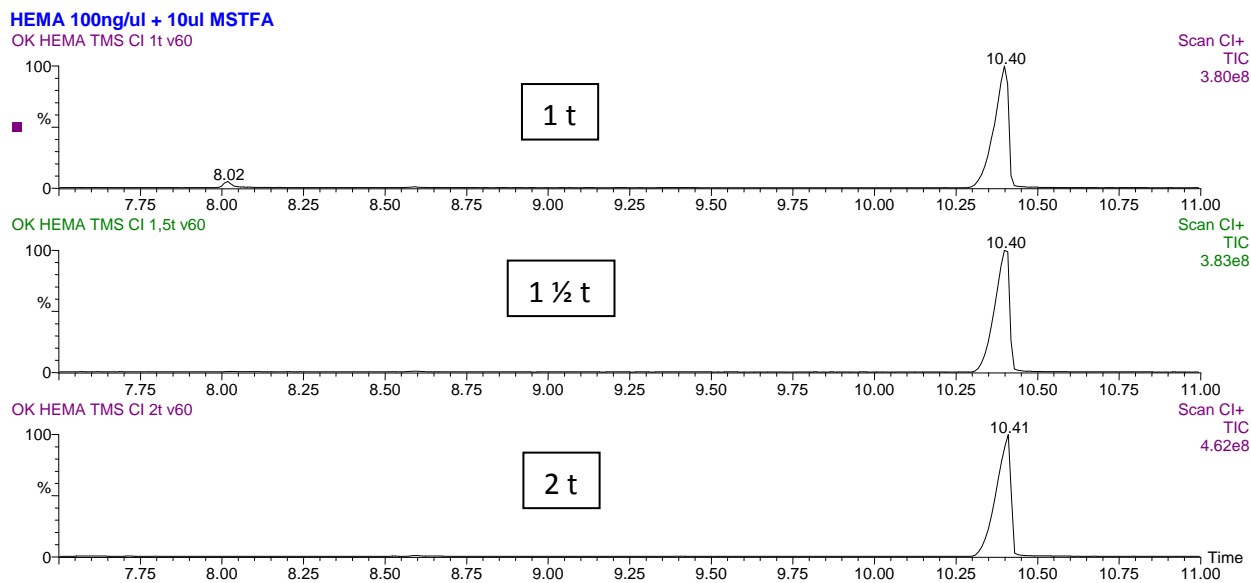
Figur 17: EI- (A) og CI- (B) spektra av HQ TMS ($M^{+}=254.1$ Da, $[M+H]^{+} = 255.1$ Da). Figuren viser blant annet et HQ TMS $C_2H_5^{+}$ addukt ($m/z=283$)

4.4 Derivatisering:

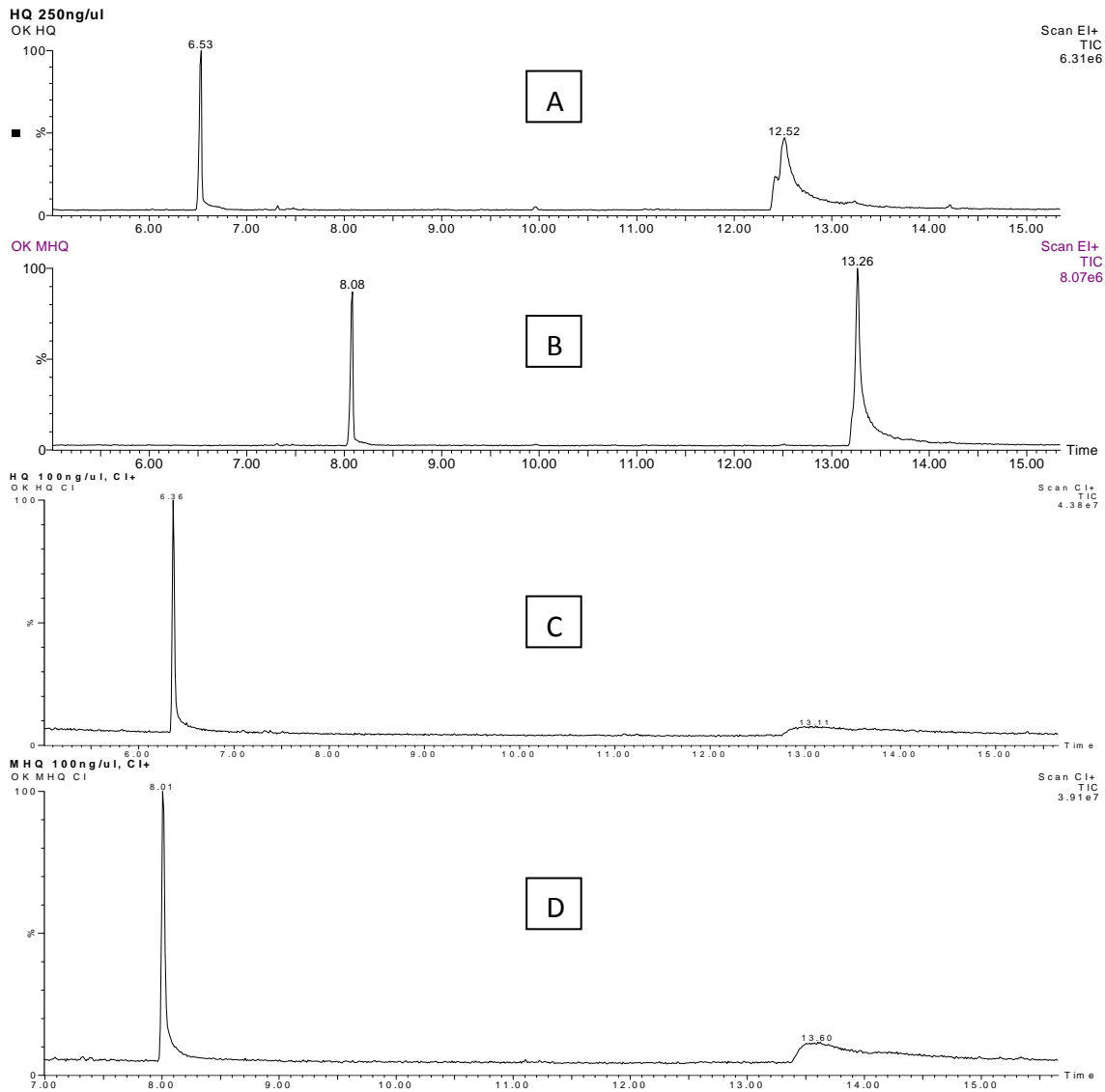
GC-MS egner seg ikke til svært polare molekyler p.g.a. dårlig flyktighet. For å bedre stoffenes flyktighet og temperaturstabilitet kan man benytte derivatisering. Michelsen et al. hadde blant annet problemer med å oppnå pen kromatografi av noen substanser med lav molekylvekt, som MEHQ. Vi ønsket å forsøke å silylere aktuelle referansesubstanser for å se om dette kunne gi bedre kromatografi for disse stoffene. MSTFA ble benyttet som derivatiseringsreagens. HEMA, MHQ, HQ, MEHQ, HMBP og BHT ble forsøkt derivatisert da alle disse har en eller to hydroksylgrupper som er mål for silyleringsreagenset. Etter tilsetting av derivatiseringsreagens ble prøveglassene varmet ved 60 °C i ulike tidsrom. Det ble vist at BHT vanskelig lot seg derivatisere fullstendig (Figur 18). Dette kan skyldes sterisk hindring fra de to tert-butyl gruppene i molekylet. Uderivatisert BHT gav symmetriske og smale topper (Figur 18) og dette kan støtte hypotesen om en sterisk hindret OH-gruppe, siden OH-gruppen ville kunne interagert med stasjonærfasen og gitt dårlig kromatografi. BHT viste god sensitivitet og selektivitet uten silylering og ble videre behandlet som en uderivatisert substans. De andre stoffene viste seg å være fullstendig derivatisert etter 2 timer ved 60 °C. Etter 1 time kunne det fortsatt detekteres små mengder uderivatisert HEMA (Figur 19).



