

Aus der Abteilung für Kieferorthopädie, Orthodontie und
Kinderzahnmedizin
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Freisetzung von Bisphenol A aus Fissurenversiegelungsmaterialien in vitro.

Eine Pilotstudie zur Frage, ob eine östrogene Wirkung denkbar ist.

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae dentariae (Dr. med. dent.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Gökçen Erek

aus Berlin

Gutachter/in: 1. Prof. Dr. P.-G. Jost-Brinkmann
 2. Prof. Dr. rer. nat. habil. I. Nehls
 3. Prof. Dr. J. Oehlmann

Datum der Promotion: 24.02.2012

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	IX
1 Einleitung.....	1
2 Literaturübersicht.....	4
2.1 Dentale Kunststoffe	4
2.2 Endokrin wirksame Substanzen und Östrogenrezeptoren	6
2.3 Endokrin wirksame Substanzen	8
2.3.1 Wirkmechanismus östrogenen Substanzen	8
2.3.2 Bisphenol A als endokrin wirksame Substanz	9
2.4 Tierexperimentelle Versuche	10
2.5 Nachweismethoden für Bisphenol A	14
2.5.1 Reporter-gen-Assay	14
2.5.2 E-screen-Assay	14
2.5.3 Chromatographische Trennverfahren	15
2.6 Literatur zu klinischen Untersuchungen von Versiegelungsmaterialien auf BPA	17
2.7 Bis-GMA-Ersatz	20
2.8 Zusammenfassung des gegenwärtigen Kenntnisstandes zu BPA	21
2.9 Zielsetzung und Arbeitshypothesen	22
3 Materialien und Methoden	23
3.1 Materialien	23
3.1.1 Verwendete Fissurenversiegler	25
3.1.2 Positiv- und Negativkontrolle	25
3.1.3 Referenzsubstanzen	25

3.1.4	Stamm- und Standardlösungen für die HPLC-DAD/FLD	25
3.1.5	Stamm- und Standardlösungen für die HPLC-MS/MS	27
3.2	Versuchsdurchführung	29
3.3	Methoden	32
3.3.1	HPLC-DAD/FLD	35
3.3.2	HPLC-MS/MS	37
3.3.3	Qualitätssicherung	38
4	Ergebnisse.....	40
4.1	Ablauf der Probenüberprüfung	40
4.1.1	Kalibrierung.....	40
4.1.2	Richtigkeit der Kalibrierung	42
4.1.3	Wiederfindungsproben mit BPA; GMA101019_01 bis _05	44
4.1.4	Nachweisvermögen.....	45
4.1.5	Blindwertproben GMA101018_01, _02, _04 und GMA101019_06	47
4.1.6	Testprobe Bis-GMA; GMA101018_03.....	49
4.1.7	Probenserie.....	50
4.2	Standardaddition	63
4.2.1	Dotierte Probenextrakte	63
4.2.2	Wiederfindungsprobe der Dotierungsprobe und Blindwert.....	66
4.3	Vergleichsmessung mit HPLC-MS/MS	68
4.3.1	Kalibrierung.....	69
4.3.2	Nachweisvermögen.....	71
4.3.3	Versieglermasse Fissurit F; GMA101020_02	71
4.3.4	Versieglermasse Delton FS+; GMA 101020_05.....	73

4.3.5	Versieglermasse Bis-GMA; GMA101020_08.....	73
4.3.6	Versieglermasse TMXDI-Dimethacrylat; GMA101020_11	75
4.3.7	Wiederfindungsprobe GMA101020_14	76
4.3.8	Blindwertproben GMA101020_13 und GMA101020_15.....	78
5	Diskussion.....	80
5.1	Diskussion der untersuchten Materialien	80
5.2	Diskussion der Methode	80
5.2.1	Probenherstellung	80
5.2.2	Prüfkörpergeometrie	81
5.2.3	Untersuchungsmethode	82
5.2.4	Migrationsmedium.....	84
5.3	Diskussion der Ergebnisse	85
5.4	Klinische Bewertung der Ergebnisse	89
5.4.1	Belastungsgrenzen für Bisphenol A.....	89
5.4.2	Bewertung der Gesundheitsgefährdung durch Bisphenol A	90
5.5	Schlussfolgerungen.....	92
5.6	Ausblick.....	92
6	Zusammenfassung.....	94
6.1	Summary.....	95
7	Literaturverzeichnis	97
8	Anhang.....	106

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Strukturformel Bisphenol A	4
Abbildung 2: Bisphenol-A-Glycidylmethacrylat	4
Abbildung 3: Neuroendokriner Regelkreis zur Steuerung der Sexualfunktion modifiziert nach [41] und [98]	7
Abbildung 4: Struktur des TMX-UDMA (in Anlehnung an [64]).....	20
Abbildung 5: Stamm- und Standardlösung für HPLC-DAD/FLD.....	26
Abbildung 6: Stamm- und Standardlösung für HPLC-MS/MS	28
Abbildung 7: Schematische Darstellung der Versuchsdurchführung.....	30
Abbildung 8: Horizontalschüttler mit eingespannten Probengefäßen.....	32
Abbildung 9: Extraktion der Proben	33
Abbildung 10: Vorbereitete Proben für die Einengung mit Stickstoff	34
Abbildung 11: Kalibrierungsgerade Fluoreszenzdetektion	40
Abbildung 12: Kalibrierungsgerade Diodenarraydetektor.....	41
Abbildung 13: Chromatogramme Kal 3 = blaue Kurve und Kontrollstandard = schwarze Kurve der Fluoreszenzdetektion; Retentionszeitbereich = rot	43
Abbildung 14: Chromatogramme Kal3 = blaue Kurve und Kontrollstandard = schwarze Kurve der Diodenarraydetektion; Retentionszeitbereich = rot	43
Abbildung 15: Chromatogramme der Wiederfindungsproben GMA101019_01 bis GMA101019_05 der Fluoreszenzdetektion.....	44
Abbildung 16: Chromatogramme der Wiederfindungsproben GMA101019_01 bis GMA101019_05 der Diodenarraydetektion.....	45
Abbildung 17: Chromatogramm Kal1 (20,8 ng/g; 18,4 ng/ml) niedrigster Kalibrierpunkt der Fluoreszenzdetektion.....	45
Abbildung 18: Chromatogramm Kal1 (20,8 ng/g; 18,4 ng/ml) niedrigster Kalibrierpunkt der Diodenarraydetektion.....	46

Abbildung 19: Chromatogramm der Wiederfindungsprobe GMA101019_01 (0,77 ng/g) der Fluoreszenzdetektion; Retentionszeitbereich = rot.....	46
Abbildung 20: Chromatogramm der Wiederfindungsprobe GMA101019_01 (0,77 ng/g) der Diodenarraydetektion; Retentionszeitbereich = rot.....	47
Abbildung 21: Chromatogramm Blindwertprobe GMA101018_01 der Fluoreszenzdetektion	47
Abbildung 22: Chromatogramm Blindwertprobe GMA101018_01 der Diodenarraydetektion	48
Abbildung 23: Chromatogramm Blindwertprobe GMA101019_06 der Fluoreszenzdetektion	48
Abbildung 24: Chromatogramm Blindwertprobe GMA101019_06 der Diodenarraydetektion	49
Abbildung 25: Überlagerte Darstellung der Chromatogramme GMA101018_03 = schwarze Kurve; Kal3 = blaue Kurve (100,7 ng/g; 88,9 ng/ml) der Fluoreszenzdetektion ..	49
Abbildung 26: Überlagerte Chromatogramme GMA101018_03 = schwarze Kurve und Kal3 = blaue Kurve (100,7 ng/g; 88,9 ng/ml) der Diodenarraydetektion	50
Abbildung 27: Chromatogramme GMA101020_01 = schwarze Kurve, GMA101020_02 = blaue Kurve und GMA101020_03 = rosa Kurve der Fluoreszenzdetektion.....	52
Abbildung 28: Chromatogramme GMA101020_01 = schwarze Kurve, GMA101020_02 = blaue Kurve und GMA101020_03 = rosa Kurve der Diodenarraydetektion.....	52
Abbildung 29: Überlagerte Chromatogramme GMA101020_02 = schwarze Kurve und STD Kal3 = blaue Kurve (100,7 ng/g; 88,9 ng/ml) der Fluoreszenzdetektion	53
Abbildung 30: Überlagerte Chromatogramme GMA101020_02 = schwarze Kurve und STD Kal3 = blaue Kurve (100,7 ng/g; 88,9 ng/ml) der Diodenarraydetektion	53
Abbildung 31: Chromatogramme GMA101020_04 = schwarze Kurve, GMA101020_05 = blaue Kurve und GMA101020_06 = rosa Kurve der Fluoreszenzdetektion.....	54
Abbildung 32: Chromatogramme GMA101020_04 = schwarze Kurve, GMA101020_05 = blaue Kurve und GMA101020_06 = rosa Kurve der Diodenarraydetektion.....	54
Abbildung 33: Überlagerung der Chromatogramme GMA101020_05 = schwarze Kurve und STD Kal3 = blaue Kurve (100,7 ng/g; 88,9, ng/ml) der Fluoreszenzdetektion; Retentionszeitbereich = rot.....	55

Abbildung 34: Überlagerung der Chromatogramme GMA101020_05 = schwarze Kurve und STD Kal3 = blaue Kurve (100,7 ng/g; 88,9 ng/ml) der Diodenarraydetektion	55
Abbildung 35: Chromatogramme GMA101020_07 = schwarze Kurve, GMA101020_08 = blaue Kurve und GMA101020_09 = rosa Kurve der Fluoreszenzdetektion.....	56
Abbildung 36: Chromatogramme GMA101020_07 = schwarze Kurve, GMA101020_08 = blaue Kurve und GMA101020_09 = rosa Kurve der Diodenarraydetektion.....	56
Abbildung 37: Überlagerte Chromatogramme GMA101020_08 = schwarze Kurve und STD Kal3 = blaue Kurve (100 ng/g; 88,9 ng/ml) der Fluoreszenzdetektion	57
Abbildung 38: Übereinander gelegte Chromatogramme GMA101020_08 = schwarze Kurve und STD Kal3 = blaue Kurve (100 ng/g; 88,9 ng/ml) der Diodenarraydetektion	57
Abbildung 39: Chromatogramme GMA101020_10 = schwarze Kurve, GMA101020_11 = blaue Kurve und GMA101020_12 = rosa Kurve der Fluoreszenzdetektion	58
Abbildung 40: Chromatogramme GMA101020_10 = schwarze Kurve, GMA101020_11 = blaue Kurve und GMA101020_12 = rosa Kurve der Diodenarraydetektion.....	58
Abbildung 41: Überlagerte Chromatogramme GMA101020_11 = schwarze Kurve und STD Kal3 = blaue Kurve (100,7 ng/g; 88,9 ng/ml) der Fluoreszenzdetektion	59
Abbildung 42: Überlagerte Chromatogramme GMA101020_11 = schwarze Kurve und STD Kal3 = blaue Kurve (100,7 ng/g; 88,9 ng/ml) der Diodenarraydetektion	59
Abbildung 43: Chromatogramm der Wiederfindungsprobe GMA101020_14 der Fluoreszenzdetektion; Retentionszeitbereich = rot.....	60
Abbildung 44: Chromatogramm der Wiederfindungsprobe GMA101020_14 der Diodenarraydetektion; Retentionszeitbereich = rot.....	60
Abbildung 45: Chromatogramm der Blindwertprobe GMA101020_13 (Alufolie) der Fluoreszenzdetektion.....	61
Abbildung 46: Chromatogramm der Blindwertprobe GMA101020_13 (Alufolie) der Diodenarraydetektion.....	61
Abbildung 47: Chromatogramm der Blindwertprobe GMA101020_15 (Wasser) der Fluoreszenzdetektion.....	62

Abbildung 48: Chromatogramm der Blindwertprobe GMA101020_15 (Wasser) der Diodenarraydetektion.....	62
Abbildung 49: Fluoreszenzdetektion-Chromatogramme des dotierten Probenextraktes 101118_01 = schwarze Kurve mit 20 ng BPA, GMA101020_02 = blaue Kurve und Kal3 = grüne Kurve	64
Abbildung 50: Chromatogramme des dotierten Probenextraktes 101118_02 = schwarze Kurve und GMA101020_05 = blaue Kurve und Kal3 = grüne Kurve der Fluoreszenzdetektion.....	64
Abbildung 51: Chromatogramme des dotierten Probenextraktes 101118_03 = schwarze Kurve und GMA101020_08 = blaue Kurve und Kal3 = grüne Kurve der Fluoreszenzdetektion von Batch 10111801	65
Abbildung 52: Chromatogramme des dotierten Probenextraktes 101118_04 = schwarze Kurve und GMA101020_11 = blaue Kurve und Kal3 = grüne Kurve der Fluoreszenzdetektion von Batch 10111801	66
Abbildung 53: Chromatogramm der Wiederfindungsprobe GMA101118_05 der Fluoreszenzdetektion von Batch 10111801; Retentionszeitbereich = rot	67
Abbildung 54: Chromatogramm der Wiederfindungsprobe GMA101118_05 der Diodenarraydetektion von Batch 10111801; Retentionszeitbereich = rot	67
Abbildung 55: Chromatogramm der Blindwertprobe GMA101118_06 der Fluoreszenzdetektion von Batch 10111801.....	68
Abbildung 56: Chromatogramm der Blindwertprobe GMA101118_06 der Diodenarraydetektion von Batch 10111801.....	68
Abbildung 57: Overlay der Chromatogramme der Kalibrierlösungen Kal2 bis Kal6; Massenspuren Bisphenol A, BPA Q und BPA INT	69
Abbildung 58: Kalibrierungsgerade MS/MS	70
Abbildung 59: Chromatogramme der Standardlösung Kal1 (11,8 ng/g; 10,4 ng/ml) mit S/N, Massenspuren BPA, BPA Q und BPA INT.....	71
Abbildung 60: Chromatogramme BPA und BPA Q mit Overlay von GMA101020_02 und STD Kal3 (100,7 ng/g; 88,9 ng/ml); rot = Kalibrierlösung, blau = Versieglermasse	72

Abbildung 61: Chromatogramme BPA und BPA Q mit Overlay von GMA101020_05 und STD Kal3 (100,7 ng/g; 88,9 ng/ml); rot = Kalibrierlösung, blau = Versieglermasse	73
Abbildung 62: Chromatogramme BPA und BPA Q mit Overlay GMA101020_08 und STD Kal3 (100,7 ng/g; 88,9 ng/ml); rot = Kalibrierlösung, blau = Versieglermasse	74
Abbildung 63: Chromatogramme BPA GMA101020_08, GMA101020_09 und GMA101020_10 sowie 4 Standardlösungen	75
Abbildung 64: Chromatogramme BPA und BPA Q mit Overlay GMA101020_11 und STD Kal3 (100,7 ng/g; 88,9 ng/ml); rot = Kalibrierlösung, blau = Versieglermasse	76
Abbildung 65: Chromatogramme BPA und BPA Q mit Overlay GMA101020_14 und STD Kal3 (100,7 ng/g; 88,9 ng/ml); rot = Kalibrierlösung, blau = Wiederfindungsprobe	77
Abbildung 66: Chromatogramme von GMA101020_13 Blindwertprobe, Overlay Massenspuren BPA, BPA Q und BPA INT sowie Diodenarraydetektion	78
Abbildung 67: Chromatogramme GMA101020_14 Blindwertprobe, Overlay Massenspuren BPA, BPA Q und BPA INT sowie Diodenarraydetektion	79

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zusammenfassung der Schneckenversuche von Oehlmann et al. [70]; BPA=Bisphenol A	12
Tabelle 2: Wirkung von Bisphenol A	21
Tabelle 3: Materialien, Geräte und Chemikalien	23
Tabelle 4: Chemikalien	24
Tabelle 5: Prüfgeräte und Hilfsmittel.....	24
Tabelle 6: Verwendete Fissurenversiegler.....	25
Tabelle 7: Positiv- und Negativkontrolle.....	25
Tabelle 8: Hersteller, Artikelnummer und Angaben zur Reinheit der Referenzsubstanzen	25
Tabelle 9: Konzentrationen für die Kalibrierlösungen (Verdünnungsreihe)	27
Tabelle 10: BPA-Konzentrationen der Kalibrierlösungen für die HPLC-MS/MS Messung	28
Tabelle 11: Übersicht über die Probenserien mit Angaben der Daten der verschiedenen Untersuchungsschritte	31
Tabelle 12: Einstellungen der HPLC-Messung	35
Tabelle 13: Parameter der Detektionskanäle des Diodenarraydetektors	35
Tabelle 14: Spektromaufnahme des Diodenarraydetektors	36
Tabelle 15: Detektionskanal des Fluoreszenzdetektors.....	36
Tabelle 16: Bedingungen der HPLC	37
Tabelle 17: Einstellungen der Ionenquelle.....	38
Tabelle 18: Massenübergänge der MRMs.....	38
Tabelle 19: Spannung der MRMs	38
Tabelle 20: Kenndaten für die Kalibrierung des Fluoreszenzdetektors	41
Tabelle 21: Kenndaten der Kalibrierung DAD	42

Tabelle 22: Retentionszeiten in Minuten der HPLC-DAD/FLD (n=10).....	42
Tabelle 23: Kontrolle der Kalibrierung des Fluoreszenzdetektors und Diodenarraydetektors....	43
Tabelle 24: Wiederfindungsraten von Bisphenol A mit FLD und DAD.....	44
Tabelle 25: Einwaagen der Proben	51
Tabelle 26: Bisphenol-A-Konzentration nach Standardaddition	63
Tabelle 27: Kenndaten der Kalibrierungsgerade HPLC-MS/MS.....	70
Tabelle 28: Retentionszeit in Minuten der HPLC-MS/MS (n=10)	71

1 Einleitung

Bisphenol A (BPA) wird in der Industrie zur Herstellung von Polycarbonat, einem sehr stabilen und bruchfesten Kunststoff und Epoxydharzen, wie zum Beispiel Verbundstoffen, Klebstoffen, Nagellacken oder auch Beschichtungen von Konservendosen verwendet. Brotons et al. konnten jedoch 1995 eine östrogene Aktivität von BPA aus beschichteten Konservendosen nachweisen [16]. Goodson et al. wiesen in Dosenahrung aus 37 Konservendosen einen Bisphenol-A-Gehalt von 0,007 mg/kg und in einer Probe aus einer Konservendose einen Gehalt von 0,38 mg/kg an BPA nach [34]. Bisphenol A ist auch in Kunststoffflaschen aus Polyethylenterephthalat oder Polypropylen, Mikrowellengeschirr, Babyschnullern, Kunststoffbestecken und auch Plastikverpackungen von Lebensmitteln enthalten. Wenn derartige Gegenstände Bisphenol A freisetzen, sind diese mögliche Aufnahmequellen von Bisphenol A in den menschlichen Organismus, zum Beispiel über die Nahrung, die in solchen Gefäßen gelagert bzw. zubereitet wird. Mikrowellengefäße bergen die Gefahr einer BPA-Übertragung auf die Nahrung während des Erwärmens [67].

Ein besonderes Augenmerk ist auf die Babyschnuller zu richten, da diese in der Gebrauchsperiode in direktem Kontakt zum Mundhöhlenmilieu stehen. Im Auftrag der Umweltorganisation Global 2000 untersuchte eine gemäß ISO/IEC 17015 akkreditierte Prüfstelle unterschiedliche Babyschnuller aus Latex und Silikon und stellte Bisphenol-A-Freisetzungen aus allen Schnullern fest [33].

Zahlreiche Autoren untersuchten die Bisphenol-A-Freisetzung aus Babyflaschen bestehend aus Polycarbonat. Le et al. konnten nach Auswaschen von Flaschen aus Polycarbonat mit 100 ml kochendem Wasser bis zu 7,67 ng Bisphenol A/ml Wasser nachweisen [52]. Der Nachweis erfolgte nach einer 24 stündigen Lagerung des Wassers in den Gefäßen. Außerdem untersuchten sie die Bisphenol-A-Konzentration in Wasser nach siebentägiger Lagerung in Polycarbonatflaschen bei Raumtemperatur und fanden maximal 1,33 ng Bisphenol A/ml Wasser. Maragou und Mitarbeiter kochten Polycarbonatflaschen mit Wasser aus und fanden bis zu 14,3 µg Bisphenol A/kg Polycarbonat [59]. Die Bisphenol-A-Konzentration ist jedoch stark von der Untersuchungsmethode abhängig. Cao et al. sowie Brede et al. untersuchten den Bisphenol-A-Gehalt nach thermischer Behandlung der Babyflaschen aus Polycarbonat und wiesen im Wasser BPA-Konzentrationen von 8,4 µg/l Wasser [15] bis zu 521 µg/l Wasser [17] nach.

Yamamoto et al. untersuchten Abfallkunststoffe und fanden bis zu 139 µg Bisphenol A/g Material in Polyvinylchloridkunststoffen [103].

Verschiedene Studien konnten nachweisen, dass Bisphenol A nicht nur freigesetzt, sondern auch in den Organismus aufgenommen wird. Carwile et al. untersuchten die Urinwerte von Pro-

1. Einleitung

banden nach dem Konsum von Getränken aus Polycarbonatflaschen und konnten Bisphenol-A-Konzentrationen bis zu 2,1 µg Bisphenol A/l Urin nachweisen [19].

Der Nachweis von Bisphenol A in Säuglingsnahrung gelang Ackermann et al. [1]. In flüssiger Babynahrung fanden sie bis zu 11 ng/g Nahrung Bisphenol A [1]. Eine weitere Belastungsquelle stellen Lopez-Cervantes et al. dar. Sie untersuchten Verpackungen auf der Basis von Polyvinylchloridkunststoffen und stellten Werte von bis zu 500 mg Bisphenol A/kg Material fest [56]. In diesem Zusammenhang sei darauf hingewiesen, dass ein direkter Vergleich aller Werte aufgrund der unterschiedlichen Maßeinheiten und Untersuchungsmethoden nicht möglich ist.