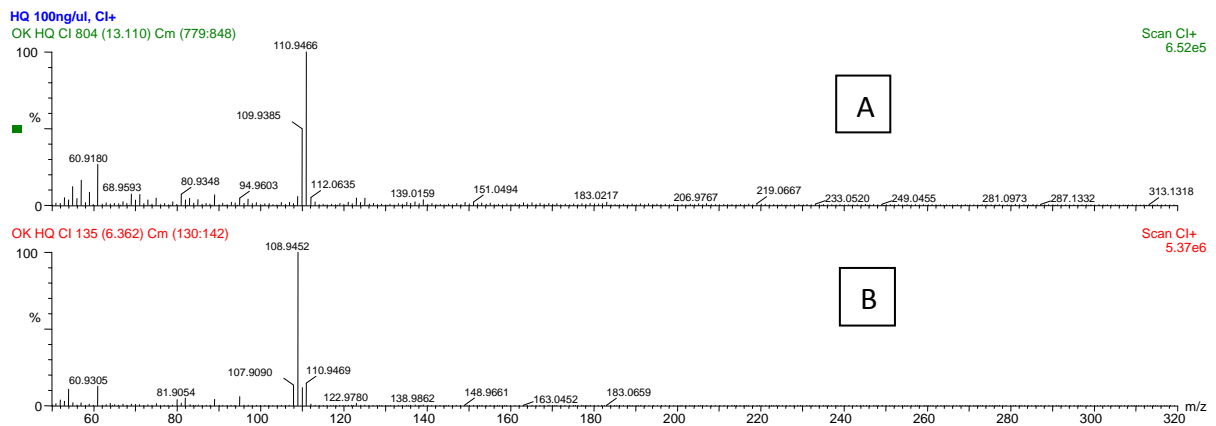
Figur 18: Kromatogram av BHT (A) og ufullstendig derivatisert BHT (B)



Figur 19: Kromatogram som viser silylering av HEMA ved 60 °C etter 1, 1 1/2 og 2 timer. (HEMA: RT=8.02 min, HEMA TMS: RT=10.4 min)



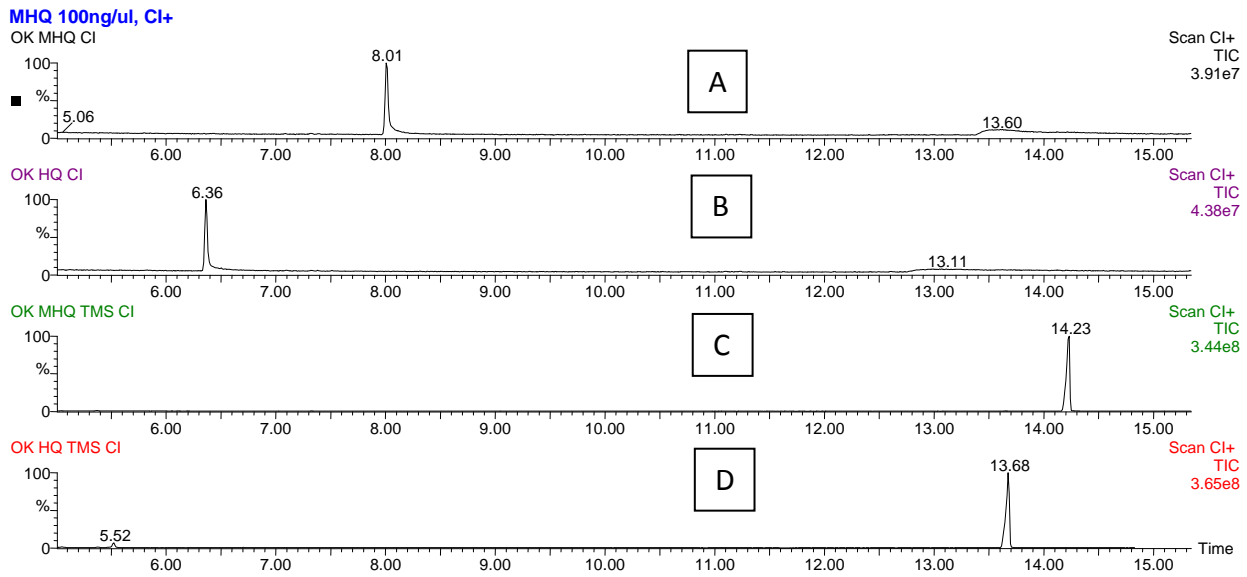
**Figur 20: Kromatogram av HQ ved EI (A) og CI (C), og MHQ ved EI (B) og CI (D).
HQ: RT=6,53/6,36 og 12,52/13,11 min (EI/CI). MHQ: RT=8,01/8,08 og 13,26/13,60 min (EI/CI).**



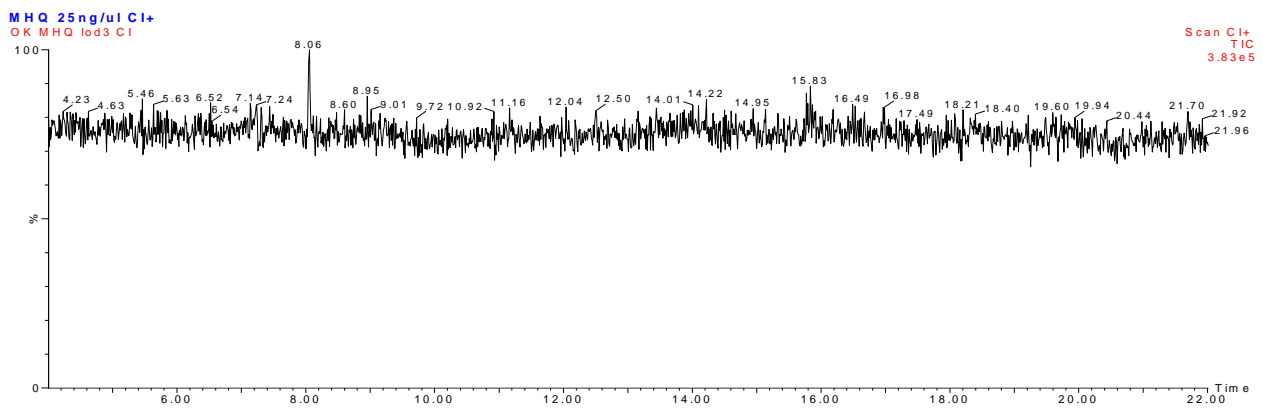
Figur 21: CI-spektra av de to toppene fra HQ ved retensjonstid 6,36 (B) og 13,11 min (A). ([M+H]⁺=111 Da)

HQ og MHQ vil uderivatisert produsere to topper i kromatogrammet (Figur 20) med over 5 min forskjell i RT. Det første eluerende stoffet har M^{+} eller $[M+H]^{+}$ to masseenheter lavere enn stoff nummer to (Figur 21). Eluatet med fragment som hadde masseladningsforhold lik referansesubstansens monoisotopiske masse eluerte sist. Ved EI var forholdet mellom toppene i kromatogrammet mer jevnt enn ved CI, hvor store deler eluerte i første toppen (Figur 20). Dette kan muligens skyldes dekomponering i injektoren, men siden problemet elimineres med derivatisering (Figur 22) ble ikke videre undersøkelser gjort. To topper i kromatogrammet vil gjøre kvantifisering vanskelig, da forholdet mellom toppene ikke trenger å være konstant. HQ og MHQ gav i tillegg lite sensitive analyser usilylert (Figur 23) og gav dårlige topper (Figur 20). Etter derivatisering derimot var sensitiviteten bedret flere ganger ved bruk av CI (Tabell 9, Figur 24). 2 pg på kolonnen kunne detekteres og kvantifiseres for HQ TMS og MHQ TMS. Derivatisering gav generelt bedret sensitivitet (Tabell 9) og bedre kromatografi (smalere og mer symmetriske topper) for alle de silylerte substansene (Figur 25, Figur 26). Ved at prøveløsningen deles i to, der en del tilsettes MSTFA og den andre delen kun tilsettes intern standard unngår man eventuelle uønskede reaksjoner mellom MSTFA og analytter som man ikke ønsker derivatisert (som BHT) (Figur 27).

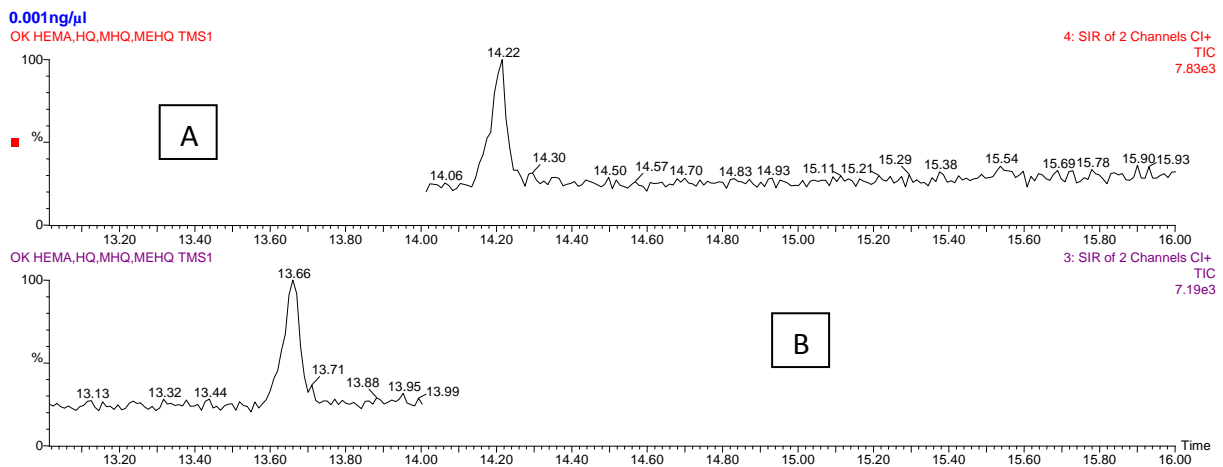
Derivatisering påvirker stoffenes flyktighet og temperaturstabilitet, og med det følger endret retensjonstid. En del av analyttene hadde relativt lik retensjonstid. Flere av disse kunne skilles ved silylering (Tabell 7). Å skille analyttene var ikke nødvendig, de godt kunne blitt kvantifisert i samme tidsintervall, siden det ble selektert unike fragmenter (m/z) for de interfererende forbindelsene.



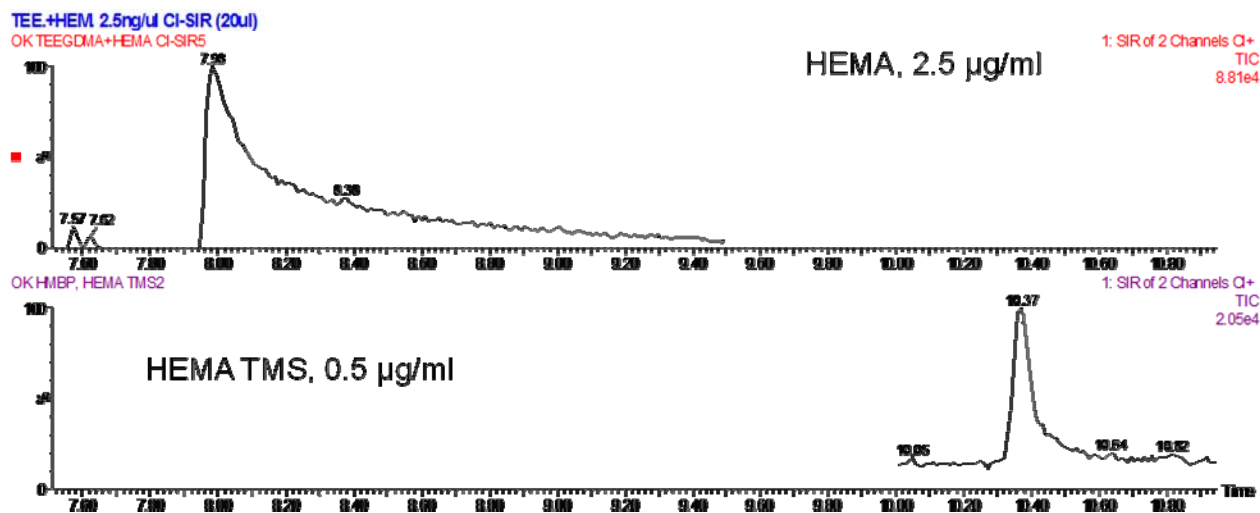
Figur 22: Kromatogram av MHQ (A), HQ (B), MHQ TMS (C) og HQ TMS (D) ved fullscan CI. Figuren viser at etter derivatisering gir HQ og MHQ kun en topp, i motsetning til før derivatisering.



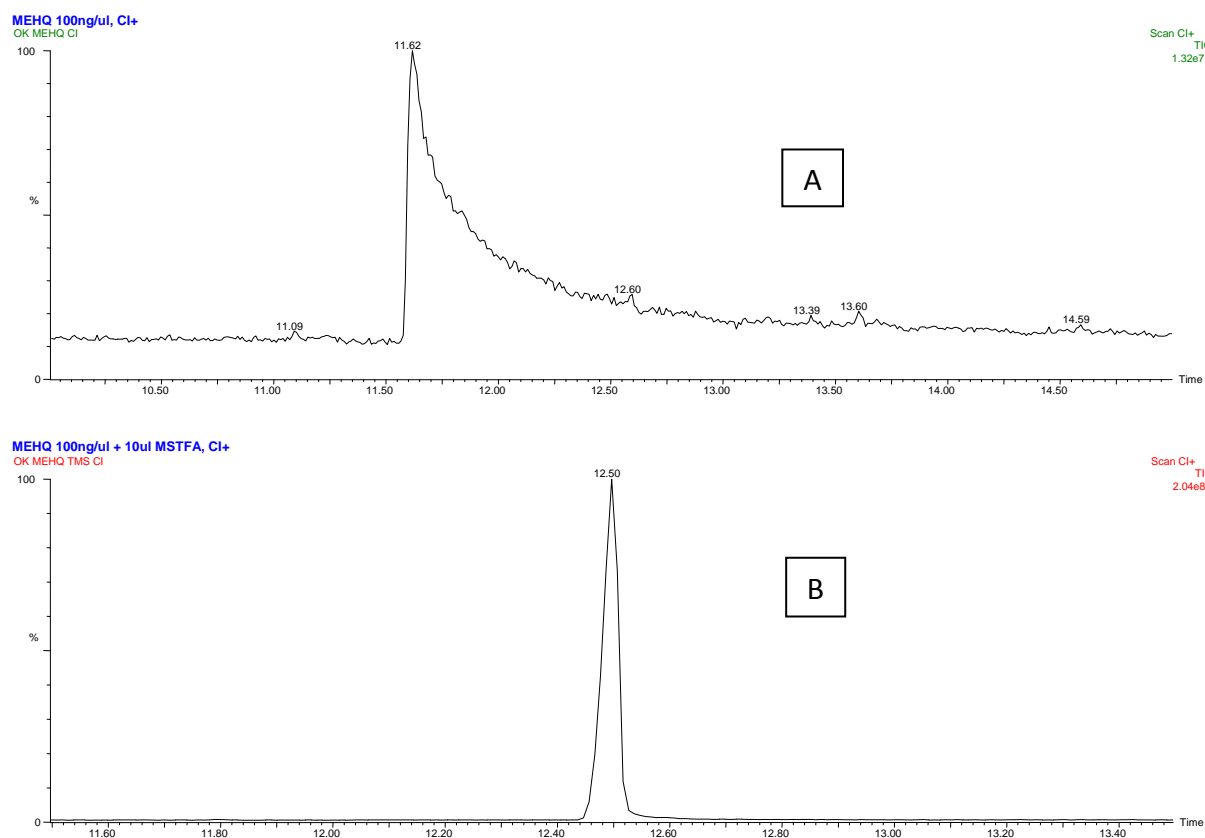
Figur 23: Kromatogram av MHQ (RT=8.1 og 13.6 min), 50 ng på kolonnen, CI fullscan (RT: 5-22 min)