In der restaurativen Zahnmedizin wird Bisphenol A in Füllungskompositen eingesetzt. Bisphenol-A-Diglycidyl-Methacrylat (Bis-GMA) ist ein Reaktionsprodukt aus Bisphenol A und Glycidylmethacrylat [42] und dient in den dentalen Kunststoffen als Basismonomer. Bei unvollständiger Polymerisation der Matrixbestandteile sind die unpolymerisierten Anteile in der Lage, Bisphenol A abzugeben. Zudem ist anzunehmen, dass durch die Reaktion mit Speichelbestandteilen Degradationsprodukte wie Bishydroxy-Propoxyphenyl-Propan (bisHPPP) entstehen, die gesundheitsschädigende Wirkungen haben können [93]. Bestimmte Enzyme, wie Proteasen und Esterasen sind in der Lage einzelne Komponenten und Bestandteile aus polymerisiertem Komposit herauszulösen [7], wobei 90 % der Eluate innerhalb der ersten 24 Stunden in Lösung gehen [83].

In der Wissenschaft wird seit Jahren die östrogene Wirkung von Bisphenol A kontrovers diskutiert. Bisphenol A bindet an Östrogenrezeptoren und konkurriert um deren Hormonbindungsplatz. Durch diese Interaktion resultiert eine Veränderung des endokrinen Systems und führt zur Schädigung verschiedener Organe, die dadurch reguliert werden. Stoffwechsel, Immunsystem, Verhalten, Wachstum und Organentwicklung werden durch das endokrine System moduliert [20]. Durch die Fehlregulation des endokrinen Systems werden vor allem das Immunsystem [24,92] und der Stoffwechsel negativ beeinflusst, Erkrankungen wie Diabetes mellitus Typ 2 [2,4,5], Adipositas [11,40,50], verfrühte Geschlechtsreife, Abnahme der Fertilität [53], teratogene Wirkungen [90] und Mammakarzinome [20] werden damit begünstigt.

Hormonaktive Substanzen bewirken agonistische oder antagonistische Effekte an den Östrogenrezeptoren. Durch endogene Effekte, die durch Bisphenol A ausgelöst werden können, werden die Fortpflanzungsfunktionen, das Wachstum und die sexuelle Differenzierung geschädigt [20,70]. Fehlentwicklungen der Sexualorgane und eine Abnahme der Spermienzahl sind nennenswerte Folgen einer Fehlmodulation von Östrogenrezeptoren [20,35].

Da Östrogene auch Hirnareale wie den Hippocampus [57,58] und den Hypothalamus [3,43,75] beeinflussen, wird verständlich, dass ein Eingriff in die Östrogenwirkung folglich auch auf neu-

1. Einleitung

ronaler Ebene Schäden hervorrufen kann. Durch die Interaktion der östrogenen Substanzen mit dem Nervensystem wird die geistige Entwicklung negativ beeinflusst [58,75].

Die meisten Autoren halten die Bisphenol-A-Belastung durch Fissurenversiegelungsmaterialien für klinisch nicht relevant. Es fehlt jedoch nach wie vor an sicheren Erkenntnissen.

In der zahnmedizinischen Praxis werden Fissurenversiegelungsmaterialien besonders bei jugendlichen Patienten angewendet, ohne sicher ausschließen zu können, dass Bisphenol A gesundheitliche Schäden hervorrufen kann. Es muss vor allem berücksichtigt werden, dass insbesondere Kinder aus toxikologischer Sicht gefährdet sind [20,86]. Rechnet man der Belastung durch dentale Werkstoffe die Bisphenol-A-Aufnahme aus alltäglichen Gebrauchsgegenständen hinzu, kann die toxikologisch tolerierbare Menge von 10 µg/kg Körpergewicht/Tag bei einem Kind schnell überschritten werden.

2 Literaturübersicht

2.1 Dentale Kunststoffe

Der Wunsch nach zahnfarbenen Füllungswerkstoffen, die ein minimalinvasives Vorgehen ermöglichen, führte Anfang der 1950er Jahre zur Entwicklung des so genannten Bowen-Kunststoffes [80]. Der von Bowen entwickelte Kunststoff, das Bis-GMA, ist eine Verbindung aus Epoxidharzen und Acrylaten. Durch den Zusatz von Füllstoffen konnten die physikalischen und chemischen Eigenschaften der Materialien optimiert werden. Bis-GMA ist die Basis der dentalen Komposite, die im Laufe der Zeit stetig verbessert werden konnten. Unter anderem unterscheiden sich Komposite durch Variation der Füllpartikel und ihrer Größe [80].

Die Komposit-basierten Fissurenversiegelungsmaterialien, die in der vorliegenden Studie untersucht werden, sind dünnfließend. Es gibt sowohl gefüllte als auch ungefüllte Systeme. Als Basismonomer dienen je nach Versiegler, Bisphenol-A-Diglycidyl-Methacrylat (Bis-GMA), Urethandimethacrylat (UDMA) oder Triethylen-Glycol-Dimethacrylat (TEGDMA). Bis-GMA ist ein Reaktionsprodukt aus Bisphenol A und Glycidylmethacrylat und stellt den Basisbestandteil der Fissurenversiegler dar. Bisphenol A ist ein Molekül bestehend aus zwei phenolischen Ringen, wobei die beiden endständigen OH-Gruppen die Stoffeigenschaften bestimmen [54].

Über einen Glycidylring werden die Methylmethacrylat-Gruppen an die Hydroxylgruppe des Bisphenol A geknüpft [30] (vgl. Abb. 1 und 2).

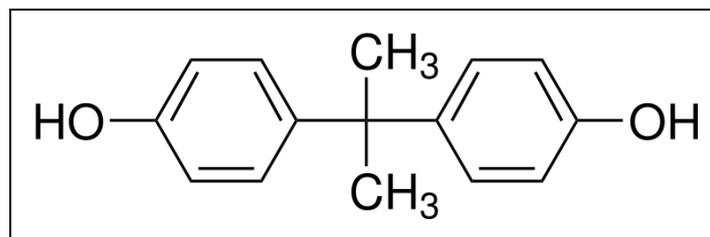


Abbildung 1: Strukturformel Bisphenol A

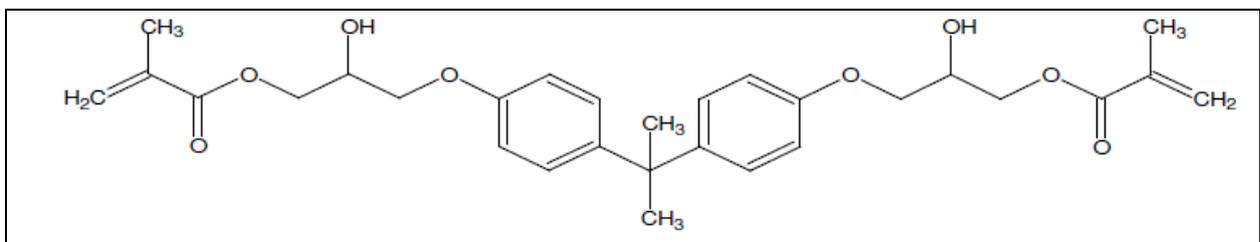


Abbildung 2: Bisphenol-A-Glycidylmethacrylat

2. Literaturübersicht

Fissurenversiegelungen werden in der Zahnmedizin bei Kindern als prophylaktische Maßnahme angewandt, indem Fissuren und Grübchen der Zähne nach ihrem Durchbruch mit einem dünnfließenden Bowenharz versiegelt werden.

Fissurenversiegelungsmaterialien besitzen eine hohe Fließfähigkeit, damit die Fissuren und Grübchen möglichst vollständig verschlossen werden. Bei Verwendung von Kampferchinon als Initiator wird durch Lichtzufuhr (Wellenlänge bei 450 nm) die Polymerisation initiiert und es entsteht ein kreuzvernetztes Polymer. Dabei werden die Initiatoren durch Lichtzufuhr in Startradikale umgesetzt. Da jedoch der Polymerisationsvorgang empfindlich gegenüber Sauerstoff ist, entsteht während der Polymerisation eine Sauerstoffinhibitionsschicht. Um eine gesundheitsschädigende Wirkung durch nicht umgesetzte Monomeranteile zu vermeiden, sollte die Sauerstoffinhibitionsschicht entfernt werden [61].

Die Haftung am Zahn erfolgt über mechanische Bindung, indem der Versiegler nach Ätzung der unpräparierten Schmelzoberfläche mit einer Phosphorsäure in die Fissur eindringt und unter Ausbildung von Zotten, den so genannten Tags, an der geätzten Schmelzoberfläche eine mikromechanische Retention eingeht [22].

Allerdings ist unklar, ob die Bisphenol-A-Belastung durch zahnärztliche Komposite einen klinisch relevanten endogenen Effekt hat. Eine hydrolytische Aufspaltung von Bis-GMA ist nach der endgültigen Polymerisation nicht ausgeschlossen. Es ist möglich, dass durch die Mundhöhlenbedingungen und Speichelbestandteile Degradationsprodukte aus dem polymerisierten Material freigesetzt bzw. umgesetzt werden [8,97]. Die Kunststoffe sind in der Mundhöhle chemischen und mechanischen Belastungen ausgesetzt. Spezifische Esterasen sind in der Lage, Methacrylatgruppen zu spalten, wodurch die so genannten Degradationsprodukte entstehen können [6,8,71]. Besonders Pseudocholinesterasen und Cholesterolesterasen werden in der Literatur als potente Esterasen angegeben [29,44]. Durch die Hydrolyse von Bisphenol-A-Glycidylmethacrylat entsteht das Degradationsprodukt Bishydroxy-Propoxyphenyl-Propan (bisHPPP) [7,29,30,44,51,82,93,94]. Bishydroxy-Propoxyphenyl-Propan enthält zusätzliche Hydroxylgruppen, die die Löslichkeit des Molekül steigern [93]. Sowohl die ungebundenen Anteile aus der Sauerstoffinhibitionsschicht als auch die Degradationsprodukte stehen unter dem Verdacht östrogene Wirkung erzielen zu können.

Die ersten sieben Tage nach Legen einer Kunststofffüllung sind gesundheitlich als kritisch anzusehen, da in dieser Zeit mit einer besonders hohen Abgabe von Eluaten wie Bisphenol A zu rechnen ist [45]. Nach diesem Zeitraum ist eine Abgabe von Kompositbestandteilen durch den mechanischen Abrieb beim Kauprozess [71] und direkten Kontakt mit der Mundschleimhaut und dadurch ausgelöste chemische Reaktionsprodukte denkbar [45].

2.2 Endokrin wirksame Substanzen und Östrogenrezeptoren

Östrogene sind Steroidhormone, strukturell dem Cholesterin verwandt und lipophil. Lipophile Zellmembranen können durchdrungen werden und infolgedessen gelangen die Östrogene in ihre Zielzellen. Im Zellinneren bilden diese Hormone einen Rezeptor-Hormon-Komplex aus, indem sie an spezifische Östrogenrezeptoren binden. Durch die Aktivierung des Rezeptorkomplexes wird die Transkription der Messenger RNA eingeleitet [41,95].

Steroidhormone modulieren die Fortpflanzungsfunktionen und sind verantwortlich für die Entwicklung der primären und sekundären Geschlechtsmerkmale [65,95]. Die primären Geschlechtsorgane entwickeln sich während der Embryonalzeit und die Ausbildung der sekundären Merkmale beginnt während der Pubertät. Die Thelarche und Menarche, Reifung der Eierstöcke und somit die geschlechtliche Differenzierung [60,65] wird über die Steroidhormone reguliert. Am Ende der Pubertät sind primäre und sekundäre Geschlechtsmerkmale vollständig ausgereift.

Außerdem sind die Steroidhormone an Knochenumbauprozessen beteiligt [41]. Aufgrund verminderter Produktion von Östrogen bei Frauen in der Menopause überwiegt der Knochenabbauprozess, was die Bedeutung des Hormons auf den Knochenmetabolismus verdeutlicht. Es ist auch bekannt, dass Östrogene antioxidative Wirkungen besitzen und somit einer Gewebeschädigung entgegenwirken können, indem sie freie Radikale auffangen [58]. Der Östrogen Spiegel variiert zyklisch und ist besonders wichtig für die Steuerung des Menstruationszyklus, der eine wichtige Voraussetzung für die Fruchtbarkeit der Frau ist. Die männlichen Sexualhormone, die Androgene, werden in den Keimdrüsen und den Nebennieren gebildet und sind ebenfalls an der Ausbildung der Geschlechtsmerkmale beteiligt sowie verantwortlich für die Spermatogenese. Außerdem fördern endogene Hormone das Längenwachstum, die Libido, stimulieren die Erythropoese und sind verantwortlich für die anabole Stoffwechselwirkung, die sich in der Zunahme von Muskel- und Knochenmasse manifestiert [41].

Östrogene beeinflussen die Mundschleimhaut. Dies ist besonders bei schwangeren Frauen zu beobachten. Dies wird mit dem veränderten Hormonspiegel während der Schwangerschaft in Zusammenhang gebracht [95]. Bei Anwendung oraler Kontrazeptiva, während des Menstruationszyklus und der Pubertät sind ebenfalls Veränderungen an der Gingiva zu beobachten [60]. Häufig leiden Patienten mit verändertem Hormonspiegel an Gingivahyperplasien, Gingivitiden und Gingivablutungen. Bei schwangeren Frauen wurde im Vergleich zu einer Kontrollgruppe mit Frauen nach der Entbindung ein deutlich pathogeneres parodontales Keimspektrum nachgewiesen [18]. Parodontal pathogene Keime im Speichel, wie Porphyromonas gingivalis und Prevotella intermedia, korrelieren mit dem Hormonspiegel der Frau [18]. Zirkulierende Sexualhormone wirken stimulierend auf Prevotella intermedia Spezies [10]. Die Anwesenheit von Keimen

2. Literaturübersicht

wie *Prevotella nigrescens* zeigen ebenfalls eine positive Korrelation mit Gingividen während der Schwangerschaft [36].

In der Gingiva schwangerer Frauen wurden spezifische Östrogen- und Progesteronrezeptoren nachgewiesen. Diese Hormone sind in der Lage, die Produktion von Prostaglandinen anzuregen, die entzündungsfördernd wirken. Dies führt während der Schwangerschaft zu Gingividen [10].

Die Steuerung der Hormonausschüttung wird über den neuroendokrinen Steuerkreis reguliert.

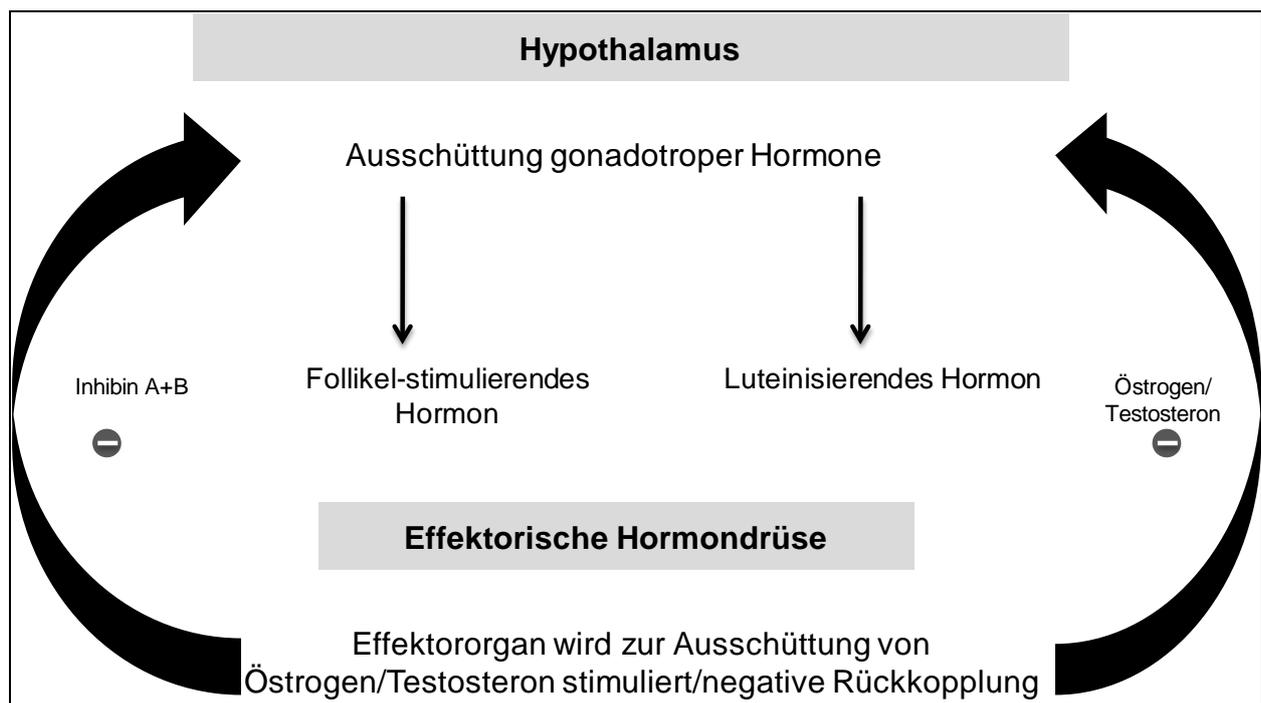


Abbildung 3: Neuroendokriner Regelkreis zur Steuerung der Sexualfunktion modifiziert nach [41] und [98]

Wie aus der Abbildung 3 ersichtlich wird, besteht das endokrine System aus dem Hypothalamus und den effektorischen Hormondrüsen. Die im Hypothalamus freigesetzten Hormone („Releasing-Hormone“) gelangen in die Hypophyse, die durch den Reiz zur Ausschüttung glandotroper Hormone angeregt wird. Die glandotropen Hormone bewirken in dem Effektorhormon, bei der Frau in den Eierstöcken und beim Mann in den Hoden, ein Freisetzen stoffwechselaktiver Hormone. Die Konzentration der Hormone wird über eine negative Rückkopplung konstant gehalten. Übersteigt die Hormonkonzentration ihr Maximum, empfängt der Hypothalamus diese Information. Die Steroidhormone beeinflussen dabei die Gonadotropin-Releasing-Hormone über afferente Neurone [98]. Die Feedback-Regulation der luteinisierenden Hormone erfolgt direkt durch die Steroidhormone und das Follikel-stimulierende Hormon wird durch Inhibin kontrolliert [98]. Auf diese Weise wird der Hypothalamus gehemmt und es werden keine

2. Literaturübersicht

weiteren Hormone ausgeschüttet. Sobald der Hormonspiegel jedoch sinkt, wird diese Hemmung aufgehoben und im Hypothalamus eine vermehrte Bildung und Ausschüttung von Hormonen induziert [41].

2.3 Endokrin wirksame Substanzen

2.3.1 Wirkmechanismus östrogenen Substanzen

Endokrin wirkende Substanzen besitzen die Fähigkeit, endokrine Hormone in ihrer Funktion zu verändern. Dabei werden Substanzen, die um den Rezeptorbindungsplatz konkurrieren, von einer weiteren Substanzklasse unterschieden, die die Synthese, die Ausschüttung, den Transport, den Wirkungsmechanismus und auch die Ausschüttung der Hormone negativ beeinflusst.

Bisphenol A gehört zur Substanzklasse, die um den Rezeptorbindungsplatz von Östrogenen konkurriert und dessen Bindung an die Rezeptoren endogene Effekte imitiert [35]. Da sie in das hormonelle Steuerungssystem eingreifen, entfalten östrogene Substanzen ihre Wirkung im Niedrig-Dosis-Bereich. Schon geringste Mengen an endokrin wirksamen Stoffen reichen aus, um das Gleichgewicht zwischen männlichen und weiblichen Hormonen zu beeinflussen. Der Niedrig-Dosis-Bereich wurde für östrogene Stoffe mit 50 mg/kg Körpergewicht/Tag bestimmt. Dieser Wert stellt eine Niedrigdosis einer Substanz dar, bei der in Tierexperimenten noch eine Wirkung zu beobachten ist, der so genannte LOAEL (lowest observed adverse effect level) [28,47,57,100].

Mit Hilfe dieser Angabe wird mit einem Sicherheitsfaktor von 1000 ein Wert berechnet, von dem bei langfristiger und regelmäßiger Aufnahme keine Schädigung zu erwarten sind, der für endokrin wirksame Substanzen bei 0,05 mg/kg Körpergewicht/Tag liegt und als tolerable daily intake (TDI) angegeben wird [47]. In Anbetracht der Wirkungen an den Reproduktionsorganen und der toxikologischen Datenlage hat die Europäische Kommission den TDI auf 10 µg/kg/Tag gesenkt [47,57].

Diese Stoffe folgen nicht der toxikologischen Wirkungsweise, das heißt, dass die Schädigung nicht von der Menge der Substanz abhängig ist, sondern durch den Eingriff in das neuroendokrine System unabhängig von der Menge Schädigungen hervorgerufen werden können [20]. Ferner können diese Substanzen durch ihre agonistische Wirkung Fehlentwicklungen hervorrufen, selbst wenn sie zum physiologischen Zeitpunkt der Entwicklungsphase eingreifen. Durch die Bindung an die Östrogenrezeptoren zu einem unphysiologischen Zeitpunkt werden bestimmte Entwicklungsprozesse früher eingeleitet, die dem Entwicklungszeitpunkt nicht entsprechen. Es werden vor allem verfrühte Maturation der Gonaden und plötzlicher Wachstumsschub beobachtet. Der Einfluss von endokrin wirksamen Substanzen führt bei Mädchen zur verfrühten

2. Literaturübersicht

Menarche, Thelarche und Schambehaarung [81]. Durch den Einfluss der Xenoöstrogene auf den Hypothalamus können Veränderungen im endokrinen System verzeichnet werden.

Endokrine Substanzen beeinflussen zudem die Menge der zirkulierenden Hormone durch Eingreifen in deren Produktion und Metabolismus, sowie in den Transport oder verändern direkt deren Wirkung durch Bindung an den Rezeptoren [85]. Im Falle eines erhöhten Hormonspiegels erhält der Hypothalamus ein negatives Feedback und die Sekretion von gonadotropinen Hormonen wird eingestellt [85]. Im Falle einer antagonistischen Wirkungsweise können diese Stoffe durch Blockierung die Funktion der endogenen Hormone hemmen.

Enzyme sind am Abbau der schädigenden Substanzen beteiligt. Der Abbau von Bisphenol A erfolgt durch Glucuronidierung. Dabei wird das Bisphenol A an Glucuronsäure gebunden und als Glucuronide renal oder biliär ausgeschieden. An der Reaktion ist unter anderem das Enzym UDP-Glucuronosyltransferase als Katalysator beteiligt [104]. Da jedoch Kinder über eine geringere Konzentration dieser Enzyme verfügen, wird deutlich, dass das Risiko einer Missbildung und daraus resultierenden Erkrankung für Kinder höher einzustufen ist als für Erwachsene [20].

2.3.2 Bisphenol A als endokrin wirksame Substanz

Endokrin wirksame Substanzen verursachen Erkrankungen durch Eingriff in das neuroendokrine System. Die Störung erfolgt entweder durch antagonistische Effekte, indem die Rezeptoren gehemmt werden oder indem, wie im Fall von Bisphenol A durch Bindung an einen Östrogenrezeptor, ein agonistischer bzw. östrogener Effekt ausgelöst wird [20,58,70]. Durch den Eingriff an den Östrogenrezeptoren während der Entwicklungsphase wird eine verfrühte Geschlechtsreife bei Kindern mit der Wirkung von Bisphenol A in Zusammenhang gebracht. Dieser Effekt wird erzielt, indem die Aktivierung der Rezeptoren zu einem unphysiologisch frühen Zeitpunkt erfolgt, das heißt, vor Beginn der Pubertät. Die Evidenz der präpubertären Veränderungen wird mit tierexperimentellen und epidemiologischen Untersuchungen gestützt [85]. Eine verfrühte Pubertät konnte an Ratten beobachtet werden, die einer Bisphenol-A-Exposition ausgesetzt worden waren [39].

Die Abnahme der Spermienzahl, eine Fehlbildung der Sexualorgane, die Zunahme der Prostata- bzw. Mammakarzinome, Diabetes Typ II und Herz-Kreislauf-Erkrankungen werden mit einer erhöhten Aufnahme von Bisphenol A in direkten Zusammenhang gebracht. Lang et al. konnten nachweisen, dass bei Patienten, die unter Übergewicht leiden, eine signifikant erhöhte Bisphenol-A-Konzentration im Urin vorzufinden ist. Bei Probanden mit einem Body-mass-Index (BMI) im Normbereich von 18,5 bis 24,9 konnten Bisphenol-A-Werte bis zu 3,91 ng/ml im Urin nachgewiesen werden, wohingegen Patienten, die an Adipositas litten, Werte bis zu 6,93 ng/ml aufwiesen [50]. Daraus lässt sich die Schlussfolgerung ableiten, dass die oben genannten Er-

2. Literaturübersicht

krankungen durch Bisphenol A beeinflusst werden können. Bisphenol A und dessen Konjugate werden in der Leber abgebaut und über die Nieren ausgeschieden. In diesem Zusammenhang ist insbesondere eine Assoziation mit Insulin, Diabetes mellitus und Adipositas zu nennen [2,4,5,50].

Da Enzyme, wie zum Beispiel die UDP-Glucuronosyltransferase, eine protektive Wirkung besitzen, sind vor allem Säuglinge und Kinder aufgrund des ungenügend ausgebildeten Abwehrsystems einem erhöhten Risiko einer körperlichen Schädigung ausgesetzt. Dies betrifft vornehmlich die geistige und die körperliche Entwicklung, da Bisphenol A vor allem mit dem Nervensystem interagieren kann [20].

Darüber hinaus sollte die Kombinationswirkung endokrin wirksamer Substanzen berücksichtigt werden. Die Exposition von Phytoöstrogenen aus der Nahrung, die vor allem in Sojabohnen enthalten sind, kann zu einer Variation des endogenen Hormonspiegels führen [23]. Damit stellt sich eine weitere Belastungsquelle im Sinne einer additiven Wirkungsweise dar. Aufgrund der Komplexität des endokrinen Systems ist die Bewertung dieser Effekte jedoch schwierig [25].

Mit der Exposition von Industriechemikalien vom Bisphenol-A-Typ werden zudem Geburtsdefekte und Embryotoxizität [90], Entwicklungsstörungen [75], psychische Störungen [35,58], Testicular-Dysgenesis-Syndrom [35], Demaskulinisierung und Hypospadie (Fehlmündung der Harnröhre) und auch ein sinkender Anteil an männlichen Neugeborenen unmittelbar in Zusammenhang gebracht [35].

2.4 Tierexperimentelle Versuche

Schwengberg et al. behandelten Stammzellen von Rattenembryonen mit dentalen Kunststoffen auf der Basis von Bisphenol-A-Glycidylmethacrylat (Bis-GMA), Urethandimethacrylat (UDMA), Hydroxyethylmethacrylate (HEMA) sowie Triethylenglycoldimethacrylate (TEGDMA) und konnten embryotoxische Effekte an diesen Zellen nachweisen [90].

Auch das Reizdarmsyndrom und Abdominalschmerzen werden mit der Exposition gegenüber Bisphenol A assoziiert. Darmepithelzellen und sensorische Nervenzellen regulieren und steuern die intestinale Permeabilität und wirken antiinflammatorisch. Die peripher empfangenen Reize werden an das zentrale Nervensystem weitergeleitet. Braniste et al. bewiesen in Tierstudien, dass Bisphenol A die Darmpermeabilität sowie Nozizeptoren im Darm beeinflusst. Die Forscher leiten aus ihren Versuchsergebnissen die Vermutung ab, dass Bisphenol A an Rezeptoren der Darmepithelzellen angreift, die Permeabilität der Darmmucosa verändert und infolgedessen verantwortlich für entzündliche Reaktionen des Darmes sein kann. Die Erkrankung äußert sich mit Flatulenz, Obstipation/Diarrhöe und krampfartigen Magenschmerzen. Im Rahmen einer kli-

2. Literaturübersicht

nischen Studie an Ratten konnte gezeigt werden, dass nach oraler Exposition mit endokrin wirksamen Substanzen eine deutliche Permeabilität der Mucosa resultiert [14].

Manthey und Mitarbeiter fütterten ovariectomisierte Ratten drei Wochen lang mit Bisphenol A angereicherterem Futter und untersuchten anschließend das Genexpressionsmuster aus den Lysaten des Gehirns. Die Untersuchungen ergaben deutliche Veränderungen der Genexpressionsmuster, woraus sie schlussfolgerten, dass die Einschätzung der Wirkung endokriner Disruptoren sehr schwierig ist, da vor allem die Östrogenrezeptoren im Gehirn regionär spezifisch sind und sich während der Lebenszeit ändert [58]. Die Ergebnisse der Gruppe von Poimenova et al. bestätigen den Einfluss von Bisphenol A auf das Gehirn. Sie untersuchten Ratten nach Exposition mit Bisphenol A auf ihr Verhalten und ihre Lernbereitschaft und stellten fest, dass die behandelten Ratten gegenüber der Kontrollgruppe deutliche Interferenzen hinsichtlich der motorischen Funktionen und der Lernbereitschaft aufzeigten [75].

Drozd et al. untersuchten in vitro die Genotoxizität und inkubierten menschliche Lymphozyten mit Bisphenol A und konnten Strangbrüche der DNA nachweisen, die zu einer Verzögerung der S-Phase im Zellzyklus führen [24].

Das Risiko an Diabetes mellitus unter Einfluss von Bisphenol A zu erkranken wurde in einigen tierexperimentellen Studien untersucht. Die Untersuchungen von Adachi et al. [2] sowie Alonso-Magdalena et al. [4] bestätigen den Einfluss von Bisphenol A auf die Insulinsekretion und somit das Risiko an Diabetes zu erkranken.

Oehlmann und Mitarbeiter untersuchten die Bisphenol-A-Wirkung an Vorderkiemenschnecken [87]. Dabei wurden vier verschiedene, getrennt geschlechtliche Vorderkiemenschnecken-Spezies (Gastropoda [Schnecken] - Prosobranchia [Vorderkiemenschnecken]) untersucht. Die Tiere wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen von Bisphenol A im Wasser belastet und über Zeitspannen von wenigen Wochen bis mehreren Monaten auf Veränderungen untersucht (Tabelle 1) [87].

2. Literaturübersicht

Tabelle 1: Zusammenfassung der Schneckenversuche von Oehlmann et al. [70]; BPA=Bisphenol A

Untersuchte Schneckenart	Expositionskonzentration mit BPA	Experiment	Ergebnisse
Marisa cornuarietis	1 µg BPA/l ; 5 µg BPA/l; 25 µg BPA/l; 100 µg BPA/l über 5 Monate	Hochkonzentrationsexperiment	<ul style="list-style-type: none"> • Entstehen von Superweibchen • Vergrößerung der Geschlechtsdrüsen • Stimulation von Gelege- und Eiproduktion • Missbildungen an den Eileitern • Zusätzliche weibliche Geschlechtsorgane, wie eine zweite Vagina • Vergrößerung des Volumens der Kapseldrüse • Riss im Eileiter • Austritt von Gelegemasse aus den Rissen • Erhöhte Mortalität • Maximaler Effekt schon bei 25 µg BPA/l
Marisa cornuarietis	Kontrolle; 1 µg BPA/l und 100 µg BPA/l über 12 Monate	Lebenszyklusexperiment im Hochkonzentrationsbereich	<ul style="list-style-type: none"> • Vergleichbare Effekte wie bei adulten Tieren • Vergleichbar erhöhter Anteil an Missbildungen der Eileiter • Zeitlich verzögerte Laichtätigkeit
Marisa cornuarietis	50 ng BPA/l; 100 ng BPA/l; 250 ng BPA/l; 500 ng BPA/l; 1000 ng BPA/l über 6 Monate	Niedrigkonzentrationsexperiment	<ul style="list-style-type: none"> • Signifikante Steigerung der Eiproduktion mit Ausnahme der 50 ng/l Gruppe • Bei Expositionswerten ab 500 ng BPA/l Steigerung der Fortpflanzung um bis zu 160 % im Vergleich zur Kontrollgruppe • Pathologische Veränderungen der Geschlechtsorgane
Potamopyrgus antipodarum	1 µg BPA/l; 5 µg BPA/l; 25 µg BPA/l; 100 µg BPA/l über 9 Wochen	Expositionsexperiment während der sexuellen Ruhephase der Schnecken (im Hochsommer)	<ul style="list-style-type: none"> • Erhöhte Embryonenzahl
Nassarius reticulatus	10 µg BPA/kg; 50 µg BPA/kg; 1000 µg BPA/kg in künstlichen Sedimenten über 3 Monate	95 % Quarzsand+ 5% Torf → künstliches Sediment → Versuch während Hauptproduktionsphase (im Frühjahr)	<ul style="list-style-type: none"> • Vergrößerung der akzessorischen Geschlechtsdrüsen • Schwere „Uterusgewichte“ im Vergleich zur Kontrollgruppe
Nucella lapillus	1 µg BPA/l; 25 µg BPA/l; 100 µg BPA/l über 3 Monate	Exposition nach Ende der Fortpflanzungsphase (im Frühsommer); zu diesem Zeitpunkt werden in der Regel keine Eier produziert	<ul style="list-style-type: none"> • Stimulation der Eiproduktion • Missbildungen am Eileiter • Veränderungen sind nicht konzentrationsabhängig

2. Literaturübersicht

Schulte-Oehlmann et al. [87] beobachteten, dass alle getesteten Schneckenarten eine Veränderung der Morphologie nach Exposition mit BPA aufwiesen. Bei der Spezies *Nucella lapillus* ist eine konzentrationsunabhängige Veränderung zu verzeichnen und je nach Spezies sind die pathologischen Veränderungen mehr oder weniger ausgeprägt. Daraus ziehen die Autoren den Schluss, dass durch eine Bisphenol-A-Exposition eine „verfrühte sexuelle Ruhephase“ resultiert, und morphologische Veränderungen an den Geschlechtsorganen zu Einschränkungen der Fortpflanzungsfähigkeit führen [87].

Nach Ursachen für eine Minderung der Spermienzahl suchten Hayatpour und Monsees an Sertoli Zellen bei Ratten [37]. Sertoli-Zellen sind verantwortlich für die Modulation der Spermatogenese sowie die Produktion von Wachstumsfaktoren und Hormonen. Die Teilung und somit die Proliferation der Sertoli-Zellen ist jedoch mit Ausbildung der Blut-Hoden-Schranke beendet. Die Proliferation und damit die Anzahl der Sertoli-Zellen bestimmen die Menge der gebildeten Spermatozoen. Östrogenartige Chemikalien können in der Wachstumsphase die Proliferation hemmen, indem sie das Freisetzen der follikelstimulierenden Hormone aus der Hypophyse verhindern. Nach Inkubation juveniler Sertoli-Zellen von Ratten mit Bisphenol A konnten die Autoren eine signifikante Steigerung von Laktat und Inhibin-B nachweisen, sofern die Konzentration von Bisphenol A über 3 μM lag. Laktat dient als Energielieferant für Spermatozoen und Inhibin-B wirkt über die negative Rückkopplung als Inhibitor auf die Hypophyse. Durch diese Hemmung wird die Freisetzung von FSH (Follikel stimulierendes Hormon) verhindert und somit die Spermatogenese negativ beeinflusst [37].

Poimenova et al. führten schwangeren Ratten Bisphenol A über die tägliche Nahrung zu und untersuchten die Neugeborenen auf ihre Lernfähigkeit [75]. Die Exposition der Feten bzw. der Säuglinge erfolgte über die Plazenta bzw. die Muttermilch. In einem Y-förmig gestalteten Labyrinth wiesen die neugeborenen Ratten im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne Bisphenol A eine geringere Motivation und Lernbereitschaft auf. Außerdem war bei den Bisphenol-A-Ratten der Glucocorticoidplasmaspiegel erhöht und die Zahl der hippocampalen Glucocorticoidrezeptoren war reduziert [75]. BPA stört die Hirnentwicklung und führt bei Säugetieren zu geistiger Retardierung. Dabei reichen in Laborversuchen an Ratten Dosierungen von ca. 20-400 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{Tag}$ während der Fetalzeit aus, um bleibende Schäden hervorzurufen [100].

Aus der Schädigung des Hippocampus resultiert eine Störung des neuroendokrinen Regelkreises. Dabei wird die Informationskette an den Hypothalamus unterbrochen, was sich in einer Hypersekretion von Glucocorticoiden manifestiert.

2.5 Nachweismethoden für Bisphenol A

2.5.1 Reporter-gen-Assay

Der Reporter-gen-Assay dient dem Nachweis von agonistischen und antagonistischen Wirkungen an humanen Östrogenrezeptoren. Genregulatorische DNA-Sequenzen können mit Hilfe des Assays charakterisiert werden. Als Reportergene dienen besonders Gene, deren Genprodukte mit einfachen biochemischen Methoden nachweisbar sind. Die Expression des Reportergens wird durch Klonierung des zu untersuchenden Promoterbereiches vor die kodierende Sequenz des Reportergens initiiert. Das Reporter-gen wird an den Promoter fusioniert und die Genaktivität führt folglich zur Expression des Reportergens.

Anhand eines Assays, bei dem Hefezellen verwendet werden, soll dieses Verfahren näher erläutert werden: Bei diesem Verfahren werden gentechnisch veränderte Hefezellen (ausgestattet mit einem Östrogenrezeptor- α -Gen und Expressionsplasmid) zum Nachweis von östrogenen Substanzen genutzt. Das Expressionsplasmid besteht aus Östrogen-responsiven Sequenzen und einem Reporter-gen, das für β -Galactosidase kodiert. Die Zellen werden mit östrogenartigen und chromogenen Substanzen in Verbindung gebracht. Nach Inkubation der Zellen mit den Testsubstanzen wird ein Liganden-Rezeptor-Komplex und dadurch die Expression der β -Galactosidase induziert [35].

Als Reportergene können, wie bereits beschrieben, Gene von Enzymen, wie die β -Galactosidase, dienen, deren Genexpression anschließend mit enzymatischen Untersuchungsverfahren quantifiziert werden kann. Der Nachweis kann dabei colorimetrisch, photometrisch, radiometrisch oder fluorimetrisch erfolgen. Die Aktivität der β -Galactosidase wird mit Hilfe der Absorption bei 540 nm gemessen. Durch die Spaltung der chromogenen Substrate Chlorphenolrot- β -D-Galactopyranoside (CPRG) durch die β -Galactosidase entsteht ein blauer Farbstoff, der anschließend quantifiziert werden kann [38,69,78,101,102].

Die Spezifität ist abhängig von der Anwendung und kann bei einigen enzymatischen Verfahren aufgrund des Einflusses endogener Enzyme variieren [38]. Ein mögliches Problem kann bei der Anwendung von β -Galactosidase als Reporter-gen das Vorhandensein von endogener Galactosidase darstellen [101]. Die Sensitivität ist sehr unterschiedlich und wird für die Anwendung von Fluoreszenzanalysen als hoch eingestuft [38].

2.5.2 E-screen-Assay

Der Assay dient dem Nachweis östrogenen Aktivität chemischer Substanzen unter Ausnutzung der proliferativen Effekte auf die Zielzellen. Dies stellt eine quantitative Messmethode dar, bei der die Proliferation der MCF7-Zellen (Brustkrebszelllinien) anhand der Zellzahlen einer Nega-

2. Literaturübersicht

tivkontrolle (Abwesenheit von östrogenen Substanzen), einer Positivkontrolle (Anwesenheit von 17β -Estradiol) und in Anwesenheit unterschiedlicher Konzentrationen der östrogenen Substanzen miteinander verglichen werden [96]. Als Zielzellen dienen bei diesem Assay humane MCF7-Zellen, die auf östrogene Substanzen mit Zellvermehrung reagieren [26]. Am Anschluss an die Zellproliferation wird die Lyse dieser Zellen herbeigeführt und die Anzahl der Zellkerne bestimmt. Die Bestimmung erfolgt in einem Partikelzählgerät (Coulter Counter).

Die östrogene Aktivität wird anhand der Wirksamkeit (Potenz) und der Wirkungsstärke (efficiency) bewertet. Die Wirksamkeit der östrogenen Substanz wird an der benötigten Menge der Substanz zum Erzielen einer Wirkung im Vergleich zur Positivkontrolle bemessen. Die Wirksamkeit einer Substanz ist somit das Verhältnis zwischen der Minimalkonzentration von 17β -Estradiol, die für eine maximale Zellproliferation benötigt wird, und der benötigten Minimalkonzentration der Testkomponente, um den vergleichbaren Effekt zu erzielen. Die Wirkungsstärke ist das Verhältnis des Zellgewinns im Verhältnis zur Testreihe bzw. zur positiven Kontrolle [96,99].

2.5.3 Chromatographische Trennverfahren

Bei chromatographischen Verfahren wird die Trennung von Stoffgemischen durch Verteilung der verschiedenen Materialien zwischen einer mobilen und einer stationären Phase erreicht. Grundlegend lassen sich chromatographische Trennverfahren nach dem Zustand der mobilen Phase unterscheiden. Befindet sich diese im flüssigen Zustand spricht man von einer Flüssigkeitschromatographie (LC, engl. liquid chromatography) und bei einer gasförmigen mobilen Phase von einer Gaschromatographie (GC) [49]. Nach der Trennung der Stoffe voneinander werden diese mit Hilfe eines geeigneten Detektors analysiert und quantifiziert.

2.5.3.1 Gaschromatographie

Bei gaschromatographischen Trennmethode durchläuft ein inertes Trägergas eine thermostatisierte Säule, die entweder mit feinkörnigem Trägermaterial oder mit einer flüssigen stationären Phase beschichtet ist [49]. Das Stoffgemisch (Gas, verdampfbare Flüssigkeit oder Feststoff) wird in eine so genannte Trennsäule appliziert und beim Durchgang durch diese mit einem Trägergas benetzt. Dadurch wird der chromatographische Vorgang initiiert und die getrennten Gase bzw. Stoffe gelangen am Ende der Säule an einen Detektor. Ein Massenspektrometer fungiert dabei als Detektor.

2.5.3.2 Flüssigkeitschromatographie

Bei der Flüssigkeitschromatographie werden gelöste Stoffe getrennt und je nach Trägermaterial werden Säulen-, Papier- und Dünnschichtchromatographie unterschieden [49]. Die

2. Literaturübersicht

mobile Phase stellt die Flüssigkeit dar, die sich entlang der stationären Phase bewegt und die zu untersuchenden Substanzen mit unterschiedlicher Geschwindigkeit mitnimmt [55].

Die High Performance Liquid Chromatography oder Hochleistungsflüssigkeitschromatographie ist eine fortschrittliche Weiterentwicklung der Flüssigkeitschromatographie. Diese Form der Chromatographie besitzt eine deutlich höhere Schnelligkeit und ein verbessertes Auflösungsvermögens [49] gegenüber der einfachen Flüssigkeitschromatographie. Bei der Hochleistungschromatographie wird die mobile Phase unter Hochdruck durch die Säule gepumpt [55].

2.5.3.3 Detektion von chromatographisch getrennten Stoffgemischen

Anschließend an die Chromatographie erfolgt die Detektion der Analyte mit einem geeigneten Verfahren. Es werden die Massenspektrometrie, UV-Detektion und die Fluoreszenzdetektion unterschieden.

An einem Massenspektrometer werden nach der jeweiligen Funktion vier verschiedene Abschnitte unterschieden: Probenzuführung, Ionen-Erzeugung, Massentrennung und Ionen-Nachweis. Das Ende der Säule steht in direktem Kontakt mit der Ionisationskammer des Massenspektrometers. Dort wird der Stoff nach Zufuhr in den Detektor sofort ionisiert und gemessen [62].