Figur 24: Kromatogram av HQ TMS (A) og MHQ TMS (B) 0,001 $\mu\text{g ml}^{-1}$ ved CI. Ved injeksjon på 2 μl tilsvarer dette 2 pg på kolonnen.



Figur 25: Kromatogram (RT: 7,5-11 min) av HEMA og HEMA TMS ved CI. Derivatisering gir endring i retensjonstid (fra 8,0 til 10,4 min), smalere, mer symmetriske topper og mer sensitive analyser. (Henholdsvis 5 og 1 ng på kolonnen)

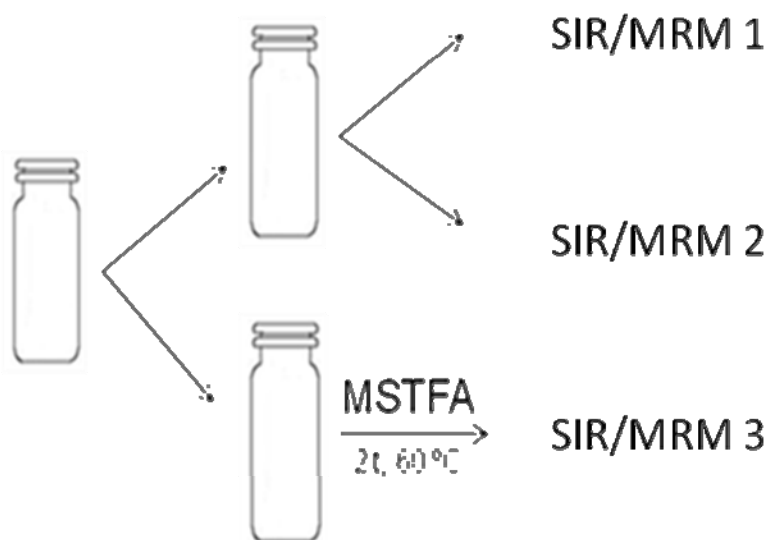


Figur 26: Kromatogram av MEHQ (A) og MEHQ TMS (B) ved CI.

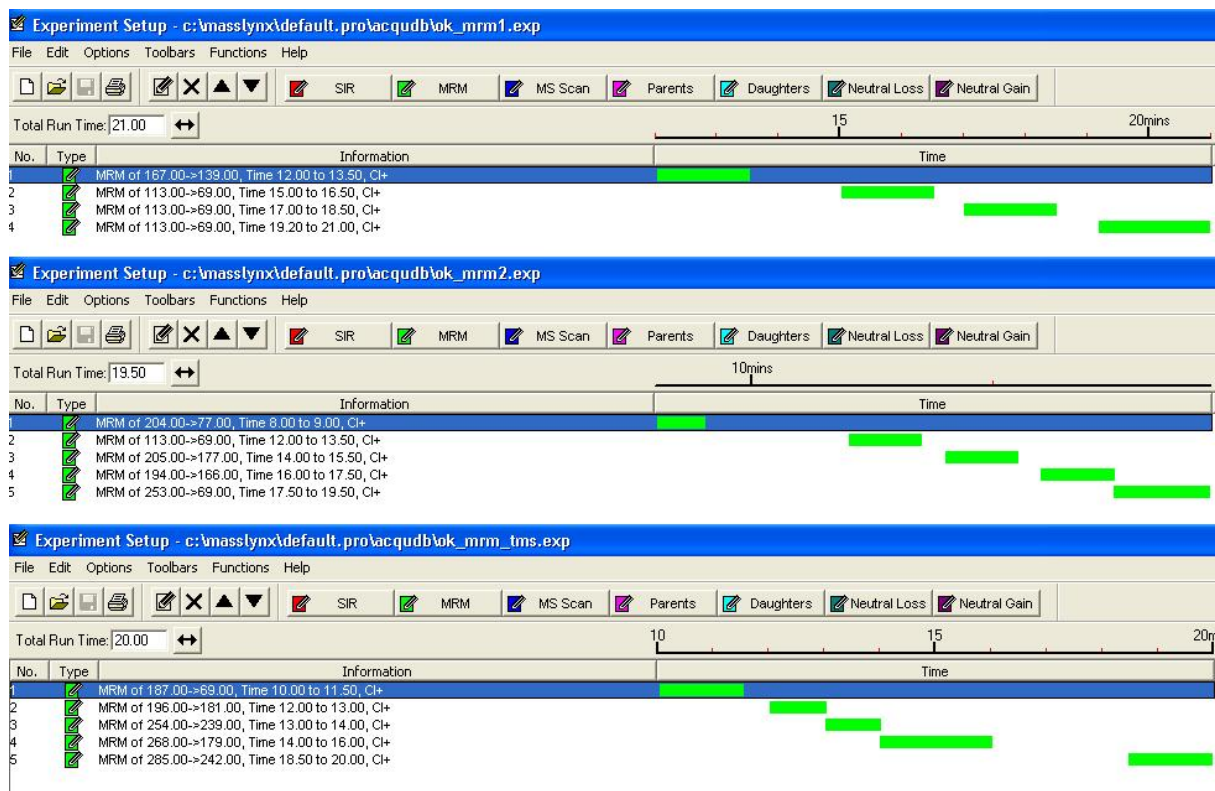
4.5 SIM/MRM-program:

Ved SIM/MRM ser man etter ulike ioner i ulike tidsintervall. Masseanalysatoren låses på smale masseområder og skanner disse. Ved å skanne kun selekterte masser vil man oppnå mer sensitive analyser enn ved fullscan, hvor masseanalysatoren skanner en og en masse over et stort område. Deler av ionestrømmen vil da ikke detekteres. Jo flere masser masseanalysatoren må veksle mellom, jo lavere sensitivitet får man ved at ioner ikke blir detektert. SIM og MRM gir derfor mer sensitive analyser enn fullscan.

Ved SIM/MRM-analyser kan man gjerne detektere flere analytter som eluerer innenfor samme tidsrom så lenge ionene og masseovergangene man skanner er unike for analytten innenfor det tidsintervallet. Et antall av referansesubstansene eluerer nær hverandre i tid. Dette kan løses ved å se etter alle stoffenes ulike fragmenter i det aktuelle tidsintervallet, men dette vil gi redusert evne til å detektere små mengder. Et alternativ er å injisere hver prøve flere ganger, hvor det benyttes ulike masseanalysator-program for hver injeksjon. Dermed kan analyttene som eluerer med liten forskjell i retensjonstid fordeles på forskjellige program. Man oppnår da en analytt per tidsintervall og sensitiviteten bevares. I denne oppgaven ble det benyttet to programmer som detekterte uderivatiserte stoffer, og et program som detekterte de fem silylerte forbindelsene (Figur 27, Figur 28).