Bei der Fluoreszenzdetektion werden durch geeignete Energiequellen, wie zum Beispiel Deuterium, gepulste Xenonlampe oder Laserlichtquelle eine Fluoreszenzanregung bewirkt. Die Signalintensität ist dabei proportional zur Energie, die zur Fluoreszenzanregung angewendet wird [91]. Diese Methode der Detektion weist eine besonders hohe Empfindlichkeit und Selektivität auf [91].

Bei der UV-Detektion erfolgt die Quantifizierung durch Messen der Absorption. Dabei tritt Licht mit einer definierten Wellenlänge und einer bestimmten Intensität (I_0) durch die Kapillare. Beim Durchgang des Lichtes durch die Kapillare wird ein Teil absorbiert und der restliche, nicht absorbierte Teil wird durch die Photodiode detektiert. Die Absorptionsdetektion ist durch das Lambert-Beersche Gesetz ($A = \log I_0/I = \epsilon \cdot c \cdot d$) definiert. Dabei ist A die Absorption, I_0 die Anfangsintensität und I die durchgelassene Lichtintensität. Die Absorption und damit die Schwächung der Lichtintensität wird vom Extinktionskoeffizienten ϵ , der Konzentration c und der Kapillardicke d bestimmt. Da die Absorption von der optischen Weglänge abhängig ist und diese durch den Innendurchmesser der Kapillare vorgegeben wird, kann die Empfindlichkeit durch Vergrößerung des Innendurchmessers der Kapillare erhöht werden. Um Streulicht zu vermeiden, muss das einfallende Licht senkrecht auf die Kapillare auftreffen [49,77,91].

2.6 Literatur zu klinischen Untersuchungen von Versiegelungsmaterialien auf BPA

In der wissenschaftlichen Literatur findet sich eine große Auswahl an verschiedenen Methoden zum Nachweis von BPA. Die damit gewonnenen Ergebnisse werden jedoch kontrovers diskutiert.

Die Arbeit von Olea et al. [71] ist eine der am häufigsten zitierten klinischen Untersuchungen zu Bisphenol A. Olea und Mitarbeiter untersuchten den Versiegler Delton in einer klinischen Studie, bei der sie das Material zweier unterschiedlicher Chargen bei 18 Probanden auf Molaren appliziert und jeweils eine Stunde vor und nach der Behandlung Speichelproben auf ihren Bisphenol-A-Gehalt untersucht haben. Die Versieglermasse betrug pro Proband 50 mg. Die Bisphenol-A-Konzentrationen im Speichel eine Stunde nach Fissurenversiegelung schwankten zwischen 3,3-30,0 µg/ml Speichel. Die Messung der Bisphenol-A-Konzentration in den Speichelproben der Probanden erfolgte mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) und anschließender massenspektrometrischer Detektion. Die östrogene Aktivität des Bisphenol A bestätigten die Autoren mit einem E-screen-Assay [71].

Der Versiegler Delton wurde auch von Fung et al. untersucht [31]. Es handelt sich um eine In-vivo-Studie, bei der 40 Probanden untersucht wurden. Es wurden hierbei zwei Gruppen unterschieden. Bei den Probanden der ersten Gruppe wurde nur ein Zahn mit 8 mg Versieglermasse behandelt, während in der zweiten Gruppe vier Zähne mit insgesamt 32 mg Materialien versiegelt wurden. Jeweils eine Stunde und drei Stunden nach der Behandlung mit dem Versiegler wurden den Probanden Speichel- und Blutproben entnommen. Ein Nachweis von Bisphenol A in den Speichelproben gelang eine Stunde und drei Stunden nach Applikation des Versieglers. Der Bisphenol-A-Gehalt im Speichel in der Gruppe mit 32 mg applizierter Versieglermasse wies eine deutlich höhere Konzentration auf im Vergleich zu der Probandengruppe mit 8 mg Versieglermasse. Die Quantifizierung und Messung des Bisphenol-A-Gehaltes in den Proben erfolgte mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) und anschließender Fluoreszenz- und UV-Detektion. In den Blutproben konnte jedoch kein Bisphenol A nachgewiesen werden.

Arenholt-Bindslev et al. untersuchten zwei verschiedene Fissurenversiegler (Delton und Visio-seal) auf ihre Bisphenol-A-Abgabe in vivo. Direkt, eine Stunde und 24 Stunden nach Applikation und Polymerisation des jeweiligen Versieglers wurden Speichelproben entnommen und der Bisphenol-A-Gehalt mit Hilfe einer Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) und anschließender Fluoreszenzdetektion quantifiziert. Zudem wurden die Proben einem E-screen-Assay unterzogen und auf ihre östrogene Aktivität untersucht. Die Autoren konnten Bisphenol A

2. Literaturübersicht

lediglich direkt nach Legen der Fissurenversiegelung und nur bei Delton nachweisen und dessen östrogene Aktivität im Assay bestätigen [6].

Joskow et al. untersuchten zwei Fissurenversiegler (Delton und Helioseal) auf ihre Bisphenol-A-Freisetzung. Die Versiegler wurden bei 14 Probanden appliziert und Speichelproben sowie Urinproben gewonnen. Die Entnahme der Proben erfolgte vor der Behandlung, direkt danach und jeweils eine Stunde und 24 Stunden nach Applikation des Versieglers. Jeder Proband wurde mit jeweils einem Versiegler, entweder Delton oder Helioseal, behandelt. Die Autoren wiesen mit Hilfe der Gaschromatographie und eines Massenspektrometers Bisphenol A in den Speichel- und Urinproben nach. Die höchste Bisphenol-A-Konzentration direkt nach der Legen der Füllung betrug 42,8 ng/ml Speichel für Delton und 0,54 ng/ml Speichel für Helioseal. Auch nach 24 Stunden ließ sich Bisphenol A in den Urinproben nachweisen. Die Bisphenol-A-Konzentration lag zwischen 0,6 ng/ml und 112,2 ng/ml. Die höchsten Konzentrationen wurden bei den Probanden mit dem Versiegler Delton gemessen [46].

Atkinson und Mitarbeiter führten eine In-vitro-Studie zum Nachweis von Bisphenol A durch, bei der der Schwerpunkt auf der Analytik lag, indem sie verschiedene Verfahren der Lagerung verglichen und unterschiedliche chromatographische Methoden anwendeten. Sie untersuchten die Proben mit Hilfe der Gas- und Hochleistungsflüssigkeitschromatographie. Der Migration gliederte sich dabei in zwei Gruppen. In der einen Gruppe wurden Standardlösungen Bisphenol A, Bis-DMA (Bisphenol-A-Dimethacrylat) und TEDGMA (Triethylenglycoldimethacrylat) mit einem Speichelmedium (Ruhespeichel von 10 verschiedenen Personen, die keine Kunststofffüllung besaßen) vermischt und für vier Monate bei -70 °C oder -20 °C gelagert. In einer zweiten Untersuchungsserie wurden die Proben für jeweils eine Stunde, zwei, vier und 24 Stunden bei 37 °C gelagert. Die Materialien, die bei Minusgraden gelagert wurden, zeigten keine nachweisbare Abgabe von Bisphenol A. Bei den Migrationsversuchen, die bei 37 °C stattfanden, konnte Bisphenol A nachgewiesen werden und es wurde ein Abbau von Bis-DMA (Bisphenol-A-Dimethacrylat) gemessen. Im Rahmen dieser Arbeit untersuchten die Autoren die Stabilität von Bisphenol A aus Bis-DMA. Sie schlussfolgerten aus ihren Versuchsergebnissen, dass Versiegler auf Bisphenol-A-Dimethacrylat Basis in Speichelmilieu zu Bisphenol A zersetzt werden, der Prozess jedoch temperaturabhängig ist [7].

Eine vergleichbare Untersuchung, bei der unterschiedliche Lagerungsmedien untersucht wurden, ist die Studie von Schmalz et al. aus dem Jahr 1999. Sie untersuchten den Versiegler Delton nach Inkubation der Proben mit Leberesterasen bei unterschiedlichen pH-Werten in einer Migrationslösung mit Ethanol und in einem natürlichen Speichelmedium (unstimulierter Speichel von 6 Probanden). Die Dauer der Inkubation bei unterschiedlichen pH-Werten betrug 30 Minuten bei 50 °C. Die Proben im natürlichen Speichel und im Medium mit Leberesterasen wurden

2. Literaturübersicht

für 24 Stunden gelagert. Die Quantifizierung erfolgte mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie und anschließender UV-Detektion. Bei Behandlung der Proben mit Leberesterasen erfolgte eine Konversion des Bis-DMA in Bisphenol A von 100 % und bei Lagerung der Proben bei einem pH-Wert von 11 wurde eine Konversionsrate von 82,5 % und im Speichel von 81,4 % gemessen. Sie schlussfolgerten aus ihren Ergebnissen, dass Versiegler auf Bisphenol-A-Dimethacrylat Basis in der Lage sind, Bisphenol A als Degradationsprodukt abzugeben. Die Konversion des Bisphenol-A-Dimethacrylat in Bisphenol A nimmt dabei mit steigendem pH-Wert zu. Aber auch die Anwesenheit von Speichelenzymen und Leberesterasen erhöht die Konversionsrate [84]. Atkinson et al. konnten die temperaturabhängige Degradation ebenfalls bestätigen [7].

Pulgar et al. untersuchten sieben Füllungskomposite und einen Versiegler (Delton) auf Bis-GMA-Basis. Eine Probengruppe wurde ohne vorherige Polymerisation und die andere nach Polymerisation bei 37 °C in Wasser mit verschiedenen pH-Werten gelagert und anschließend die Bisphenol-A-Konzentration im Wasser chromatographisch (Gaschromatographie und Massenspektrometer sowie Hochleistungsflüssigkeitschromatographie mit anschließender UV-Detektion) quantifiziert. Die Proben wurden 24 Stunden in Wasser mit unterschiedlichen pH-Werten gelagert. Die Bisphenol-A-Extraktion war bei hohen pH-Werten größer als bei geringeren. Sie konnten in allen Proben BPA nachweisen [76].

Nathanson et al. untersuchten sieben verschiedene Fissurenversiegler in vitro. Die polymerisierten Proben wurden für vier Minuten in 95%igem Ethanol gelagert. Die Bisphenol-A-Bestimmung im Ethanol erfolgte mit einem Hochleistungsflüssigkeitschromatographen und einem Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 215 nm. Die Bisphenol-A-Konzentration lag in diesen Versuchsreihen unterhalb der Nachweisgrenze [66]. Der Unterschied zu den oben genannten Studien liegt vor allem in der sehr kurzen Lagerungsdauer der Proben. Die Migration erfolgte z.B. bei Pulgar et al. bis zu 24 Stunden [76]. Schon nach einer 30-minütigen Lagerung der Proben in Ethanol gelang Schmalz et al. der Nachweis von Bisphenol A in den Extrakten [84]. Daraus ist zu schlussfolgern, dass die Migration vor allem zeitabhängig ist aber auch vom Lagerungsmedium beeinflusst wird.

Die unterschiedlichen Ergebnisse der einzelnen Studien werden kontrovers diskutiert. Bei In-vivo-Versuchen muss die Frage gestellt werden, wie hoch die allgemeine Belastung der Probanden mit Bisphenol A war. Die zusätzliche Belastung durch alltägliche Gebrauchsgegenstände, wie zum Beispiel Plastikflaschen oder Mikrowellengeschirr, muss ebenfalls in die Berechnung einbezogen werden [15-17,19,20,34,52,59]. Auch bei geringer Abgabe an BPA kann eine Gesundheitsgefährdung nicht ausgeschlossen werden, weil Bisphenol A als endokrin wirksame Substanz nicht den klassischen Regeln der Toxikologie folgt, das heißt, dass die Gesundheits-

2. Literaturübersicht

gefährdung nicht von der Menge abhängig ist, sondern auch geringste Menge Schäden hervorrufen können.

Außerdem ist es schwierig, den systemischen Abbau zwischen den Studien von Joskow et al. [46] sowie Fung und Mitarbeiter [31] zu vergleichen. Fung et al. schreiben, dass trotz nachgewiesenem Bisphenol A im Speichel kein systemischer Nachweis im Blut möglich war. Die Probanden waren jedoch zwischen 20 und 55 Jahre alt. Diese Altersgruppe ist nicht besonders repräsentativ für die Testung von Fissurenversiegeln, da die prophylaktische Versiegelung im Kindesalter stattfindet. Außerdem ist zu bedenken, dass Kinder bestimmte Enzyme, wie zum Beispiel das Enzym UDP-Glucuronosyltransferase, nicht ausgebildet haben, wodurch der systemische Abbau im Vergleich zu Erwachsenen unterschiedlich abläuft [20,104]. Joskow et al. wiederum gelang der Nachweis von BPA im Urin, womit der systemische Nachweis an BPA dargelegt ist.

Die Literaturdaten zeigen eine Abhängigkeit der gemessenen Bisphenol-A-Konzentrationen vom Lagerungsmedium (Speichel, Leberenzyme, Alkohol, pH-Wert, Temperatur und Lagerungsdauer). Die Ursache der unterschiedlichen Werte ist auch in den verschiedenen Nachweismethoden zu suchen.

2.7 Bis-GMA-Ersatz

Die Ivoclar Vivadent AG hat ein neues Komposit, das TMXDI entwickelt, das kein Bisphenol A freisetzen soll. Um eine östrogene Wirkung zu vermeiden, wurde Bis-GMA gegen ein aromatisches Urethan-Dimethacrylat, das TMX-UDMA, ausgetauscht. Wie aus Abbildung 4 deutlich wird, ist TMX-UDMA ein Reaktionsprodukt aus TMXDI mit einer OH-Gruppe der Methacrylate HEMA und HPMA.

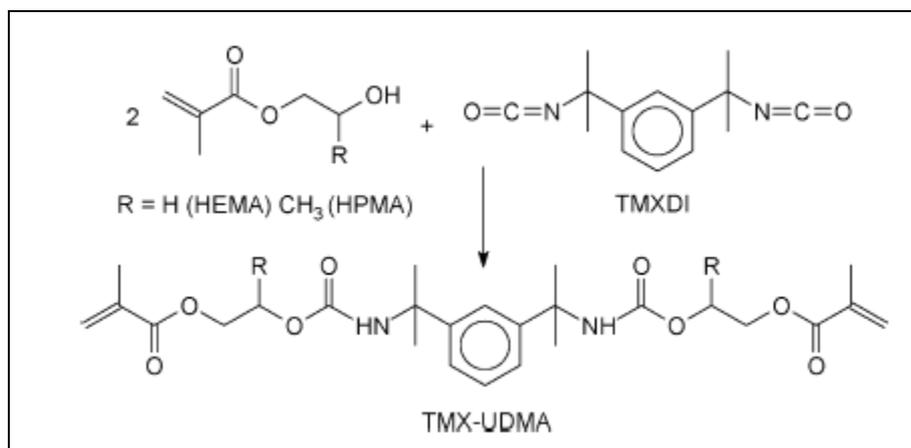


Abbildung 4: Struktur des TMX-UDMA (in Anlehnung an [64])

2. Literaturübersicht

Die beiden Methacrylate wurden kombiniert, da aus HEMA allein ein kristallines Dimethacrylat resultiert. Diese Eigenschaft ist unerwünscht, da ein solches Produkt in Anwesenheit von Füllpartikeln oder während der Lagerung im Kühlschrank kristalline Struktur ausbilden kann. Bei TMXDI soll das Entstehen des Degradationsproduktes Bisphenol A ausgeschlossen sein. In einer In-vitro-Studie zeigten Moszner et al., dass die Materialeigenschaften denen der Bis-GMA-Komposite gleichen [64].

2.8 Zusammenfassung des gegenwärtigen Kenntnisstandes zu BPA

Die gesundheitsgefährdende Wirkung von Bisphenol A ist durch viele klinische Studien an Tieren bestätigt.

In der Literatur werden sehr viele Erkrankungen, die in der nachfolgenden Tabelle 2 zusammengetragen sind, mit einer BPA-Exposition in Zusammenhang gebracht.

Tabelle 2: Wirkung von Bisphenol A

Wirkung von BPA	Erkrankung
Agonistische Wirkung zu einem unphysiologischen Zeitpunkt	<ul style="list-style-type: none">• Verfrühte Geschlechtsreife [20]
Blockade der Östrogenrezeptoren	<ul style="list-style-type: none">• Abnahme der Spermienzahl [37,70]• Fehlbildung der Sexualorgane [70]• Zunahme von Prostata- bzw. Mammakarzinomen [20]• Diabetes Typ II [2,4,5,50]• Herz-Kreislauf-Erkrankungen [50]
Schädigung des Hippocampus	<ul style="list-style-type: none">• Geistige Retardierung [75]
Änderung des Hormonhaushaltes	<ul style="list-style-type: none">• Verminderte Spermatogenese [70]
Modulation sensorischer Nervenzellen des Darmepithels	<ul style="list-style-type: none">• Flatulenz [14]• Obstipation [14]• Diarrhoe [14]• Krampfartige Magenschmerzen [14]

Die Summation der Belastungen durch Bisphenol A aus alltäglichen Gebrauchsgegenständen und zahnärztlichen Werkstoffen müssen ganzheitlich betrachtet werden. Die Versuchstiere zeigten zum Teil mit geringen Mengen von 10-100 µg/kg Körpergewicht/Tag Bisphenol A nachweisbare Reaktionen [5,63,75]. Auch wenn bei Menschen kein sofortiger Effekt wie bei den

2. Literaturübersicht

Versuchstieren zu erkennen ist, sollte eine langfristige Schädigung in Betracht gezogen werden. Als Dauerschäden sind vor allem genetische Defekte zu erwähnen [89].

Angesichts der fehlenden Grenzwerte und Hinweise auf mögliche gesundheitliche Risiken durch Bisphenol A sollte eine Bisphenol-A-Belastung so gering wie möglich gehalten werden, indem die Freisetzung auch aus Fissurenversiegelungsmaterialien untersucht und nach Alternativen gesucht wird.

2.9 Zielsetzung und Arbeitshypothesen

Vor dem Hintergrund der aufgezeigten wissenschaftlichen Untersuchungen und der Bedeutung der Thematik für die Zahnmedizin ist es Ziel der vorliegenden Arbeit, in vitro die Bisphenol-A-Freisetzung aus unterschiedlichen, aktuell auf dem Markt befindlichen dentalen Versiegelungsmaterialien zu bestimmen. Die Untersuchungen beschränken sich auf Fissurenversiegelungsmaterialien, da bei diesen aufgrund des geringen Füllstoffgehaltes höhere Abgabemengen an Bisphenol A zu erwarten sind. Die freigesetzten Bisphenol-A-Mengen sollen aus toxikologischer Sicht bewertet werden. Der Bisphenol-A-Gehalt der Proben soll mit der täglich tolerierbaren Menge des potentiell toxischen Bisphenol A verglichen und daraus resultierend eine Einschätzung zur schädigenden Wirkung formuliert werden.

Es ist zu erwarten, dass Bis-GMA enthaltende Komposite Bisphenol A freisetzen, welches im Organismus endogene Effekte verursachen kann. Aus einem Bis-GMA-freien Versiegelungsmaterial, wie das TMXDI-Dimethacrylat, ist keine Freisetzung von Bisphenol A zu erwarten. Aus der Positivkontrolle (Bis-GMA) wird die Quantifizierung von Bisphenol A im Migrat möglich sein.

Nach einer 24-stündigen Lagerung und Rüttelung der Proben in Wasser wird Bisphenol A in das Lagerungsmedium migrieren. Findet eine Migration von Bisphenol A statt, kann dieses aus dem Migrationsmedium extrahiert und im Rahmen chromatographischer Messverfahren quantifiziert werden.

3 Materialien und Methoden

In diesem Kapitel werden alle Materialien, Geräte und Chemikalien vorgestellt, die zur Testung des Bisphenol-A-Gehaltes aus Wasser notwendig sind.

3.1 Materialien

In den folgenden Tabellen 3 und 4 sind die bei der Versuchsdurchführung zum Einsatz kommenden Materialien und Geräte aufgelistet.

Tabelle 3: Materialien, Geräte und Chemikalien

Materialien und Glasgeräte (mit Volumenangabe)	Hersteller
60 ml Probengefäße und Deckel mit PTFE Septum	Machery-Nagel
250 µl Mikroliterspritze	Hamilton
5 ml, 10 ml und 50 ml Messkolben	Schott
20 ml Vollpipette	Schott
Glasfaser-Spritzenfilter, 1-2 µm 30 mm Ø	neoLAB
20 ml Einmalspritze, Luer-Look	HENKE SASS WOLF
60 ml Reagenzglas mit angesetzter Spitze von 1 ml	Burdich
5 ml Kipp-Pipette, NS 29/32	Burdich
Zentrifugengläser mit konischer Spitze, 12 ml	Schott
50 µl, 100 µl und 200 µl Mikro-Einmalpipetten, Ring-caps	Hirschmann
Mikroliterpipette	Hirschmann
20 ml EPA Schraubgefäße	Hirschmann
1,6 ml Messvial, N11	Machery-Nagel
Deckel mit Septen, N11	Machery-Nagel
300 µl Mikro-Glasinsert	Machery-Nagel

3. Materialien und Methoden

Tabelle 4: Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
entionisiertes Wasser Milli Q, 18,2 MΩ*cm abgefüllt am 18.10.10	
Dichlormethan, Picograde	Promochem
Methanol, HPLC Gradient Grade	VWR
Acetonitril, HPLC Gradient Grade	VWR
Lösemittelgemische und Lösungen Wasser/Methanol 55%/45% (v/v)	

Tabelle 5: Prüfgeräte und Hilfsmittel

Prüfgeräte	Hersteller
Analysenwaage R180D	Sartorius
Wasseraufbereitungsanlage für analytische Zwecke	MilliPore
HPLC-DAD/FLD	Dionex
HPLC-MS/MS	Agilent/Applied Biosystems
Schüttelmaschine HS 501	IKA
Reagenzglasschüttler Lab Dancer	IKA
Stickstoffverteiler zur Aufkonzentration, 6-fach	SUPELCO
Magnetrührer mit Heizfunktion und Kontaktthermometer	IKA
LED-Light Valo (Polymerisationslampe)	Ultradent

3. Materialien und Methoden

3.1.1 Verwendete Fissurenversiegler

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Fissurenversiegler auf die Abgabe von Bisphenol A hin untersucht. Aus Tabelle 6 sind die untersuchten Versiegler zu entnehmen.