Figur 27: Prøven deles i to og en del derivatiseres. De uderivatiserte analyttene injiseres to ganger og analyseres med ulike analyseprogram. Silylerte forbindelser analyseres med et eget program.



Figur 28: Oppsett for masseanalysator, MRM program 1,2 og 3

4.6 Intern standard:

Intern standard benyttes særlig i analyser som involverer en noe omfattende prøveoppbehandling. Intern standard tilsettes prøven i kjent konsentrasjon før prøveoppbehandling starter. Dersom stoffet oppfører seg som analyttene i løsningen, vil intern standard korrigere for tilfeldige endringer som skjer under oppbehandling. En ideell intern standard:

- Må oppføre seg som analytten under prøveoppbehandling
- Må være separert fra andre substanser i prøven
- Må ha en detektorrespons lik analytten
- Ha en konsentrasjon som gir lignende topphøyde eller areal som analytten
- Ikke reagere med analytter i prøven
- Ikke tilstede i prøven som forurensing

Det ble benyttet samme intern standard som Michelsen et al. i *Quantitative analysis of TEGDMA and HEMA eluted into saliva from two dental composites by use of GC/MS and tailor-made internal standard* [55], hydrogenert TEGDMA (IS-TH). Retensjonstidene (RT) for referansesubstansene rangerte fra 8 til 20 minutter. IS-TH hadde RT = 16,9 minutter, nært flere av substansene (Tabell 7) og relativt nært medianen på 13,9 minutter. Den var også adskilt fra TEGDMA (RT=17,3 min). Kjemisk vil IS-TH oppføre seg mest likt TEGDMA, men vil

også være en veldig god intern standard for andre lignende monomerer som DEGDMA og TEEGDMA. IS-TH vil ha en monoisotopisk masse fire enheter over TEGDMA siden fire hydrogenatomer er introdusert (Figur 9).

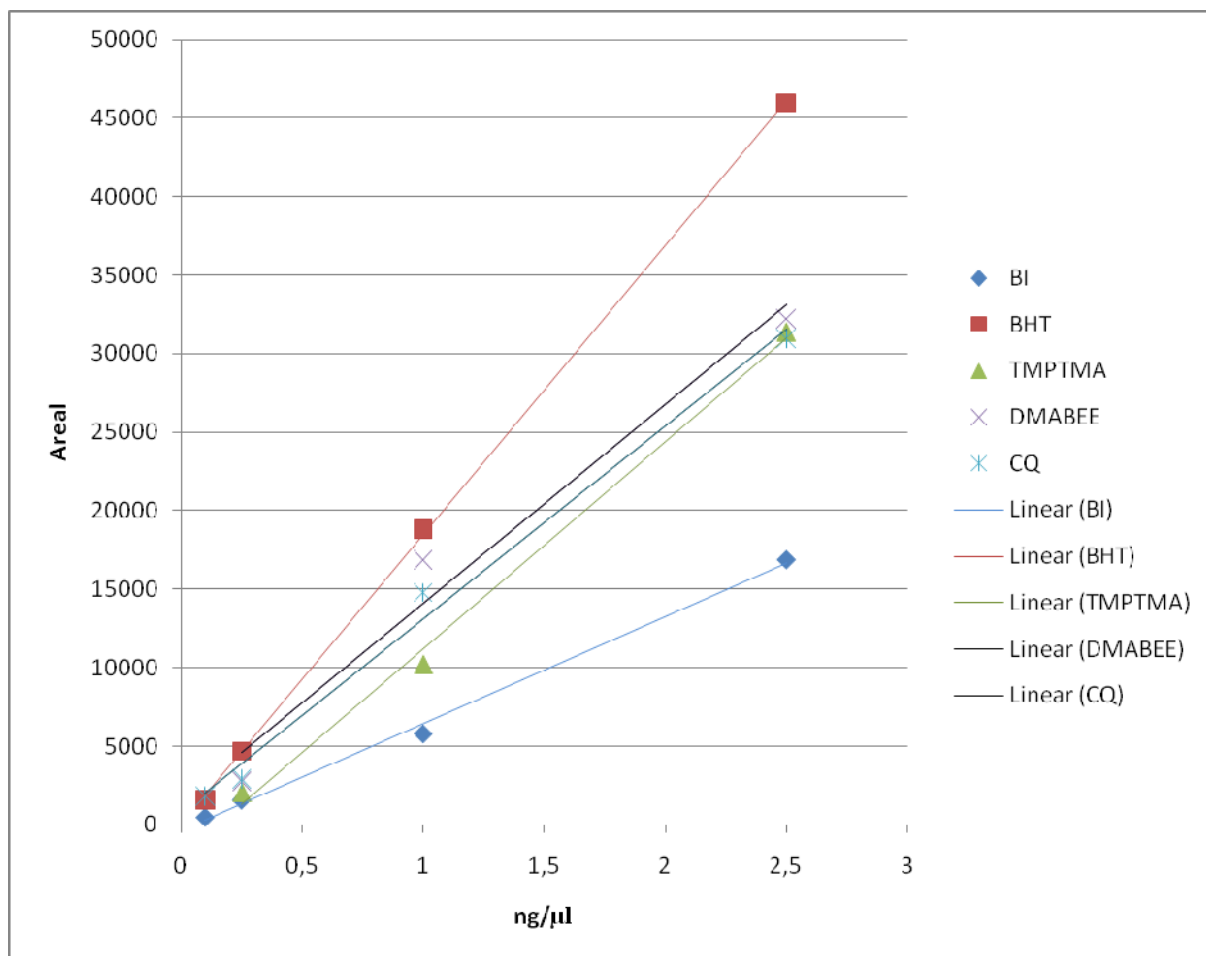
Noen studier har benyttet dietyl ftalat (DEP) som intern standard [21, 45, 54]. DEP er mye benyttet som plastmykner og kan representere et problem med kontaminering fra plastbeholdere, vialer, plastslanger og lignende. Koffein er også blitt benyttet som intern standard da det eluerer nær TEGDMA [20, 51]. Koffein er ikke egnet til studier av utlekk i saliva siden sannsynligheten er stor for forurensinger fra drikker som inneholder koffein. Syntese av skreddersydde, interne standarder etter metoden beskrevet tidligere er teoretisk mulig for alle metakrylatene.

For å oppnå størst mulig sensitivitet ble kun 1 µl intern standard tilsatt per 50 µl prøve. Dette ville gi en konsentrasjonsreduksjon på 2 %. Dette var et svært dårlig valg siden det også medførte at svært små volum av intern standard ble tilsatt, noe som medførte store variasjoner i respons fra IS-TH. Et bedre kompromiss ville vært en noe mer fortynnet intern standard, tilsatt i større volum. I denne metodeutviklingen har ikke prøveopparbeidelse vært veldig omfattende og intern standard ville hovedsakelig korrigeret for eventuelle variasjoner i injeksjonsvolum.

4.7 Validering:

Metoden skulle valideres etter Tabell 2. Fem konsentrasjoner for hver referansesubstans skulle gi standardkurve og bestemmelse av linearitet (Tabell 6). Presisjon og nøyaktighet skulle bestemmes i måleområdet. Dessverre oppstod en feil med MS-instrumentet slik at det ikke var mulig å få Cl-gass inn i ionekilden. Dette kan skyldes en defekt ventil. Metoden har derfor ikke latt seg validere som planlagt.

Det ble gjort noen tidlige forsøk for bestemmelse av linearitet med konsentrasjonene 0,1 – 0,25 – 1 og 2,5 ng/µl (2 µl på kolonnen) for enkelte forbindelser (Figur 29). I mangel av annen valideringsdata presenteres dette her siden dette kan gi en liten indikasjon på metodens kvalitet. BI, BHT og CQ gav kvantifiserbare topper for alle konsentrasjonene. TMPTMA og DMABEE var kvantifiserbare fra 0,25 ng/µl. Regresjonskoeffisienten, R^2 , presenteres i Tabell 10.