Tabelle 6: Verwendete Fissurenversiegler

Fissurenversiegler	Hersteller
Fissurit F (Lot-Nummer: 1024418)	VOCO GmbH
Delton FS (Lot-Nummer: 1005261)	Dentsply DeTrey GmbH

3.1.2 Positiv- und Negativkontrolle

Als Positiv-Kontrolle diente ein Bis-GMA-basiertes Material und als Negativ-Kontrolle ein Bis-GMA-freies Produkt, das TMXDI-Dimethacrylat. Beide Materialien wurden direkt von Ivoclar Vivadent bezogen. Die Materialien sind der Tabelle 7 zu entnehmen.

Tabelle 7: Positiv- und Negativkontrolle

Versiegler	Hersteller
Bis-GMA (Lot-Nummer: BF2428-4)	Ivoclar Vivadent
TMXDI-Dimethacrylat (Lot-Nummer: BF2428-3)	Ivoclar Vivadent

3.1.3 Referenzsubstanzen

Aus Tabelle 8 können die Daten der Referenzsubstanzen entnommen werden.

Tabelle 8: Hersteller, Artikelnummer und Angaben zur Reinheit der Referenzsubstanzen

Analyt	Hersteller	Artikelnummer	Reinheit [%]
BPA - Kalibrierung	Dr. Ehrenstorfer	10655500	99,5 ± 0,5
BPA - Kontrollstandard	SIGMA-ALDRICH	239658-50g	≥ 99
BPA A d16 interner STD	CDN ISOTOPES	D-2151	98 (deut.)

3.1.4 Stamm- und Standardlösungen für die HPLC-DAD/FLD

Durch Zugabe von 10 mg der Referenzsubstanz in einen Messkolben mit 10 ml Methanol wurde eine Stammlösung von 1,27 mg/g Methanol für die Kalibrierung und 1,25 mg/g Methanol (0,98

3. Materialien und Methoden

mg/ml) für den Kontrollstandard hergestellt. Zur Zwischenverdünnung wurde in einem 50 ml Messkolben mit Methanol 100 µl Stammlösungen hinzugeben. Somit wurde durch eine 1:500 Verdünnung eine Standardlösung von 2,48 µg/g Methanol (1,96 µg/ml) für die Kalibrierung und 2,40 µg/g Methanol (1,89 µg/ml) für den Kontrollstandard hergestellt (Abbildung 5).

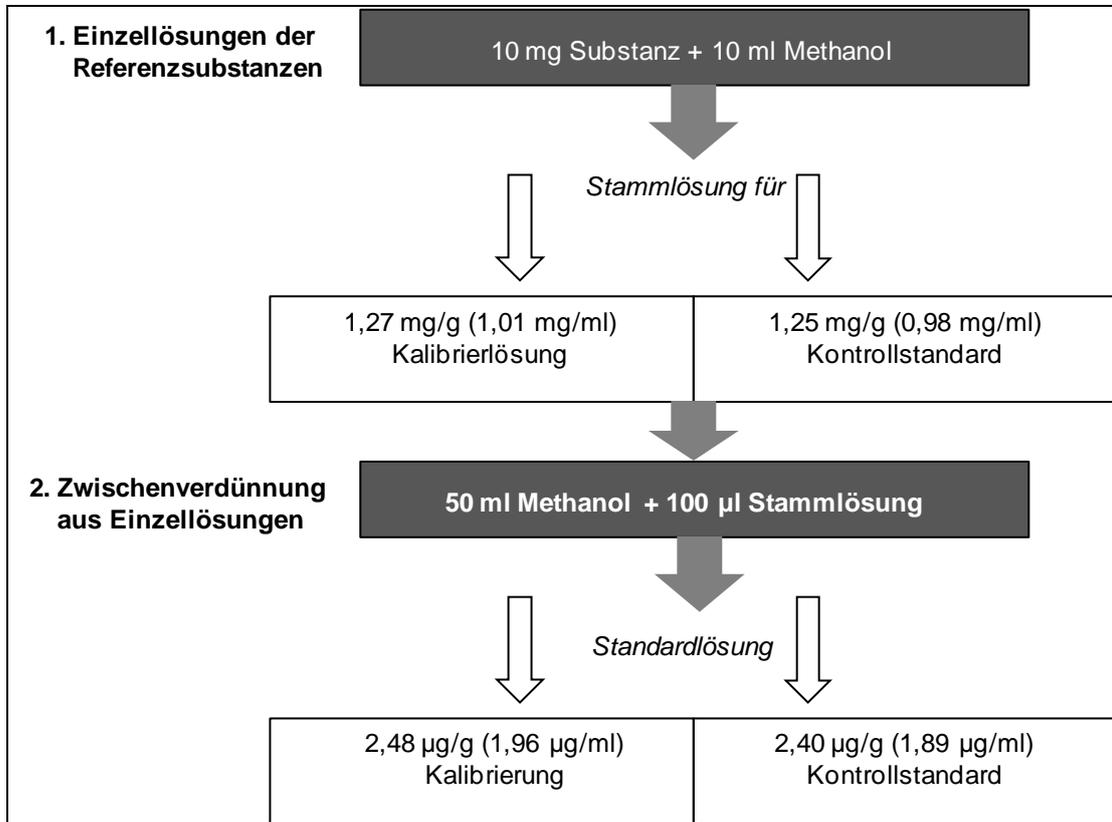


Abbildung 5: Stamm- und Standardlösung für HPLC-DAD/FLD

Im weiteren Verlauf wurde wie aus Tabelle 9 ersichtlich eine Verdünnungsreihe von 6 Bezugslösungen in 5 ml Messkolben im Eluentengemisch hergestellt.

3. Materialien und Methoden

Tabelle 9: Konzentrationen für die Kalibrierlösungen (Verdünnungsreihe)

Kalibrierlevel	Volumen in μl	BPA [ng /g]*	BPA [ng/ml]*
KAL1	50	20,8	18,4
KAL2	150	61,3	54,1
KAL3	250	100,7	88,9
KAL4	350	142,3	125,6
KAL5	450	181,3	160,0
KAL6	550	225,5	199,1

* ng BPA pro g Lösemittel bzw. pro ml Lösemittel

Durch eine 1:20 Verdünnung wurde aus der Zwischenverdünnung von 500 μl in einem Messkolben mit Wasser eine Standardlösung von 89,1 ng/g (89,1 ng/ml) als unabhängiger Kontrollstandard von der Kalibrierlösung hergestellt.

3.1.5 Stamm- und Standardlösungen für die HPLC-MS/MS

Aus deuteriertem Bisphenol A (BPA d16) mit 1,31 mg/g Methanol (1,03 mg/ml) wurde eine Standardlösung als Stammlösung zur Verdünnung hergestellt, die im Folgenden als interner Standard diente. Der Ansatz dieser Stammlösung erfolgte am 20.08.2010 durch Einwaage von 10 mg Substanz in einem 10 ml Kolben und wurde in 10 ml Feingewindeflaschen für die Headspaceanalytik aufbewahrt. Die Zwischenverdünnung dieser Lösung erfolgte durch eine 1:100 Verdünnung von 100 μl Stammlösung in einen 10 ml Messkolben. Durch diese Verdünnung entstand eine Standardlösung von 12,5 $\mu\text{g/g}$ Methanol (9,9 $\mu\text{g/ml}$). Die Zwischenverdünnung des internen Standards wurde durch Zugabe von 100 μl Stammlösung hergestellt. Durch die Zwischenverdünnung entstandene Standardlösung von 119 ng/g Methanol (94,4 ng/ml) diente als Dotierlösung des internen Standards (siehe Abbildung 6).

3. Materialien und Methoden

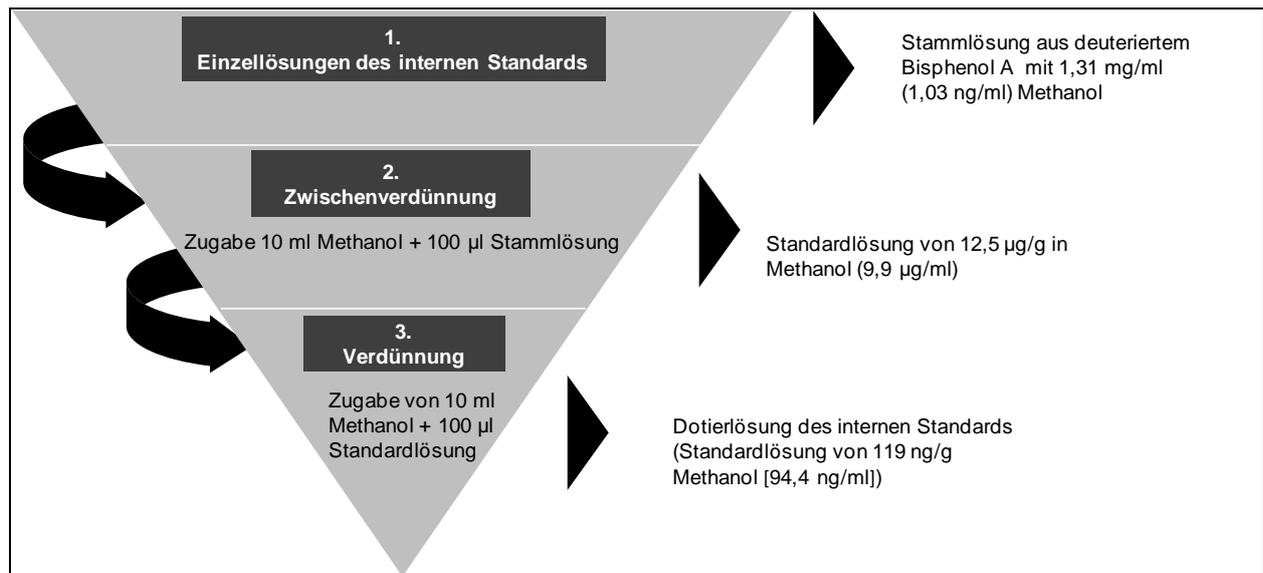


Abbildung 6: Stamm- und Standardlösung für HPLC-MS/MS

Durch Zugabe des internen Standards zu den Kalibrierlösungen von Bisphenol A wurde die Kalibrierung für die HPLC-MS/MS hergestellt. Dazu wurden jeweils 100 µl der Dotierlösung des internen Standards und 100 µl der Bezugslösungen von Bisphenol A in einem 300 µl Mikroinsert im 1,6 ml Messvial (Glas-in-Glas-Gefäß) zusammengefügt. Diese Lösungen wurden anschließend in einem Reagenzglasschüttler durchmischt. Die ursprünglichen Lösungen wurden 1:2 verdünnt.

Tabelle 10: BPA-Konzentrationen der Kalibrierlösungen für die HPLC-MS/MS Messung

Kalibrierlevel	BPA [ng/g]	BPA [ng/ml]	BPA d16 [ng/g]	BPA d16 [ng/ml]
KAL1	11,0	10,4	56,3	53,4
KAL2	32,1	30,4	56,7	53,7
KAL3	53,6	50,8	55,7	52,8
KAL4	75,9	71,9	55,5	52,6
KAL5	96,7	91,7	55,5	52,6
KAL6	116,3	110,3	57,6	54,6

Die Konzentration der Standardlösung in Methanol betrug nach Zusammenfügen des internen Standards und des Kontrollstandards des Bisphenol A 50,9 ng/g (48,2 ng/ml) von Bisphenol A und 51,0 ng/g (45,0 ng/ml) von BPA d16.

3.2 Versuchsdurchführung

Der Gehalt von Bisphenol A aus den Fissurenversiegelungsmaterialien wurde in Anlehnung an die Europäische Norm EN 14372:2004 (E) „Child use and care articles – Cutlery and feeding utensils – Safety requirements and tests“ zur Bestimmung von Bisphenol A in Nahrungsmittelbehältnissen untersucht.

Der Bisphenol-A-Gehalt wurde aus wässrigen Lösungen überprüft. Im Rahmen der Probenprüfung wurde neben Blindwertproben auch die Migration und Aufbereitung der Testsubstanz (Masse 1,62 g) aus dem Versiegler für die Positiv-Kontrolle (auf Bis-GMA-Basis) durchgeführt. Diese Testsubstanz wurde am 04.10.2010 an der BAM hergestellt und diente zur Bestimmung der notwendigen Menge an Versieglersubstanz für die Migration. Die Versieglermasse wurde dazu aus dem Gefäß mit einem Heidemannspatel entnommen und die undefinierte Menge mit einer UV-Lampe polymerisiert. Die Form des Probenkörpers glich nach der Polymerisation einer flachen Scheibe. Die Masse wurde später durch Wiegen des Probenkörpers bestimmt. Als Migrationslösung diente dabei Milli-Q Wasser (doppelt entionisiertes Wasser).

Die Abgabe von Bisphenol A wurde in zwei verschiedenen Fissurenversiegelungsmaterialien (Delton FS⁺ und Fissurit F) untersucht. Als Positiv-Kontrolle diente das Bis-GMA und als Negativ-Kontrolle das Bis-GMA freie Material, das TMXDI-Dimethacrylat; beide Materialien wurden direkt von Ivoclar Vivadent bezogen. Die Versieglermassen wurden in einen Glasring mit einem Durchmesser von ca. 8 mm Durchmesser und 3 mm Höhe appliziert und von beiden Seiten (oben/unten) für 40 Sekunden mit einem Polymerisationsgerät (LED Light-Valo, Ultradent) ausgehärtet. Um ein Kleben der Versieglermassen an der Wand des Glasringes zu verhindern wurden die Innenflächen mit einer Metallmatrize ausgekleidet. Die Probenkörper wurden mit leichtem Druck entfernt und direkt in die Glasbehälter appliziert. Die Matrizen wurden mit einer Pinzette von den Probenkörpern entfernt. Für jedes Material wurden 21 Formkörper hergestellt, die in drei Probenserien unterteilt wurden (n=7). Für jedes Material wurden jeweils drei Messungen durchgeführt. Der Ablauf der Probenprüfung ist in Abbildung 7 schematisch dargestellt.

3. Materialien und Methoden

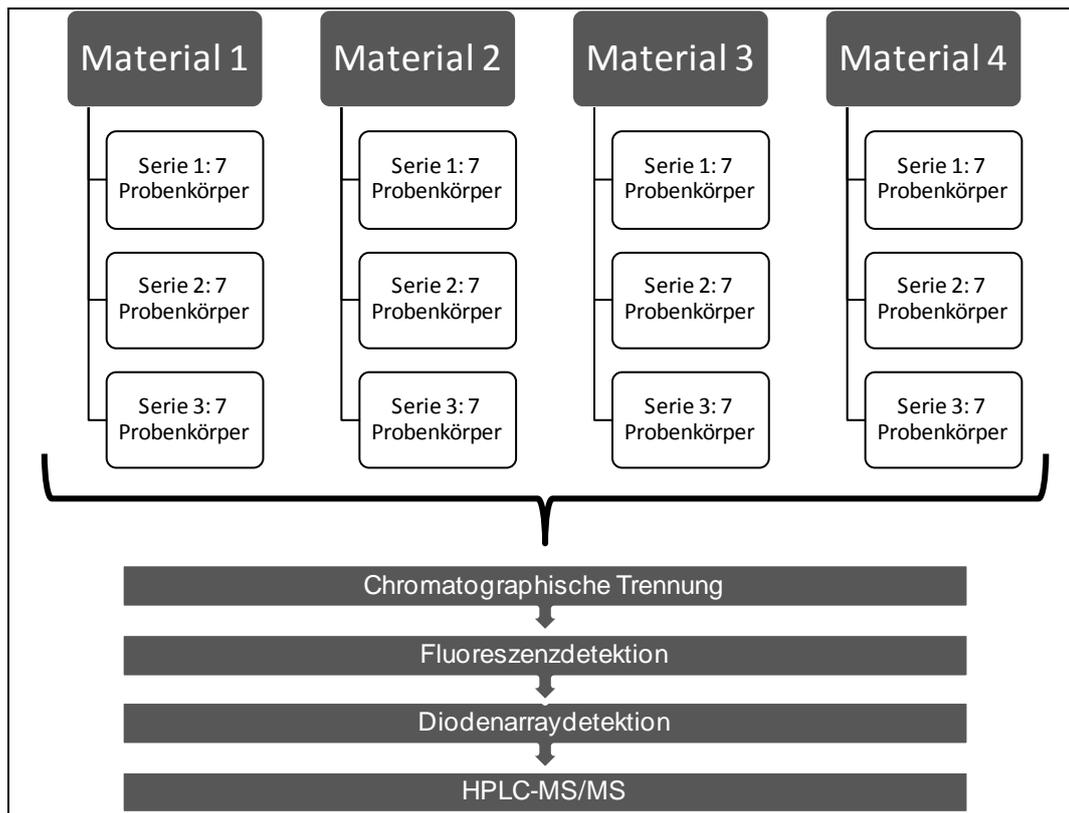


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Versuchsdurchführung

Den Glasbehältern wurden zur Herstellung der Migrate 20 ml doppelt entionisiertes Wasser zugefügt und für 24 Stunden bei Raumtemperatur in einem Horizontalschüttler in Bewegung gehalten. Die Quantifizierung der Migrate erfolgte mit Hilfe der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC). Die Migrate wurden vorher bis zu einer Größe von 1-2 μm filtriert und anschließend mit Hilfe einer Extraktion (detaillierte Angaben zur Extraktion und Aufkonzentrierung im Methodenteil) eine aufkonzentrierte Lösung mit einer Anreicherung um den Faktor ca. 30 hergestellt. Nach chromatographischer Trennung konnten die Analyten mit Hilfe eines Fluoreszenzdetektors (FLD) und als zusätzliches diagnostisches Hilfsmittel mit dem Diodenarraydetektor (DAD) detektiert werden.

Die zweite unabhängige Messung erfolgte mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie mit anschließender Detektion mit dem Massenspektrometer (HPLC-MS/MS). Die Messung konnte dabei bei höherer Trennleistung und anderer Selektivität der stationären Phase im Vergleich zur HPLC-DAD/FLD erfolgen. Die Messung des Bisphenol-A-Gehaltes erfolgte im MS/MS-Modus des Massenspektrometers.

3. Materialien und Methoden

Tabelle 11: Übersicht über die Probenserien mit Angaben der Daten der verschiedenen Untersuchungsschritte

Probencode	Erläuterung	Migration	Extraktion	Messung
GMA101018_01	Blindwert Migration	18.10.2010	19.10.2010	20.10.2010
GMA101018_02	Blindwert Migration	18.10.2010	19.10.2010	20.10.2010
GMA101018_03	Versieglermasse	18.10.2010	19.10.2010	20.10.2010
GMA101018_04	Blindwert Migration	18.10.2010	19.10.2010	20.10.2010
GMA101019_01	Dotierung mit BPA-Wiederfindung	18.10.2010	19.10.2010	20.10.2010
GMA101019_02	Dotierung mit BPA-Wiederfindung	18.10.2010	19.10.2010	20.10.2010
GMA101019_03	Dotierung mit BPA-Wiederfindung	18.10.2010	19.10.2010	20.10.2010
GMA101019_04	Dotierung mit BPA-Wiederfindung	18.10.2010	19.10.2010	20.10.2010
GMA101019_05	Dotierung mit BPA-Wiederfindung	18.10.2010	19.10.2010	20.10.2010
GMA101019_06	Blindwert Probenvorbereitung	18.10.2010	19.10.2010	20.10.2010
GMA101020_01	1. Serie Fissurit F	20.10.2010	21.10.2010	21.10.2010
GMA101020_02	2. Serie Fissurit F	20.10.2010	21.10.2010	21.10.2010
GMA101020_03	3. Serie Fissurit F	20.10.2010	21.10.2010	21.10.2010
GMA101020_04	1. Serie Delton FS ⁺	20.10.2010	21.10.2010	21.10.2010
GMA101020_05	2. Serie Delton FS ⁺	20.10.2010	21.10.2010	21.10.2010
GMA101020_06	3. Serie Delton FS ⁺	20.10.2010	21.10.2010	21.10.2010
GMA101020_07	1. Serie Bis-GMA	20.10.2010	21.10.2010	21.10.2010
GMA101020_08	2. Serie Bis-GMA	20.10.2010	21.10.2010	21.10.2010
GMA101020_09	3. Serie Bis-GMA	20.10.2010	21.10.2010	21.10.2010
GMA101020_10	1. Serie TMXDI-Dimethacrylat	20.10.2010	21.10.2010	21.10.2010
GMA101020_11	2. Serie TMXDI-Dimethacrylat	20.10.2010	21.10.2010	21.10.2010
GMA101020_12	3. Serie TMXDI-Dimethacrylat	20.10.2010	21.10.2010	21.10.2010
GMA101020_13	Blindwert Herstellung Probenkörper	20.10.2010	21.10.2010	21.10.2010
GMA101020_14	Dotierung mit Wiederfindung	20.10.2010	21.10.2010	21.10.2010
GMA101020_15	Blindwert Probenvorbereitung	20.10.2010	21.10.2010	21.10.2010
GMA101118_01	Dotierung von BPA	Dotierlösung	18.11.2010	18.11.2010
GMA101118_02	Dotierung von BPA	Dotierlösung	18.11.2010	18.11.2010
GMA101118_03	Dotierung von BPA	Dotierlösung	18.11.2010	18.11.2010
GMA101118_04	Dotierung von BPA	Dotierlösung	18.11.2010	18.11.2010
GMA101118_05	Dotierung mit BPA Wiederfindung	Dotierlösung	18.10.2010	18.11.2010
GMA101118_06	Blindwert von Dotierung	Dotierlösung	18.10.2010	18.11.2010

Die Bezeichnungen beginnend mit GMA beziehen sich auf die Probencodes und nicht auf die Materialnamen.