Figur 29: Linearitet av enkelte referansesubstanser ved CI. Arealet er plottet mot konsentrasjonen av referansesubstansen. (2 µl på kolonnen)

Tabell 10: Regresjonskoeffisient som uttrykk for lineariteten til enkelte forbindelser ved CI

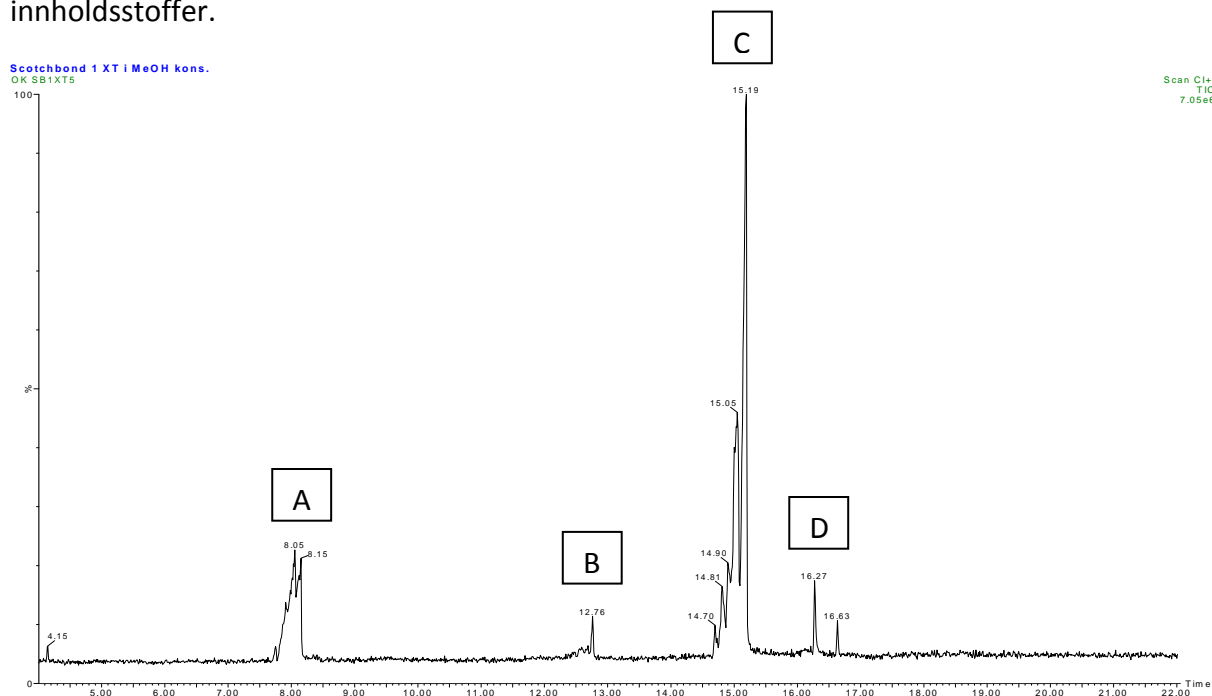
Forbindelse	Regresjonskoeffisient, R^2
BI	0,9967
BHT	0,9998
CQ	0,9964
DMABEE	0,973
TMPTMA	0,9926

4.8 Kvalitativ analyse av et bondingmateriale:

Det ble utført en kvalitativ analyse av bondingmaterialet Adper Scotchbond 1 XT fra 3M. Uherdet materiale ble løst i metanol og analysert med fullscan GC-MS med CI. Identifisering av forbindelser ble gjort på bakgrunn av sammenligning av retensjonstider og massespektra med referansesubstanser, samt informasjon om innhold i produktdatabladet fra produsenten (Tabell 11).

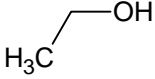
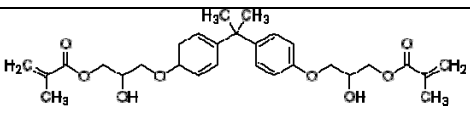
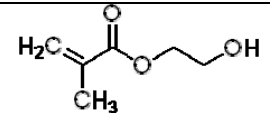
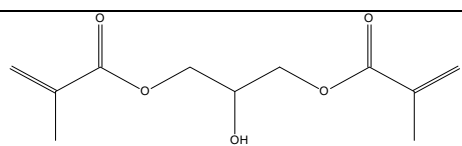
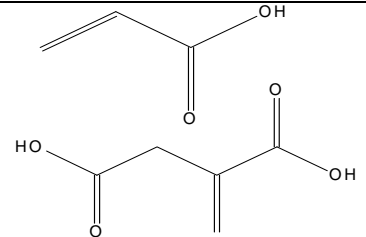
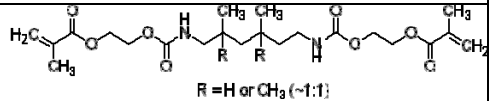
Det ble detektert seks ulike forbindelser (Figur 30). HEMA, CQ og DMABEE kunne identifiseres på bakgrunn av retensjonstid og massespekter i forhold til referansesubstans. En forbindelse, 2-hydroksy-1,3-dimetakryloksypropan, ble identifisert på bakgrunn av produktdatablad og strukturinformasjon fra MS. Eluatet med RT = 4,15 min kan være itakonsyre, men dette er usikkert. Massespekteret til eluatet med RT = 16,63 min gir lite strukturinformasjon, men det kan stamme fra dekomponering av et av metakrylatene eller være en isomer av 2-hydroksy-1,3-dimetakryloksypropan (Figur 30). De andre substansene som er oppgitt i produktdatabladet forventer vi ikke å finne ved GC.

Verken CQ (fotoinitiator) eller DMABEE (co-initiator) er oppgitt i produktdatabladet. Siden bondingmaterialet har lysindusert herding er dette er forbindelser vi likevel kan forvente å finne, siden de er nødvendige for å initiere polymeriseringsreaksjonen. Disse stoffene er ofte tilstede i konsentrasjoner under 1 % og kreves derfor ikke oppgitt i produktdatabladet. Dette illustrerer det tidligere studier [43] har vist; at produktdatablad ikke gir et komplett bilde av innholdsstoffer.



Figur 30: Kromatogram av Adper Scotchbond 1 XT ved CI. Kromatogrammet viste seks eluerende forbindelser, hvorav fire ble sikkert identifisert: HEMA (A), CQ (B), 2-hydroksy-1,3-dimetakryloksypropan (C) og DMABEE (D).

Tabell 11: Sammensetning av 3M Adper Scotchbond 1 XT i følge produktdatablad

Stoffnavn og CAS	Mono-isotopisk masse (Da)	Vektprosent	Struktur
Etanol 64-17-5	46.04	25-35	
Silanbehandlet silika (nanofiller) ---	---	10-20	----
Bisfenol-A-diglycidyleterdimetakrylat 1565-94-2	512,24	10-20	
2-hydroksyetylmetakrylat (HEMA) 868-77-9	130,10	5-15	
2-hydroksy-1,3-dimetakryloksypropan 1830-78-0	228,10	5-10	
Kopolymer av akryl- og itakonsyre 25948-33-8	72,02 130,02	5-10	
Diuretandimetakrylat (UDMA) 72869-86-4	470,26	1-5	
Vann 7732-18-5	18,01	< 5	H ₂ O

4.9 Biologiske vurderinger:

Når det gjelder bivirkninger mot resinbaserte materialer, er allergi hyppigst forekommende. Allergi er doseuavhengig. Det er derfor nødvendig å ha kunnskap om alle stoffer som lekker ut av materialet, selv om det dreier seg om små mengder. Ved lappetesting er det vist at positivt allergiutslag på slimhinner krever 5-12 ganger høyere konsentrasjon av allergenet enn ved eksponering på hud [71]. Dette kan også være en mulig forklaring på hvorfor det rapporteres færre bivirkninger hos pasienter enn man kunne forventet, sett i forhold til den stadig økende bruken av kompositter. Særlig for tannleger er allergi mot slike materialer kritisk, da det kan bety at man ikke kan fortsette i jobben.

Når det gjelder andre potensielle effekter som cytotoxicitet, genotoxicitet og østrogenisitet vil disse være avhengig av eksponeringsdose. Det er derfor også nødvendig å kvantifisere substansene som lekker ut.

Biokompatibilitet er definert som evnen et materiale har til å opptre med en hensiktsmessig vevsrespons i en spesifikk situasjon [72]. Hvilke stoffer som lekker ut og i hvilke mengder, er viktige parametre for å evaluere biokompatibiliteten til et materiale. Selektive analyser med høy følsomhet er derfor nødvendig for å karakterisere resinbaserte odontologiske materialer og vurdere deres sikkerhet.

5. Konklusjon:

Vi har vist at GC-MS med kjemisk ionisasjon er en velegnet teknikk for analyser av organiske forbindelser fra resinbaserte tannfyllingsmaterialer, selv om den har noen ulemper.

Det er vist at selektivitet og sensitivitet ved analyser på resinbaserte materialer kan forbedres ved bruk av CI fremfor EI. I kombinasjon med silylering gav metoden for enkelte forbindelser svært sensitive og selektive analyser. Ved bruk av SIM eller MRM vil CI alltid gi større selektivitet eller sensitivitet enn EI, siden CI alltid gir mer intense fragmenter med høy molekylvekt. Metoden kan også anvendes på andre polymerbaserte odontologiske materialer som for eksempel bondingmaterialer.

En ulempe med CI er at det ikke finnes referansebibliotek med massespektra for substanser på samme måte som for EI. For ukjente substanser vil EI fortsatt være en velegnet metode eller et nyttig tillegg ved kvalitative analyser. Likevel kan CI bidra med nyttig strukturinformasjon, særlig for monomerene som gir lite molekylion og lite karakteristiske fragmenter ved EI.

De ulike forbindelsene har store variasjoner i deteksjonsgrenser, og evne til å gi symmetriske, smale topper. Silylering av flere innholdsstoffene gir velegnede derivater for analyser på GC-MS, særlig for forbindelser med lav molekylvekt. Flere av inhibitorene lar seg vanskelig analysere og gir dårlige kromatogram på grunn av polare grupper. Ved å derivatisere disse dannes flyktige og stabile derivater som gir symmetriske og smale topper. Silylering gav økt følsomhet for flere forbindelser.

Ved kvalitativ analyse av et bondingmateriale ble ingredienser som ikke er oppgitt i produktdatabladet detektert og identifisert ved hjelp av CI.

6. Referanser:

1. Hensten-Pettersen, A., *Skin and mucosal reactions associated with dental materials*. Eur J Oral Sci, 1998. **106**(2 Pt 2): p. 707-12.
2. Hensten-Pettersen, A. and N. Jacobsen, *The role of biomaterials as occupational hazards in dentistry*. Int Dent J, 1990. **40**(3): p. 159-66.
3. Wallenhammar, L.M., et al., *Contact allergy and hand eczema in Swedish dentists*. Contact Dermatitis, 2000. **43**(4): p. 192-9.
4. Kanerva, L., et al., *Increase in occupational skin diseases of dental personnel*. Contact Dermatitis, 1999. **40**(2): p. 104-8.
5. Huggins, H.A., *Medical implications of dental mercury: a review*. Explore (NY), 2007. **3**(2): p. 110-7.
6. Berlin, M., *Mercury in dental amalgam: a risk analysis*. SMDJ Seychelles Medical and Dental Journal, 2004. **7**(Special issue).
7. Bowen, R.L., *Properties of a silica-reinforced polymer for dental restorations*. J Am Dent Assoc, 1963. **66**: p. 57-64.
8. Shalaby, S.W. and W.S.W. Shalaby, *Events Propelling the Use of Polymers in Dental and Orthopedic Applications*, in *Polymers for Dental and Orthopedic Applications*, S.W. Shalaby and U. Salz, Editors. 2007, CRC Press. p. 3-9.
9. Espelid, I., et al., *Restorative treatment decisions on occlusal caries in Scandinavia*. Acta Odontol Scand, 2001. **59**(1): p. 21-7.
10. Forss, H. and E. Widstrom, *From amalgam to composite: selection of restorative materials and restoration longevity in Finland*. Acta Odontol Scand, 2001. **59**(2): p. 57-62.
11. Mjor, I.A., J.E. Moorhead, and J.E. Dahl, *Selection of restorative materials in permanent teeth in general dental practice*. Acta Odontol Scand, 1999. **57**(5): p. 257-62.
12. Sundberg, H., et al., *Swedish dentists' decisions on preparation techniques and restorative materials*. Acta Odontol Scand, 2000. **58**(3): p. 135-41.
13. Tveit, A.B., I. Espelid, and F. Skodje, *Restorative treatment decisions on approximal caries in Norway*. Int Dent J, 1999. **49**(3): p. 165-72.
14. *Bruk av tannrestaureringsmaterialer i Norge*. 1999, Statens Helsetilsyn.
15. *Retningslinjer for bruk av tannrestaureringsmaterialer. Informasjon til tannhelsepersonell om bruk av materialer til restaurering av enkelttenner*. 2003, Sosial- og Helsedirektoratet.
16. *Forskrift om endring i forskrift om begrensning i bruk av helse- og miljøfarlige kjemikalier og andre produkter (produktforskriften)*, Miljøverndepartementet, Editor. 2007: Hefte 13.
17. *The safety of dental amalgam and alternative dental restoration materials for patients and users*. 2008, Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks.
18. Peutzfeldt, A., *Resin composites in dentistry: the monomer systems*. Eur J Oral Sci, 1997. **105**(2): p. 97-116.
19. Ferracane, J.L., *Elution of leachable components from composites*. J Oral Rehabil, 1994. **21**(4): p. 441-52.
20. Geurtsen, W., *Substances released from dental resin composites and glass ionomer cements*. Eur J Oral Sci, 1998. **106**(2 Pt 2): p. 687-95.
21. Michelsen, V.B., et al., *Identification of organic eluates from four polymer-based dental filling materials*. Eur J Oral Sci, 2003. **111**(3): p. 263-71.
22. Olea, N., et al., *Estrogenicity of resin-based composites and sealants used in dentistry*. Environ Health Perspect, 1996. **104**(3): p. 298-305.
23. Bouillaguet, S., et al., *In vitro cytotoxicity and dentin permeability of HEMA*. J Endod, 1996. **22**(5): p. 244-8.
24. Hamid, A., et al., *Component release from light-activated glass ionomer and compomer cements*. J Oral Rehabil, 1998. **25**(2): p. 94-9.