3.3 Methoden

Die Probenvorbereitung gliederte sich wie folgt:

- Migration
- Filtration des Migrats
- Extraktion
- Aufkonzentrierung
- Addition von Standardlösungen zu Probeextrakten
- Herstellung der Messlösung für HPLC-MS/MS

Nach Bestimmung der Prüfkörpermassen der jeweiligen Probenserien, deren Gewicht zwischen 1,5 und 3 g lag, wurden 20 ml Wasser mit einer Vollpipette dazugegeben und die Probengefäße in einem Horizontalschüttler wie Abbildung 8 ersichtlich eingespannt. In jedem Glasvial befanden sich jeweils 7 Probenkörper.



Abbildung 8: Horizontalschüttler mit eingespannten Probengefäßen

Die Proben wurden 24 Stunden bei einer Frequenz von 250 U/min (Umdrehungsfrequenz pro Minute) bei Raumtemperatur gerüttelt. Nach 24 Stunden mussten die Migrante aus der Probenlösung aufgrund der starken Pellikellast, die nach der Rüttelung der Proben entstanden war, über einen Glasfaser-Spritzenfilter filtriert werden, da in der ersten Messung des Testkörpers der Positiv-Kontrolle (1,62 g) im Chromatogramm Überlagerungen durch verschiedene Be-

3. Materialien und Methoden

standteile manifest waren. Um diese Überlagerungen durch die Pellikellast für alle weiteren Messungen ausschließen zu können, wurden die Probenlösungen direkt in 60 ml Reagenzgläser bis zur 15 ml Markierung filtriert. Anschließend wurde durch eine Differenzwägung eine exakte Probenmenge ermittelt. Zu den Probenlösungen wurden mit Hilfe einer Kipppipette 5 ml Dichlormethan appliziert. Auf einem Reagenzschüttler erfolgte nach Rüttelung der Proben für 5 Sekunden die Flüssig-Flüssig-Extraktion. Die erste Extraktion zeigte eine Emulsionsbildung (organische Phase), wie in Abbildung 9 zu erkennen ist.

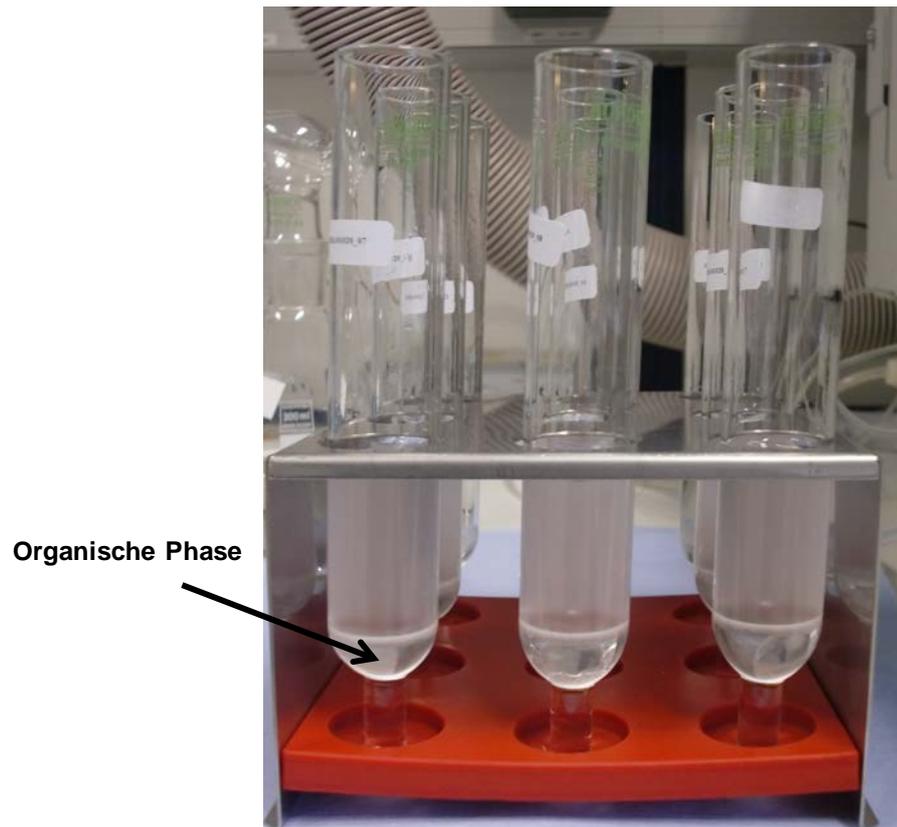


Abbildung 9: Extraktion der Proben

Die untere organische Phase, in der sich die Extrakte befinden, wurde mit einer Pasteurpipette abgenommen und in ein 12 ml Zentrifugenglas überführt. Anschließend erfolgte eine zweite Extraktion. Zur Aufkonzentrierung wurden die Zentrifugengläser in 20 ml EPA Gefäße - mit Wasser gefüllt - aufgestellt. Die Einengung erfolgte dabei mit Stickstoff bei einer Wassertemperatur von 40 °C bis zur Trockne. In Abbildung 10 sind die Probengefäße für die Einengung mit Stickstoff zu erkennen.

3. Materialien und Methoden

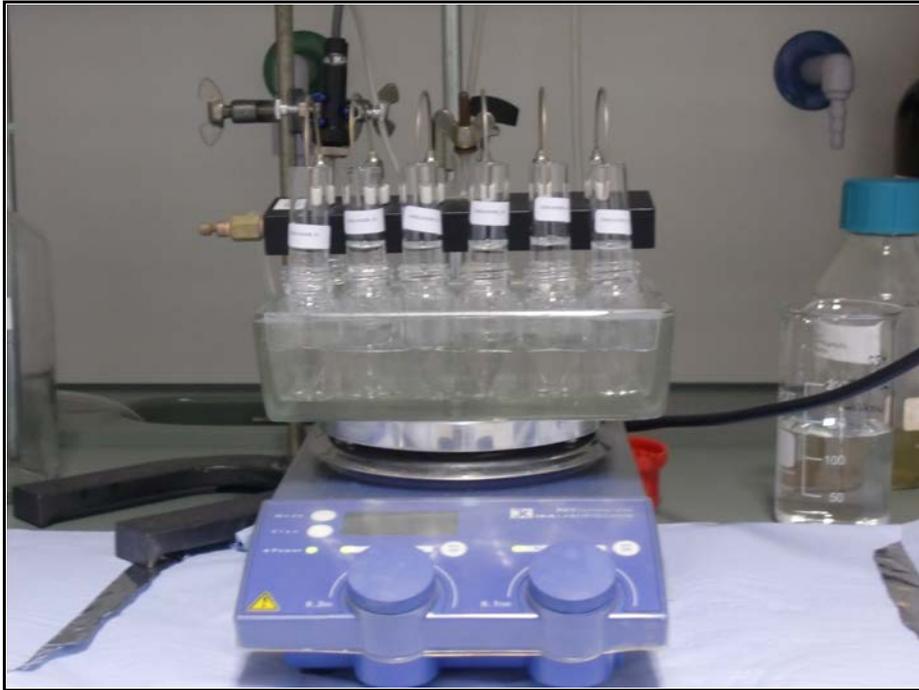


Abbildung 10: Vorbereitete Proben für die Einengung mit Stickstoff

Nach dem Vorgang der Aufkonzentration wurden den Probenextrakten 500 μl des Eluenten (Fließmittel für HPLC-Messungen) hinzugegeben und der Rückstand wurde auf dem Reagenzschüttler in Lösung gebracht. Die Probenlösung wurde in zwei Messvials mit Mikroinserts für die Messung im Hochleistungschromatographen aufgeteilt.

Zu den Probenextrakten wurden 100 μl der Bezugslösung KAL 6 in ein 300 μl Mikroinsert im 1,6 ml Messvial zugegeben und ebenfalls auf die Trockne eingeengt. Anschließend wurden jeweils 200 μl des Probenextraktes der Versieglermassen hinzugegeben (Addition von Standardlösung) und miteinander vermischt. Die Berechnung erfolgte gravimetrisch.

Zur Herstellung der Messlösung für die HPLC-MS/MS Messung wurden 100 μl des internen Standards zu den Probenextrakten der Probenserie hinzugegeben. Dabei wurden 100 μl der Dotierlösung des internen Standards mit 100 μl des Probenextraktes in einem 300 μl Mikroinsert im 1,6 ml Messvial miteinander vermischt. Die Verdünnung betrug somit 1:2 und die Konzentration in der Messlösung ca. 55 ng/g (53 ng/ml) von BPA d16.

3. Materialien und Methoden

3.3.1 HPLC-DAD/FLD

In der folgenden Tabelle 12 sind die Bedingungen für die HPLC-Messung dargestellt.

Tabelle 12: Einstellungen der HPLC-Messung

Parameter	Einstellung
Trennsäule	Ultrasep ES 125 mm x 3 mm, 4 µm (SEPSERV)
Vorsäule	Ultrasep ES 10 mm x 3 mm, 4 µm (SEPSERV)
Analysezeit von 15 min	Mobile Phase: Wasser/Methanol 55%/45% (v/v)
Flussrate	0,4 ml/min
Ofentemperatur	25 °C
Injektionsvolumen	100 µl

3.3.1.1 Diodenarraydetektor

Mit dem Diodenarraydetektor (DAD) wurden zwei unterschiedliche Wellenlängenkanäle aufgenommen. Die Auswertung bei Kanal UV_VIS_1 erfolgte bei der Wellenlänge 230 nm, die das UV-Maximum darstellt. Die zweite Detektion erfolgte bei 280 nm und diente zur Plausibilitätskontrolle.

Tabelle 13: Parameter der Detektionskanäle des Diodenarraydetektors

Parameter	Einstellungen UV_VIS_1	Einstellungen UV_VIS_2
Wellenlänge	230 nm	280 nm
Bandbreite	6 nm	6 nm
Referenz Wellenlänge	Aus	Aus
Referenz Bandbreite	Aus	Aus
Average	An	An
Step (Datenrate)	0,10	0,10 Step

3. Materialien und Methoden

Zur Absicherung der Richtigkeit der Identifizierung der Analyten wurden während der Messungen Spektren aufgenommen. Die gewählten Einstellungen sind in Tabelle 14 zusammengefasst.

Tabelle 14: Spektrumaufnahme des Diodenaarraydetektors

Parameter	Einstellung
Wellenlängenbereich	200-356 nm
BunchWidth	2 nm
Referenz BunchWidth	2 nm
Step	0,5 nm

3.3.1.2 Fluoreszenzdetektor

Bisphenol A wurde mit der Wellenlängenschaltung aus EN14372 detektiert. Die darin festgelegten Einstellungen sind der Tabelle 15 zu entnehmen.

Tabelle 15: Detektionskanal des Fluoreszenzdetektors

Parameter	Einstellung
Extinktionswellenlänge	275 nm
Emmisionswellenlänge	313 nm
Gain	1
Step (Datenrate)	1,5
Average	On
Sensitivity	Low

3. Materialien und Methoden

3.3.2 HPLC-MS/MS

3.3.2.1 Chromatographische Einstellung

Aus Tabelle 16 sind die Einstellungen für die HPLC-Messungen zu entnehmen. Die Tabelle ist untergliedert in allgemeine Parametereinstellungen und Temperaturbedingungen für die Messungen. Die Einstellungen der chromatographischen Parameter wurden für alle Messungen übernommen.

Tabelle 16: Bedingungen der HPLC

Parameter	Einstellungen	
Trennsäule	ZORBAX SB Aq 100 mm x 2 mm und 1,8 µm	
Vorsäule	keine	
Gradient	% Wasser (a)	% Acetonitril (b)
Flussrate	0,3 ml/min	
Säulentemperatur	30 °C	
Injektionsvolumen	10 µl	
0.00 min	90 (a)	10 (b)
0.00-10 min	von 90 auf 10 (a)	von 10 auf 90 (b)
10.00-12.00 min	10 (a)	90 (b)
12.00-12.01 min (Beginn der Äquilibration)	90 (a)	10 (b)
12.01-15.00 min	90 (a)	10 (a)

3.3.2.2 Massenspektrometrische Einstellungen

Die Aufnahme der Chromatogramme erfolgte durch Messung im MRM (Multiple Reaction Monitoring)-Modus. Dabei wurden zwei Massenübergänge aufgenommen, der erste diente zur Quantifizierung und der zweite zur Absicherung der richtigen Identifizierung der Analyten (Qualifizier). Für den internen Standard wurde ein Massenübergang detektiert. Die drei Massenübergänge wurden bei einer „dwell“-Zeit von jeweils 100 ms detektiert.

Das Ermitteln der Einstellung der Massenübergänge und Spannungen zur Detektion von BPA erfolgte über eine Infusion der Standardlösung von Bisphenol A.

3. Materialien und Methoden

Tabelle 17: Einstellungen der Ionenquelle

Parameter	Einstellungen
Ion Source	Turbo Spray (ESI-Source)
Position:	V: 4 mm; H: 4 mm
Curtain Gas (CUR)	25 Psi
Collision Gas (CAD)	3
Ion Spray Voltage (IS)	- 3000 Volt
Temperatur (TEM)	450 °C
Ion Source Gas 1 (GS1)	60 °C
Ion Source Gas 2 (GS2)	90 °C
Interface Heater (ihe)	On

Aus Tabelle 18 sind die Massenübergänge für Bisphenol A (BPA, BPA Q und BPA INT) im Multiple-Reaction-Monitoring-Modus (MRM-Modus) zu entnehmen.

Tabelle 18: Massenübergänge der MRMs

Bisphenol A	Q1 Mass (Da)	Q3 Mass (Da)
BPA	227,0	212,2
BPA Q	227,0	133,1
BPA INT	241,0	223,2

Aus Tabelle 19 sind die Spannungen der MRM-Messung ersichtlich.

Tabelle 19: Spannung der MRMs

DP (Volts)	EP (Volts)	CEP (Volts)	CE (Volts)	CXP
-126,0	-11,0	-19,4	-30,0	-4,0

3.3.3 Qualitätssicherung

Zur Qualitätssicherung wurden folgende Maßnahmen eingehalten:

3. Materialien und Methoden

- Alle Lösemittel wurden an der Originalverpackung frisch angebrochen und separat gelagert.
- Die Herstellung neuer Standardlösungen erfolgte durch Einwaage der Referenzsubstanz und die entsprechende Verdünnung.
- Die Berechnungen jeglicher Verdünnungen und auch volumetrische Arbeiten erfolgten stets gravimetrisch.
- Um eine mögliche Kontamination der Chemikalien und verwendeten Geräte auszuschließen, wurden Blindwertmessungen durchgeführt.
- Um die Richtigkeit der Methode zu überprüfen, wurden Wiederfindungsversuche durchgeführt.
- Die Überprüfung der Prüfmittel erfolgte mittels Kontrollstandards.
- Es wurde ein deuterisierter Standard als interner Standard bei der MS/MS-Messung eingesetzt.

4 Ergebnisse

Im Folgenden beziehen sich die Werte ng/g auf BPA/Material und ng/ml auf BPA/Eluat. Die Bisphenol-A-Messungen aus Fissurenversiegelungsmaterialien wurden in Zusammenarbeit mit der BAM (Bundesanstalt für Materialforschung und –prüfung) in der Fachgruppe organisch- chemische Analytik durchgeführt und sind in dem Prüfbericht I.2/2010-AA-276 zusammengefasst.

4.1 Ablauf der Probenüberprüfung

4.1.1 Kalibrierung

Da die Standardlösung KAL1 (20,8 ng/g; 18,4 ng/ml) stark von der Basislinie beeinflusst wurde, dienten die Bezugslösungen KAL2 bis KAL6 (61,3-225,5 ng/g; 54,1-199,1 ng/ml) zur Berechnung der linearen Kalibrierfunktion für den Arbeitsbereich. Deshalb setzt sich die Kalibrierung aus 10 Punkten von 5 verschiedenen Konzentrationsniveaus zusammen.

Die Kalibriergerade ist aus Abbildung 11 ersichtlich.

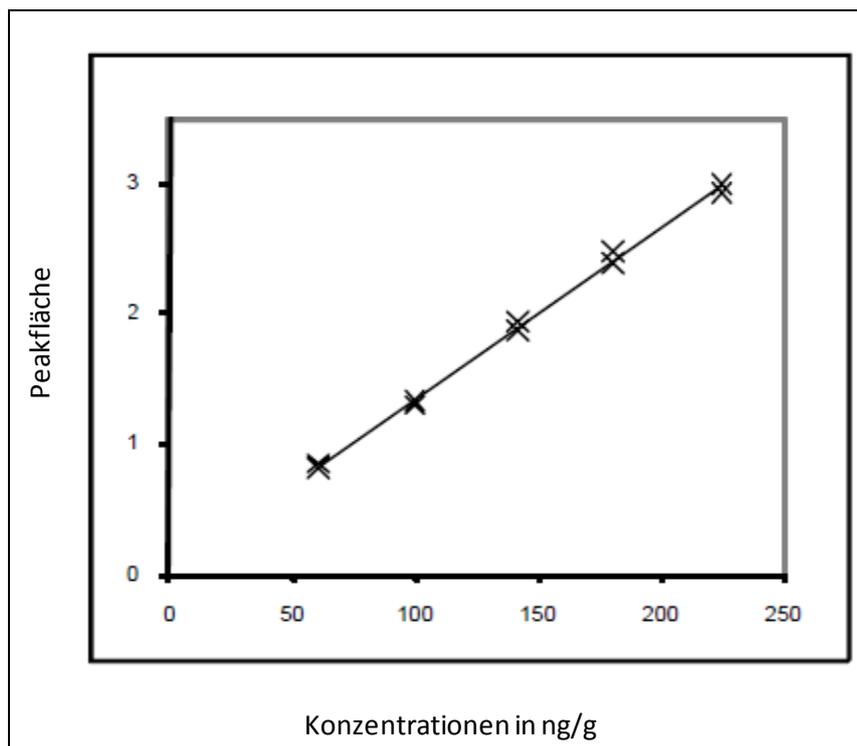


Abbildung 11: Kalibrierungsgerade Fluoreszenzdetektion

Aus Tabelle 20 können die Daten für die Kalibrierung entnommen werden.

4. Ergebnisse

Tabelle 20: Kenndaten für die Kalibrierung des Fluoreszenzdetektors

Steigung a	0,0131
Achsenabschnitt	0,011 mAU·min (Absorptionsunit x min)
y Mittelwert	1,88 mAU·min (Absorptionsunit x min)
x Mittelwert	142,20 ng/g
Korrelationskoeffizient r	0,9987 r
Reststandardabweichung S_y	0,043 S_y
Verfahrensstandardabweichung S_{x0}	3,264 S_{x0}
Rel. Verfahrensstandardabweichung V_{x0}	2,30 %

Aus Abbildung 12 ist die Kalibrierungsgerade der Diodenarraydetektion ersichtlich.

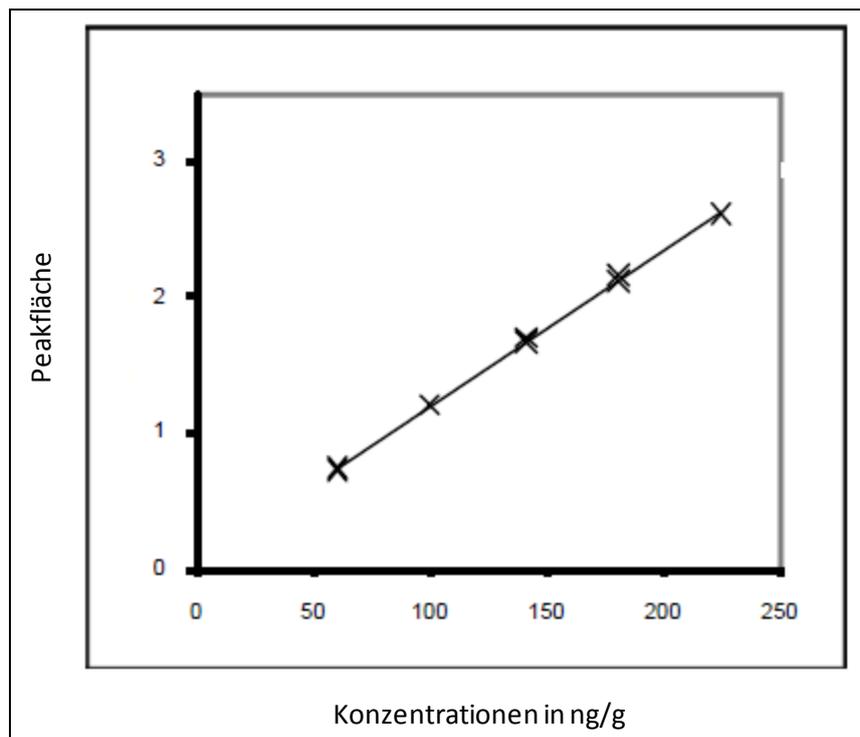


Abbildung 12: Kalibrierungsgerade Diodenarraydetektor

4. Ergebnisse

In Tabelle 21 sind die Kenndaten für die Kalibrierung der DAD-Detektion zusammengefasst.

Tabelle 21: Kenndaten der Kalibrierung DAD

Steigung a	0,0115
Achsenabschnitt	0,037 mAU·min (Absorptionsunit x min)
y Mittelwert	1,67 mAU·min (Absorptionsunit x min)
x Mittelwert	142,20 ng/g
Korrelationskoeffizient r	0,9995 r
Reststandardabweichung Sy	0,022 Sy
Verfahrensstandardabweichung Sx0	1,952 Sx0
Rel. Verfahrensstandardabweichung Vx0	1,37 %

Die Retentionszeit von Bisphenol A wurde aus den Messungen (n=10) der Kalibrierung unter direkten Wiederholbedingungen ermittelt. Die Daten können der Tabelle 22 entnommen werden.