25. Ortengren, U., et al., *Influence of pH and storage time on the sorption and solubility behaviour of three composite resin materials*. J Dent, 2001. **29**(1): p. 35-41.
26. Ortengren, U., et al., *Water sorption and solubility of dental composites and identification of monomers released in an aqueous environment*. J Oral Rehabil, 2001. **28**(12): p. 1106-15.
27. Becher, R., et al., *Pattern of cell death after in vitro exposure to GDMA, TEGDMA, HEMA and two compomer extracts*. Dent Mater, 2006. **22**(7): p. 630-40.
28. Atsumi, T., et al., *Cytotoxicity of photosensitizers camphorquinone and 9-fluorenone with visible light irradiation on a human submandibular-duct cell line in vitro*. Arch Oral Biol, 1998. **43**(1): p. 73-81.
29. Geurtsen, W., et al., *Cytotoxicity of 35 dental resin composite monomers/additives in permanent 3T3 and three human primary fibroblast cultures*. J Biomed Mater Res, 1998. **41**(3): p. 474-80.
30. Hanks, C.T., et al., *Cytotoxic effects of resin components on cultured mammalian fibroblasts*. J Dent Res, 1991. **70**(11): p. 1450-5.
31. Wataha, J.C., et al., *In vitro cytotoxicity of resin-containing restorative materials after aging in artificial saliva*. Clin Oral Investig, 1999. **3**(3): p. 144-9.
32. Heil, J., et al., *Genotoxicity of dental materials*. Mutat Res, 1996. **368**(3-4): p. 181-94.
33. Kleinsasser, N.H., et al., *Genotoxicity and cytotoxicity of dental materials in human lymphocytes as assessed by the single cell microgel electrophoresis (comet) assay*. J Dent, 2004. **32**(3): p. 229-34.
34. Schweickl, H., et al., *The effect of triethylene glycol dimethacrylate on the cell cycle of mammalian cells*. Biomaterials, 2005. **26**(19): p. 4111-8.
35. Schweickl, H. and G. Schmalz, *Triethylene glycol dimethacrylate induces large deletions in the hprt gene of V79 cells*. Mutat Res, 1999. **438**(1): p. 71-8.
36. Schweickl, H., G. Schmalz, and T. Spruss, *The induction of micronuclei in vitro by unpolymerized resin monomers*. J Dent Res, 2001. **80**(7): p. 1615-20.
37. Al-Hiyasat, A.S., H. Darmani, and A.M. Elbetieha, *Leached components from dental composites and their effects on fertility of female mice*. Eur J Oral Sci, 2004. **112**(3): p. 267-72.
38. Schafer, T.E., et al., *Estrogenicity of bisphenol A and bisphenol A dimethacrylate in vitro*. J Biomed Mater Res, 1999. **45**(3): p. 192-7.
39. Wada, H., et al., *In vitro estrogenicity of resin composites*. J Dent Res, 2004. **83**(3): p. 222-6.
40. Geurtsen, W., *Biocompatibility of resin-modified filling materials*. Crit Rev Oral Biol Med, 2000. **11**(3): p. 333-55.
41. Kanerva, L., et al., *Statistics on occupational contact dermatitis from (meth)acrylates in dental personnel*. Contact Dermatitis, 2000. **42**(3): p. 175-6.
42. Årsrapport 2008. 2009, Bivirkningsgruppen for odontologiske biomaterialer.
43. Kanerva, L., et al., *Plastics/acrylics: material safety data sheets need to be improved*. Clin Dermatol, 1997. **15**(4): p. 533-46.
44. Lee, S.Y., et al., *Leached components from dental composites in oral simulating fluids and the resultant composite strengths*. J Oral Rehabil, 1998. **25**(8): p. 575-88.
45. Lygre, H., et al., *Organic leachables from polymer-based dental filling materials*. Eur J Oral Sci, 1999. **107**(5): p. 378-83.
46. Moharamzadeh, K., et al., *HPLC analysis of components released from dental composites with different resin compositions using different extraction media*. J Mater Sci Mater Med, 2007. **18**(1): p. 133-7.
47. Muller, H., S. Olsson, and K.J. Soderholm, *The effect of comonomer composition, silane heating, and filler type on aqueous TEGDMA leachability in model resin composites*. Eur J Oral Sci, 1997. **105**(4): p. 362-8.
48. Polydorou, O., et al., *Elution of monomers from two conventional dental composite materials*. Dent Mater, 2007. **23**(12): p. 1535-41.

49. Rogalewicz, R., K. Batko, and A. Voelkel, *Identification of organic extractables from commercial resin-modified glass-ionomers using HPLC-MS*. J Environ Monit, 2006. **8**(7): p. 750-8.
50. Spahl, W. and H. Budzikiewicz, *Qualitative analysis of dental resin composites by gas and liquid chromatography/mass spectrometry*. Fresenius' Journal of Analytical Chemistry, 1994. **350**(12): p. 684-691.
51. Spahl, W., H. Budzikiewicz, and W. Geurtsen, *Determination of leachable components from four commercial dental composites by gas and liquid chromatography/mass spectrometry*. J Dent, 1998. **26**(2): p. 137-45.
52. Sideridou, I.D. and D.S. Achilias, *Elution study of unreacted Bis-GMA, TEGDMA, UDMA, and Bis-EMA from light-cured dental resins and resin composites using HPLC*. J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 2005. **74**(1): p. 617-26.
53. Mazzaoui, S.A., et al., *Long-term quantification of the release of monomers from dental resin composites and a resin-modified glass ionomer cement*. J Biomed Mater Res, 2002. **63**(3): p. 299-305.
54. Michelsen, V.B., et al., *Quantification of organic eluates from polymerized resin-based dental restorative materials by use of GC/MS*. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2007. **850**(1-2): p. 83-91.
55. Michelsen, V.B., et al., *Quantitative analysis of TEGDMA and HEMA eluted into saliva from two dental composites by use of GC/MS and tailor-made internal standards*. Dent Mater, 2008. **24**(6): p. 724-31.
56. Polydorou, O., et al., *Long-term release of monomers from modern dental-composite materials*. Eur J Oral Sci, 2009. **117**(1): p. 68-75.
57. Nicholson, J.W., *The chemistry of medical and dental materials*. 2002: Royal Society of Chemistry. 242.
58. Moszner, N. and U. Salz, *Composites for Dental Restoratives*, in *Polymers for Dental and Orthopedic Applications*, S.W. Shalaby and U. Salz, Editors. 2007, CRC Press. p. 14-58.
59. Weinmann, W., C. Thalacker, and R. Guggenberger, *Siloranones in dental composites*. Dent Mater, 2005. **21**(1): p. 68-74.
60. Ferracane, J.L., *Materials in dentistry: principles and applications*. 2001: Lippincott Williams & Wilkins. 354.
61. Powers, J.M., *Composite Restorative Materials*, in *Restorative Dental Materials*, R.G. Craig and J.M. Powers, Editors. 2002, Mosby. p. 232-237.
62. Schweickl, H., G. Spagnuolo, and G. Schmalz, *Genetic and cellular toxicology of dental resin monomers*. J Dent Res, 2006. **85**(10): p. 870-7.
63. Geukens, S. and A. Goossens, *Occupational contact allergy to (meth)acrylates*. Contact Dermatitis, 2001. **44**(3): p. 153-9.
64. Ortengren, U., et al., *Prevalence of self-reported hand eczema and skin symptoms associated with dental materials among Swedish dentists*. Eur J Oral Sci, 1999. **107**(6): p. 496-505.
65. Munksgaard, E.C., *Permeability of protective gloves by HEMA and TEGDMA in the presence of solvents*. Acta Odontol Scand, 2000. **58**(2): p. 57-62.
66. Piirila, P., et al., *Occupational respiratory hypersensitivity in dental personnel*. Int Arch Occup Environ Health, 2002. **75**(4): p. 209-16.
67. *LOV 1995-01-12 nr 06: Lov om medisinsk utstyr*. 1995, Sosial- og helsedepartementet.
68. *ISO 4049:2000 Dentistry - Polymer-based filling, restorative and luting materials*. 2000, International Organization for Standardization.
69. Dempster, A.J., *A new Method of Positive Ray Analysis*. Physical Review, 1918. **11**(4): p. 316.
70. Munson, M.S.B. and F.H. Field, *Chemical Ionization Mass Spectrometry. I. General Introduction*. Journal of the American Chemical Society, 1966. **88**(12): p. 2621-2630.
71. Luders, G., *[Exogenously induced diseases of the mouth mucosa]*. Z Hautkr, 1987. **62**(8): p. 603-6, 611-2.
72. Williams, D.F., *Defenitions in biomaterials*. 1987, New York: Elsevier Science Publ.