Tabelle 22: Retentionszeiten in Minuten der HPLC-DAD/FLD (n=10)

Streuungsmaße	FLD	DAD
Mittelwert	8,62	8,44
Standardabweichung	0,022	0,021
Varianzkoeffizient	0,25 %	0,32 %

4.1.2 Richtigkeit der Kalibrierung

Die Kalibrierung von Bisphenol A wurde auf Richtigkeit überprüft, indem ein unabhängiger Kontrollstandard in die Messung einbezogen wurde. Der Mittelwert der vier Messungen (vier Messungen der Standardlösung zur Qualitätssicherung des Messverfahrens) ergab eine Differenz von 12,3 % für den FLD und 12,6 % für den DAD von der Sollkonzentration des Kontrollstandards. Die verwendeten Lösemittel der Standardlösungen sind für die systematische Differenz von 0,3 Minuten (siehe Chromatogramm Abbildung 13 und 14) verantwortlich.

4. Ergebnisse

Tabelle 23: Kontrolle der Kalibrierung des Fluoreszenzdetektors und Diodenarraydetektors

K-STD	Soll in ng/g	FLD in ng/g	Wf in %	DAD in ng/g	Wf in %
	89,1	100,03	112,3	100,3	112,6
	Standardabweichung	0,021		0,024	
	Varianzkoeffizient in %	1,62		2,20	

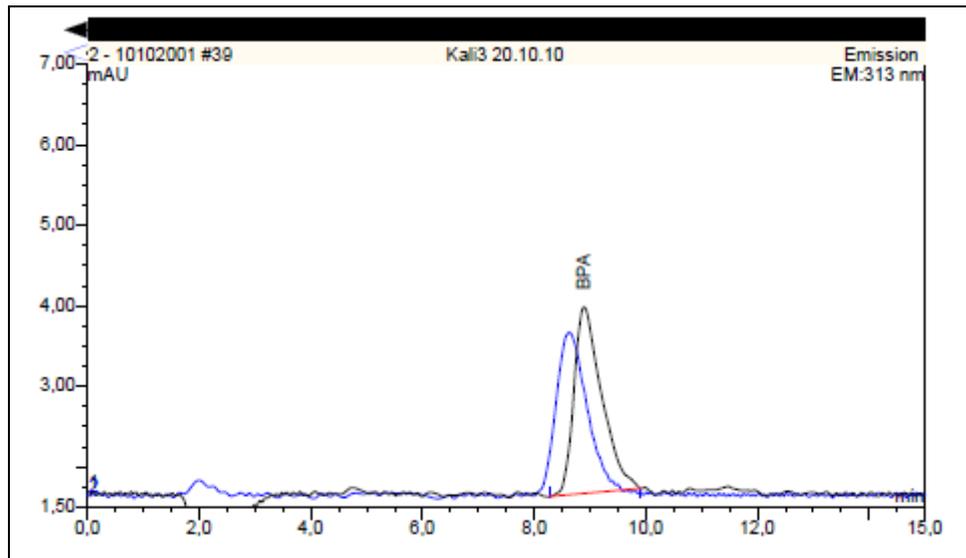


Abbildung 13: Chromatogramme Kal 3 = blaue Kurve und Kontrollstandard = schwarze Kurve der Fluoreszenzdetektion; Retentionszeitbereich = rot

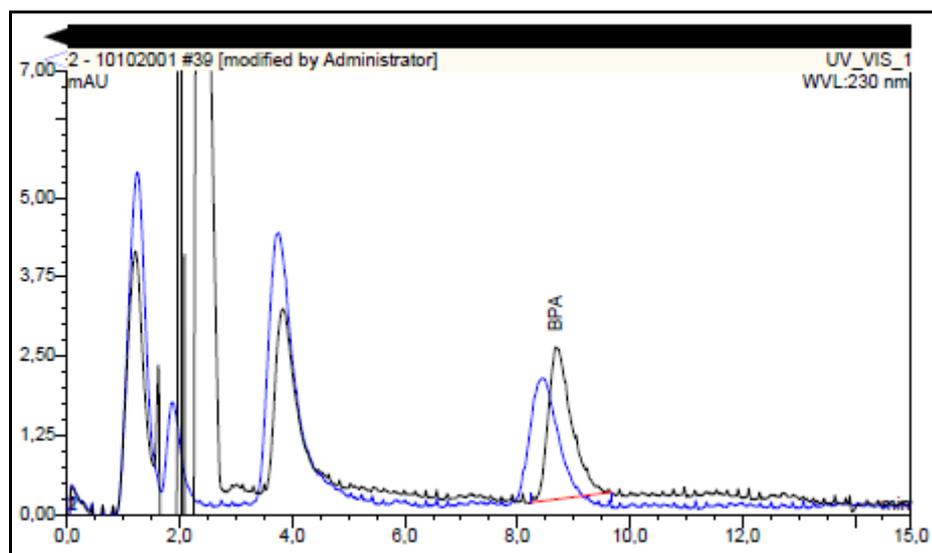


Abbildung 14: Chromatogramme Kal3 = blaue Kurve und Kontrollstandard = schwarze Kurve der Diodenarraydetektion; Retentionszeitbereich = rot

4. Ergebnisse

4.1.3 Wiederfindungsproben mit BPA; GMA101019_01 bis _05

Es konnte in jeder aufgearbeiteten Wiederfindungsprobe Bisphenol A detektiert werden. Durch das Rauschen kam es jedoch zu einer Beeinträchtigung der Grundlinie des Detektors bei der Wiederfindungsprobe mit dem geringsten Gehalt von 0,8 ng/ml. Der Mittelwert der Wiederfindungsraten der restlichen vier Wiederfindungsproben in den Konzentrationsbereichen zwischen 1,8 ng/ml und 4,6 ng/ml lag bei etwa 83 Prozent beim Fluoreszenzdetektor bzw. 78% beim Diolenarraydetektor.

Tabelle 24: Wiederfindungsraten von Bisphenol A mit FLD und DAD

Material	Migrat in ng/ml	FLD in ng/g	Wf in %	DAD in ng/g	Wf in %
GMA101019_01	0,77	27,4	97,4	17,8	63,1
GMA101019_02	1,82	52,2	82,8	46,8	74,2
GMA101019_03	2,29	66,5	84,3	65,1	82,5
GMA101019_04	3,74	102,6	79,1	97,4	75,1
GMA101019_05	4,62	134,8	83,7	130,3	81,0

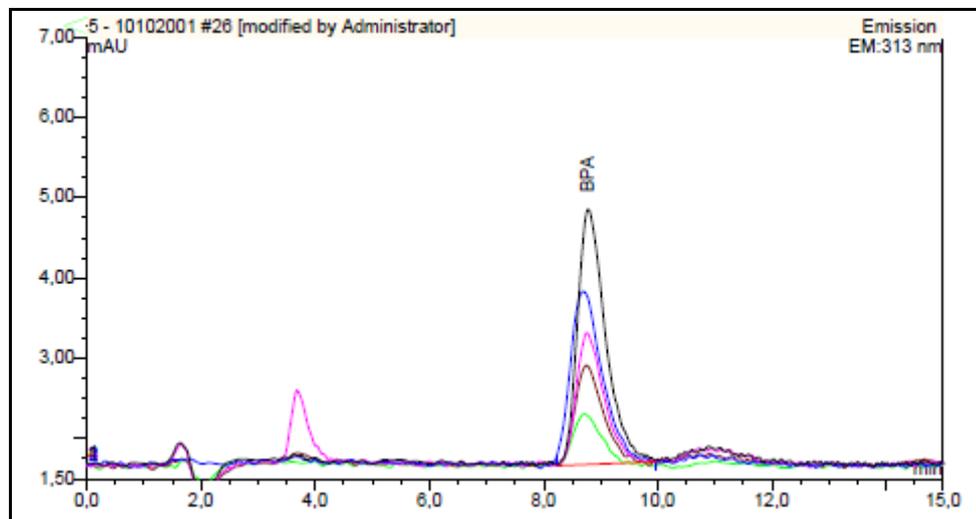


Abbildung 15: Chromatogramme der Wiederfindungsproben GMA101019_01 bis GMA101019_05 der Fluoreszenzdetektion

4. Ergebnisse

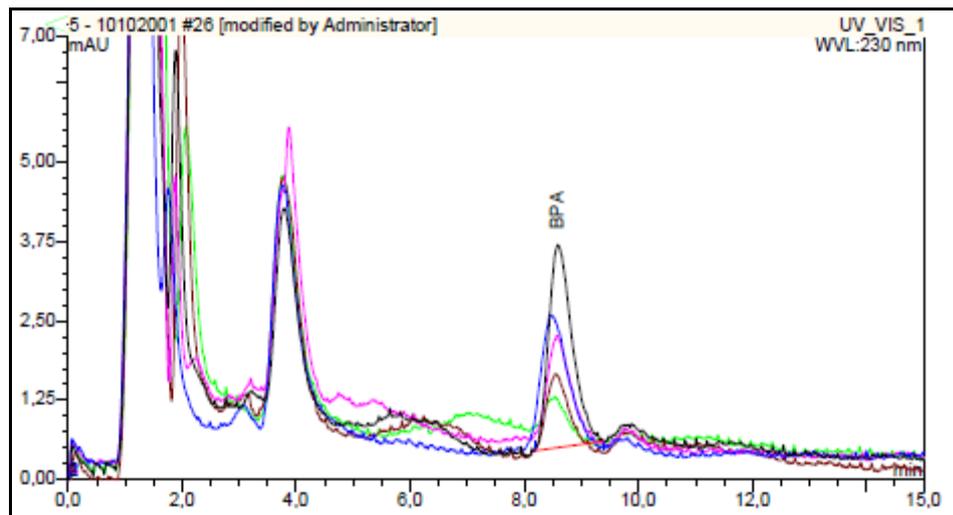


Abbildung 16: Chromatogramme der Wiederfindungsproben GMA101019_01 bis GMA101019_05 der Diodenarraydetektion

4.1.4 Nachweisvermögen

Die Abschätzung der Möglichkeit des Nachweises von Bisphenol A aus den Doppelbestimmungen der Bezugslösungen der Kalibrierung Kal1 für die HPLC und der Wiederfindungsproben GMA101019_01 erfolgte in Wasser. Die Standardlösung Kal1 (20,8 ng/g; 18,4 ng/ml) wies ein S/N (Signal zu Rauschen/Noise) von 5,9 beim Fluoreszenzdetektor und 4,3 beim Diodenarraydetektor auf.

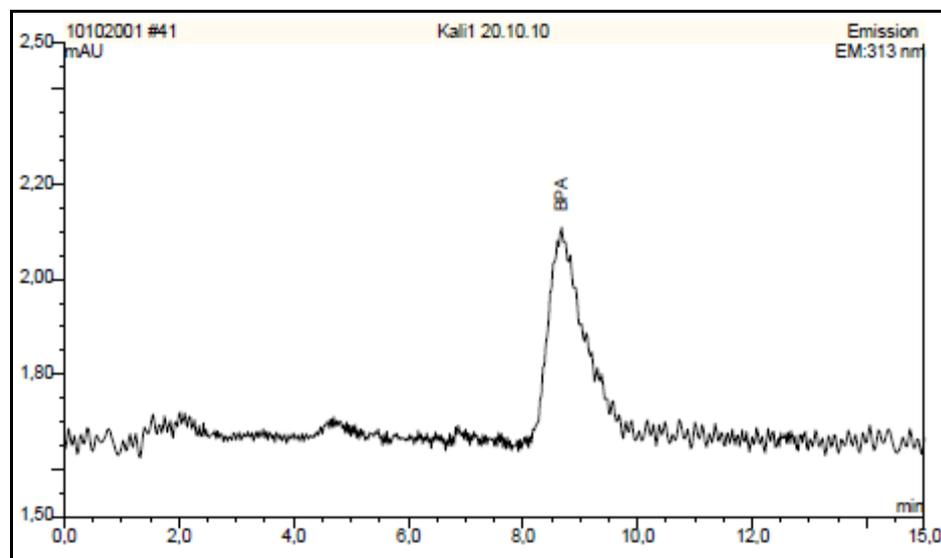


Abbildung 17: Chromatogramm Kal1 (20,8 ng/g; 18,4 ng/ml) niedrigster Kalibrierpunkt der Fluoreszenzdetektion

4. Ergebnisse

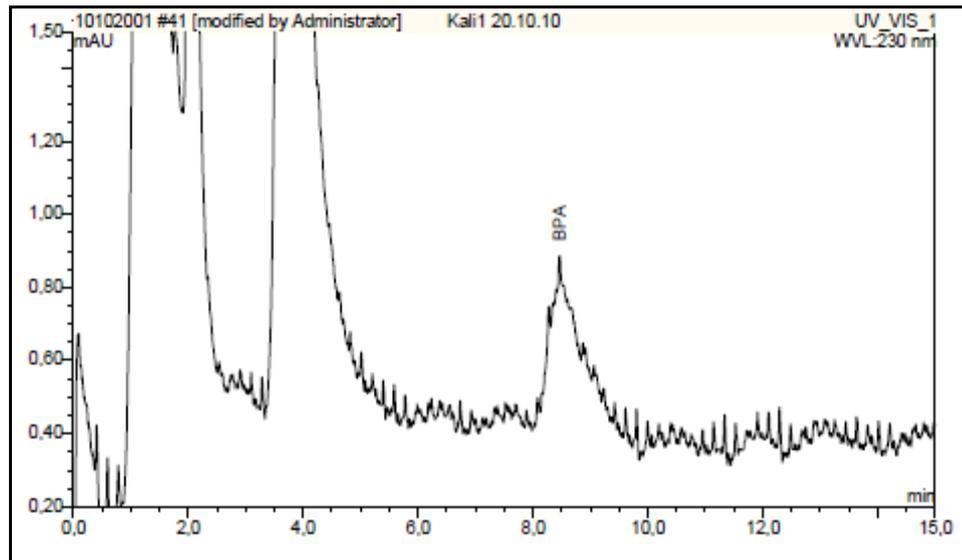


Abbildung 18: Chromatogramm Kal1 (20,8 ng/g; 18,4 ng/ml) niedrigster Kalibrierpunkt der Diodenarraydetektion

Aus den Abbildungen 17 und 18 wird ersichtlich, dass bei einer Retentionszeit von 8,5 bis 8,8 Minuten ein Bisphenol-A-Peak zu erkennen ist. Diese Kalibrierung dient im Folgenden als Referenzwert für die Bisphenol-A-Detektion. Die folgenden Abbildungen 19 und 20 zeigen die Bestimmung von Bisphenol A und dienen als Standard zur Bestimmung von Bisphenol A aus den Probenkörpern.

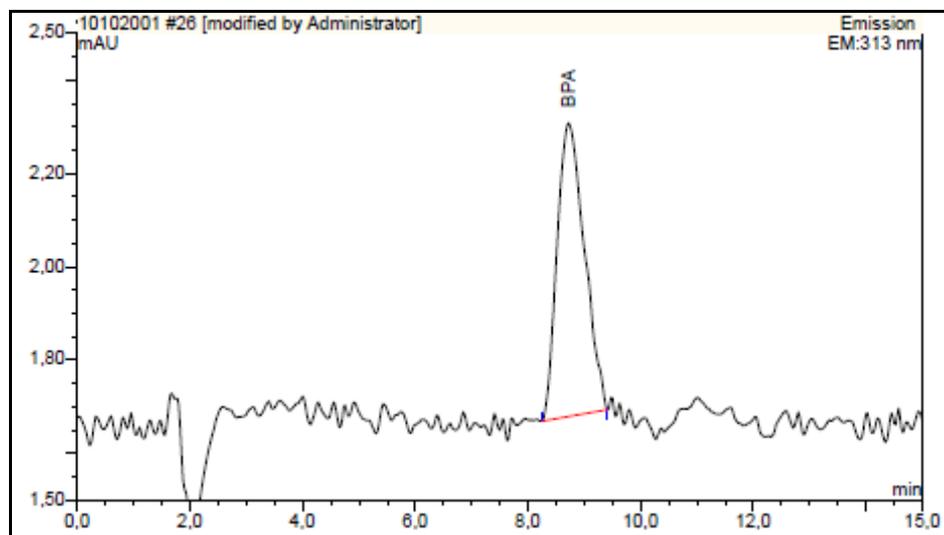


Abbildung 19: Chromatogramm der Wiederfindungsprobe GMA101019_01 (0,77 ng/g) der Fluoreszenzdetektion; Retentionszeitbereich = rot

4. Ergebnisse

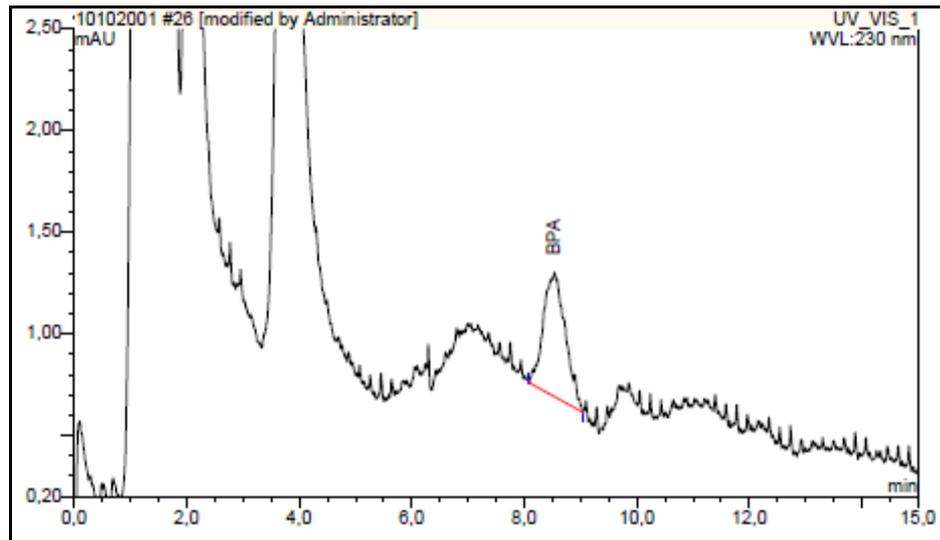


Abbildung 20: Chromatogramm der Wiederfindungsprobe GMA101019_01 (0,77 ng/g) der Diodenarraydetektion; Retentionszeitbereich = rot

4.1.5 Blindwertproben GMA101018_01, _02, _04 und GMA101019_06

Keine der Blindwertproben, die die Migration durchliefen, zeigte eine Kontamination mit Bisphenol A.

Die Abbildungen 21 und 22 zeigen die Ergebnisse der Blindwertproben.

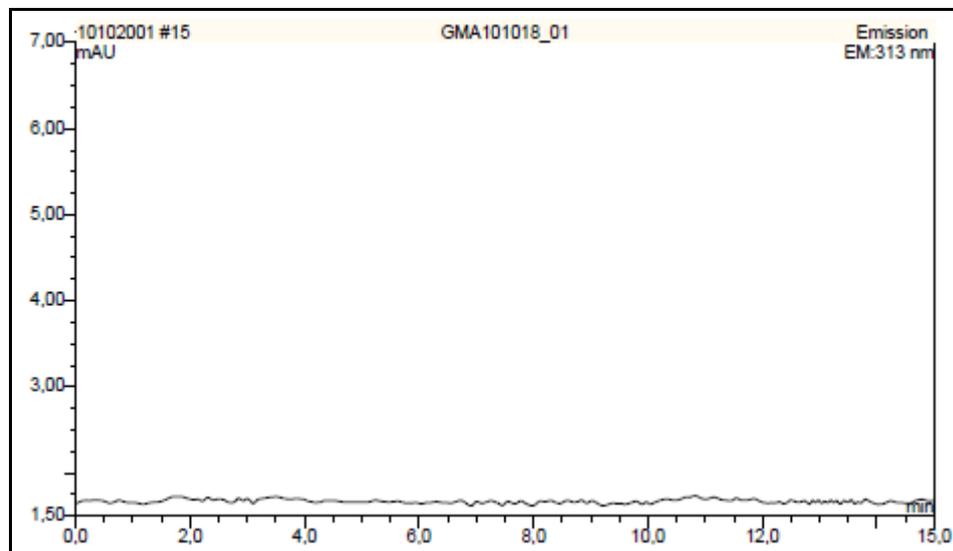


Abbildung 21: Chromatogramm Blindwertprobe GMA101018_01 der Fluoreszenzdetektion

In Abbildung 21 ist kein Peak zu erkennen und somit gibt es keinen Hinweis auf einen Gehalt an Bisphenol A.

4. Ergebnisse

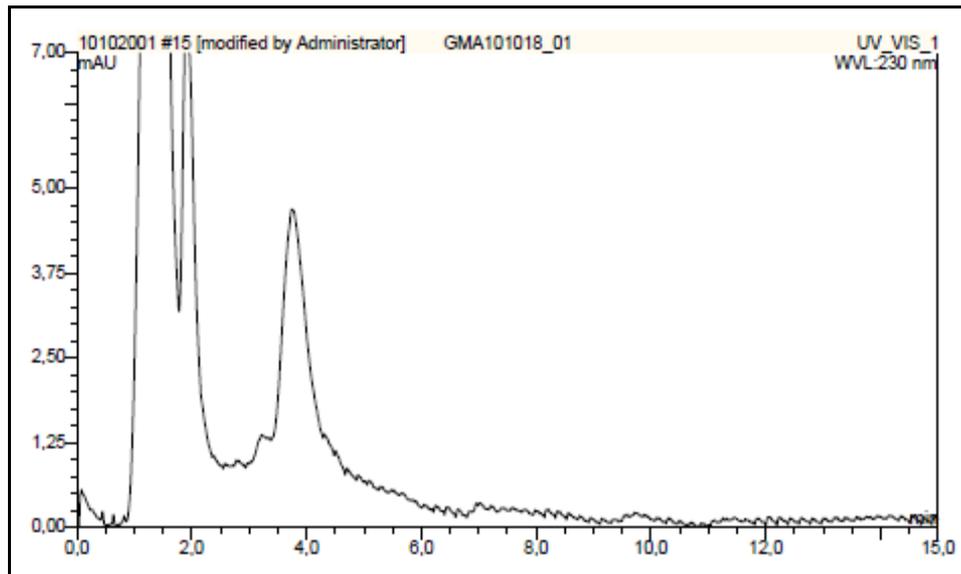


Abbildung 22: Chromatogramm Blindwertprobe GMA101018_01 der Diodenarraydetektion

Ähnlich wie in Abbildung 21 ist auch in Abbildung 22 kein Peak in der Retentionszeit, die mit Hilfe von Kalibrierlösungen für Bisphenol A bestimmt wurde, zu erkennen.

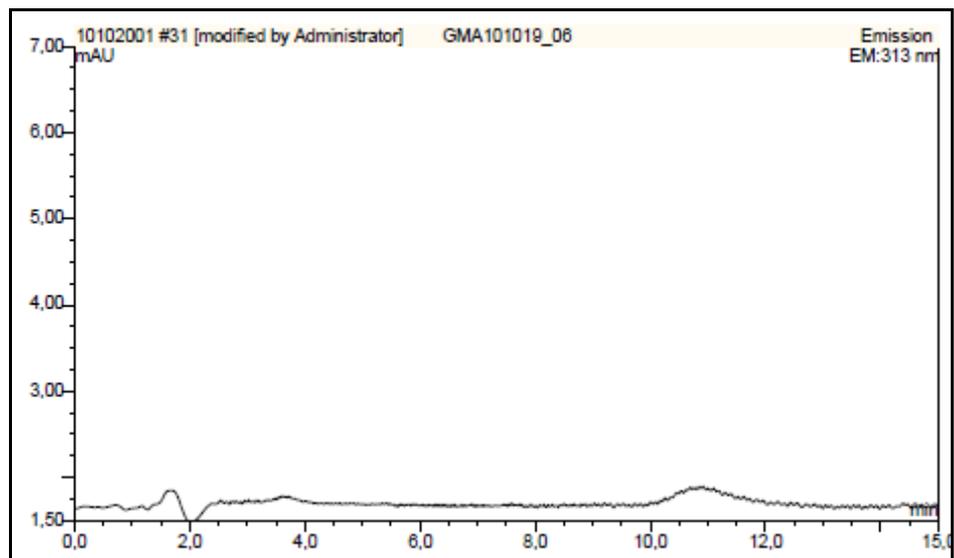


Abbildung 23: Chromatogramm Blindwertprobe GMA101019_06 der Fluoreszenzdetektion

4. Ergebnisse

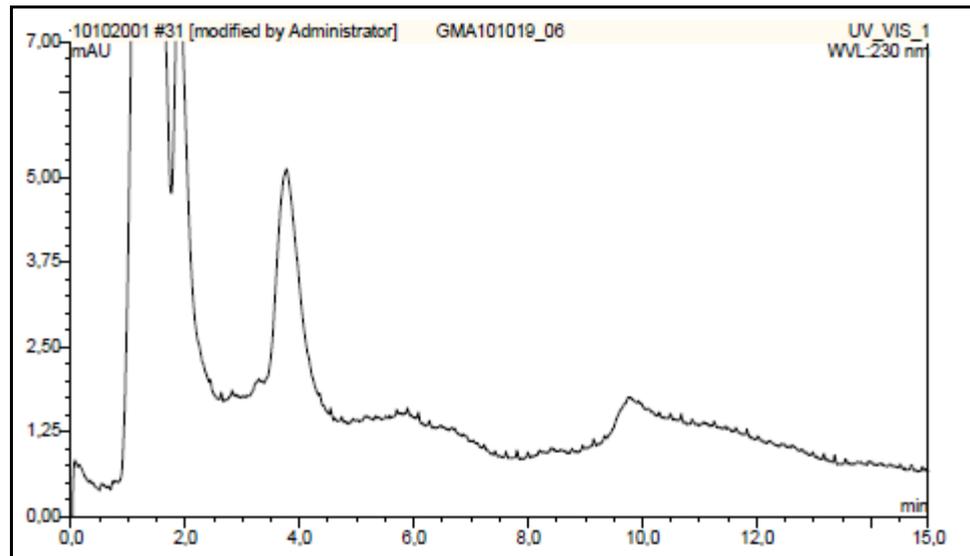


Abbildung 24: Chromatogramm Blindwertprobe GMA101019_06 der Diodenarraydetektion

In den Abbildungen 23 und 24 sind keine Bisphenol-A-Peaks zu erkennen.

4.1.6 Testprobe Bis-GMA; GMA101018_03

In den Chromatogrammen wurden zum Teil Peaks mit sehr großen Intensitäten detektiert. Die Anwesenheit von Bisphenol A wurde mit dem Vergleich der Retentionszeiten aus den Standardlösungen ermittelt.

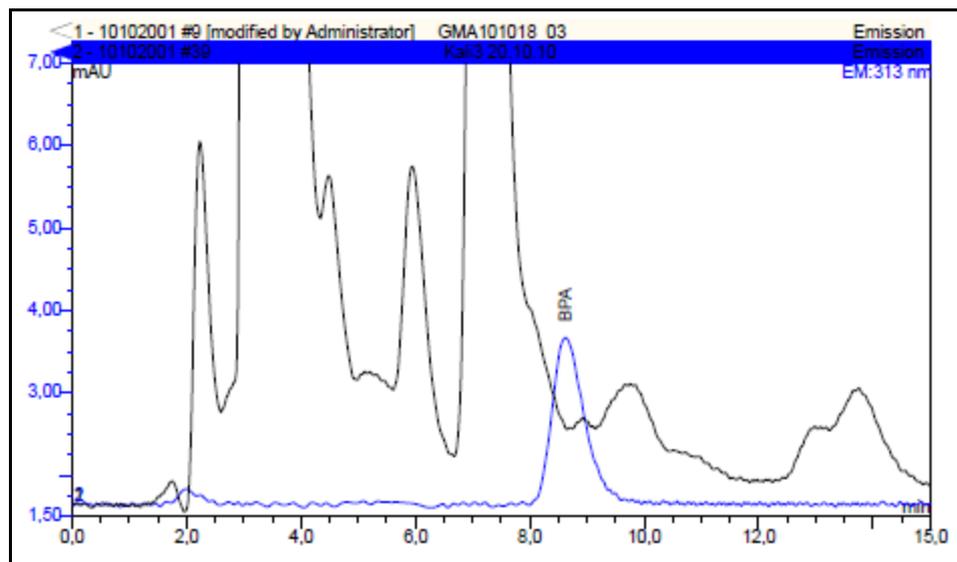


Abbildung 25: Überlagerte Darstellung der Chromatogramme GMA101018_03 = schwarze Kurve; Kal3 = blaue Kurve (100,7 ng/g; 88,9 ng/ml) der Fluoreszenzdetektion

4. Ergebnisse

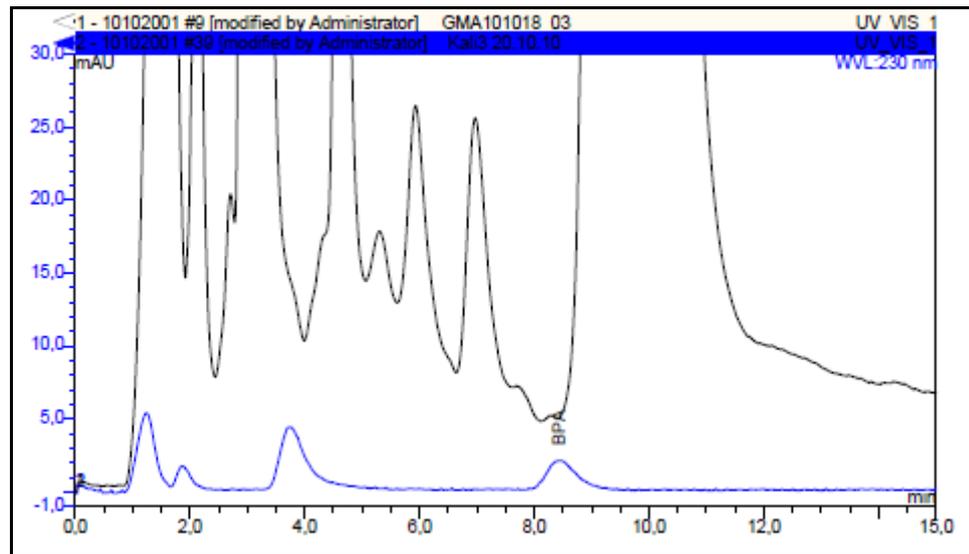


Abbildung 26: Überlagerte Chromatogramme GMA101018_03 = schwarze Kurve und Kal3 = blaue Kurve (100,7 ng/g; 88,9 ng/ml) der Diodenarraydetektion

Die Abbildung 25 und 26 zeigen die überlagerten Chromatogramme der Versieglermasse (Bis-GMA) und der Kalibrierlösung. Daraus wird ersichtlich, dass das Chromatogramm der Versieglermasse (schwarz) im Vergleich zu dem Chromatogramm der Standardlösung (blau) keinen Anhalt auf Bisphenol A aufweist.

4.1.7 Probenserie

Die Aufarbeitung der Proben erfolgte mit einem Blindwert. Außerdem wurde mitläufig eine Wiederfindungsprobe aus dotiertem Wasser (mit standardisiertem Bisphenol A) aufgearbeitet.

Tabelle 25 zeigt die Massen (Trockeneinwaage) der Prüfkörper, nach der Polymerisation.

4. Ergebnisse

Tabelle 25: Einwaagen der Proben

Probe	Masse (trocken) in g
GMA101020_01 (Fissurit F)	1,51
GMA101020_02 (Fissurit F)	1,66
GMA101020_03 (Fissurit F)	1,70
GMA101020_04 (Delton FS ⁺)	2,40
GMA101020_05 (Delton FS ⁺)	2,41
GMA101020_06 (Delton FS ⁺)	2,54
GMA101020_07 (Bis-GMA)	2,73
GMA101020_08 (Bis-GMA)	2,86
GMA101020_09 (Bis-GMA)	2,72
GMA101020_10 (TMXDI-Dimethacrylat)	2,69
GMA101020_11 (TMXDI-Dimethacrylat)	2,95
GMA101020_12 (TMXDI-Dimethacrylat)	2,70

Es wurden zum Teil Peaks mit sehr großen Intensitäten detektiert. Die Reproduzierbarkeit der Messungen der drei Probenserien je Versieglermasse wurde durch Vergleich der erhaltenen Chromatogramme, die im Folgenden in den weiteren Messungen dargestellt sind, ermittelt. Der Vergleich der Retentionszeiten aus den Standardlösungen diente dabei der Überprüfung der Anwesenheit von Bisphenol A. Keiner der Peaks konnte dabei auf die Anwesenheit von Bisphenol A gedeutet werden. Da die detektierten Peaks der Matrix im Diodenarraydetektor den Elutionsbereich teilweise überdeckten, waren die Chromatogramme des Fluoreszenzdetektors aussagekräftiger.

4.1.7.1 Versieglermasse Fissurit F; GMA101020_01, GMA101020_02 und GMA101020_03

Die Abbildungen 27 und 28 zeigen die Ergebnisse der Fluoreszenzdetektion und Diodenarraydetektion des Fissurenversiegelungsmaterials Fissurit F, mit den Probencodes GMA101020_01, GMA1010_02 und GMA101020_03.

4. Ergebnisse

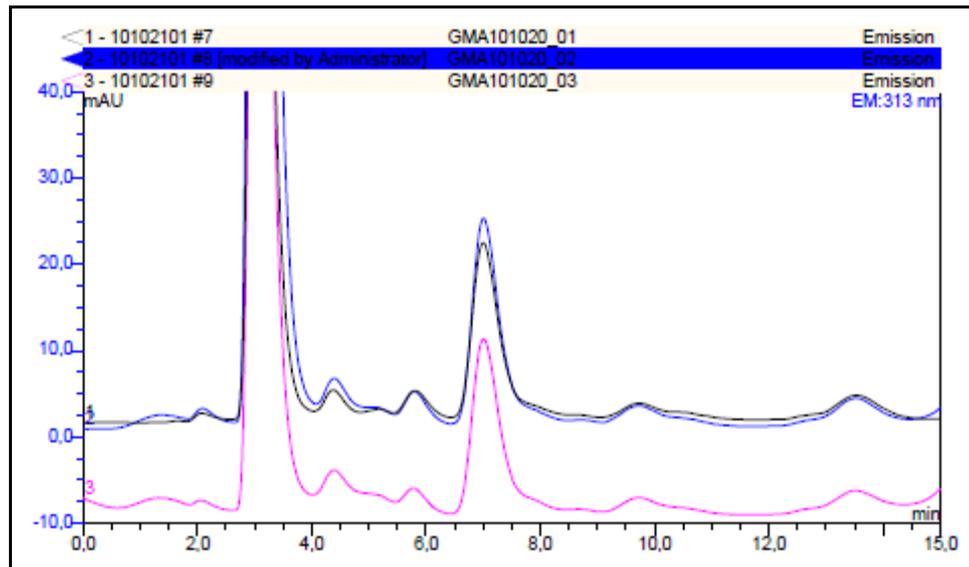


Abbildung 27: Chromatogramme GMA101020_01 = schwarze Kurve, GMA101020_02 = blaue Kurve und GMA101020_03 = rosa Kurve der Fluoreszenzdetektion

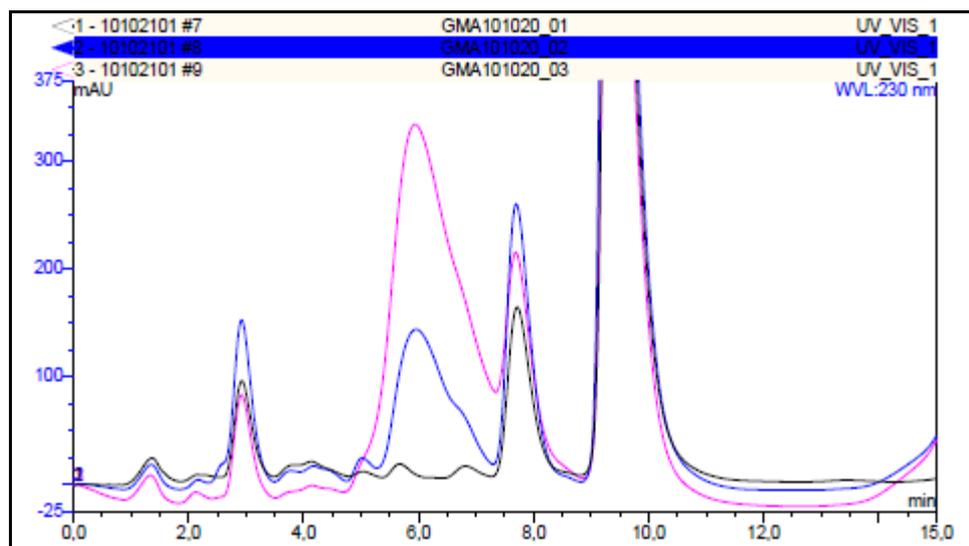


Abbildung 28: Chromatogramme GMA101020_01 = schwarze Kurve, GMA101020_02 = blaue Kurve und GMA101020_03 = rosa Kurve der Diodenarraydetektion

Die Chromatogramme zeigen keine Peaks, die auf den Gehalt von Bisphenol A hindeuten.

4.1.7.1.1 Vergleich der Chromatogramme von Proben (Fissurit F) mit Bisphenol-A-Standardlösungen

Die Chromatogramme der Abbildungen 27 und 28 werden mit den Chromatogrammen von Standardlösungen aus den Abbildungen 29 und 30 verglichen.

4. Ergebnisse

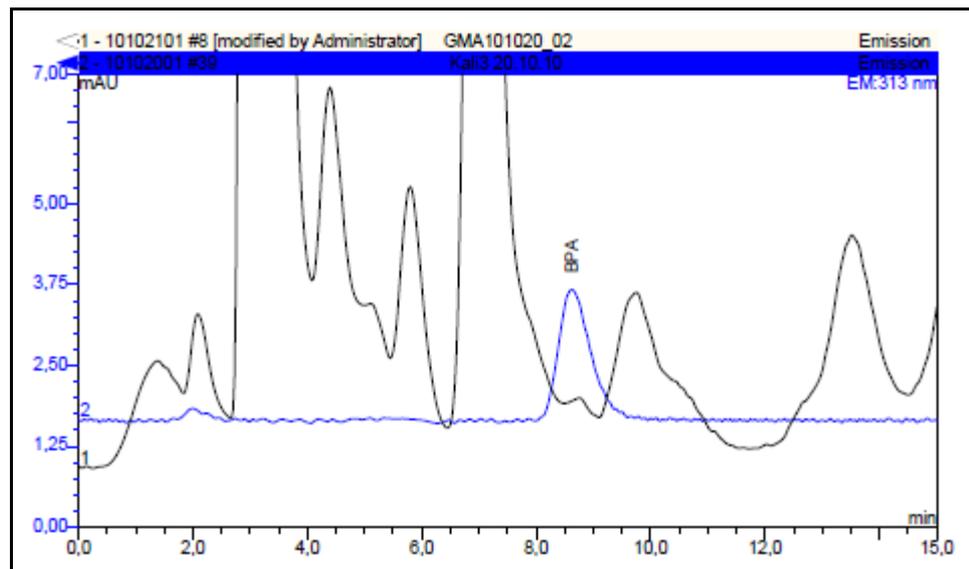


Abbildung 29: Überlagerte Chromatogramme GMA101020_02 = schwarze Kurve und STD Kal3 = blaue Kurve (100,7 ng/g; 88,9 ng/ml) der Fluoreszenzdetektion

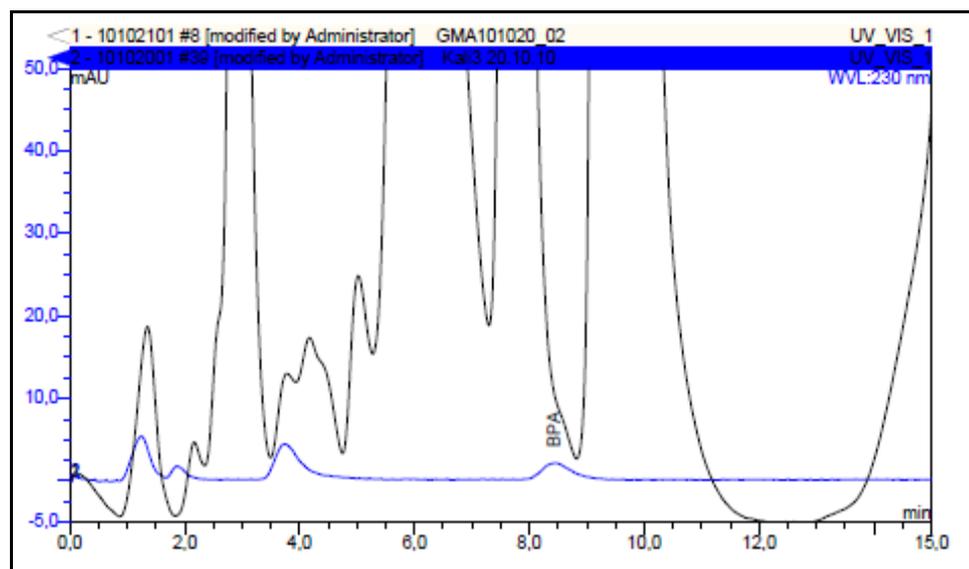


Abbildung 30: Überlagerte Chromatogramme GMA101020_02 = schwarze Kurve und STD Kal3 = blaue Kurve (100,7 ng/g; 88,9 ng/ml) der Diodenarraydetektion

Beim Vergleich des Chromatogramms der Kalibrierlösung mit dem des Versieglers wird ersichtlich, dass kein Bisphenol A in der Probe der Versieglermasse zu erkennen ist.

4. Ergebnisse

4.1.7.2 Versieglermasse Delton FS+;GMA101020_04, GMA101020_05 und GMA101020_06

Es wurden verschiedene Peaks in den Chromatogrammen detektiert. Aus den Abbildungen 31 und 32 sind die Chromatogramme der Versieglermassen Delton FS+ mit dem Probencode GMA101020_04 bis _06 zu erkennen.

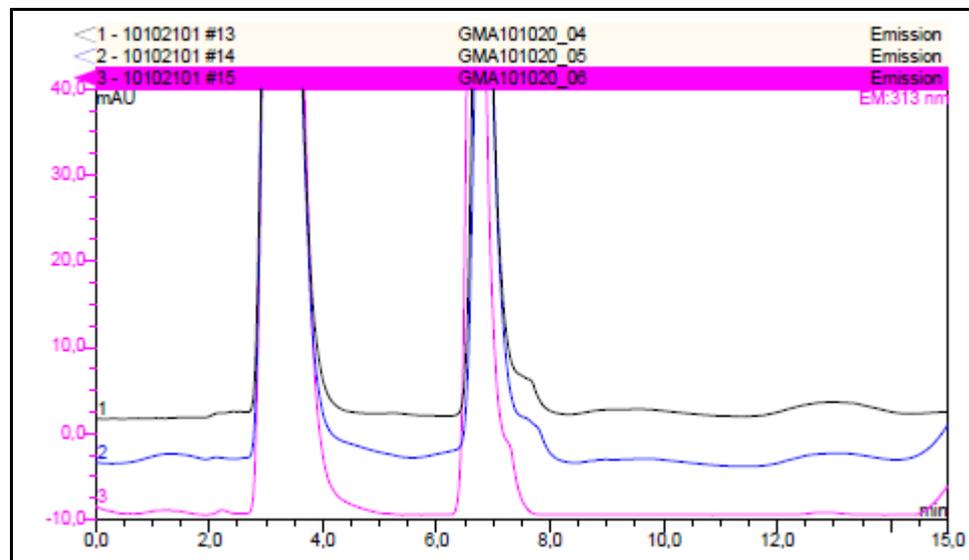


Abbildung 31: Chromatogramme GMA101020_04 = schwarze Kurve, GMA101020_05 = blaue Kurve und GMA101020_06 = rosa Kurve der Fluoreszenzdetektion

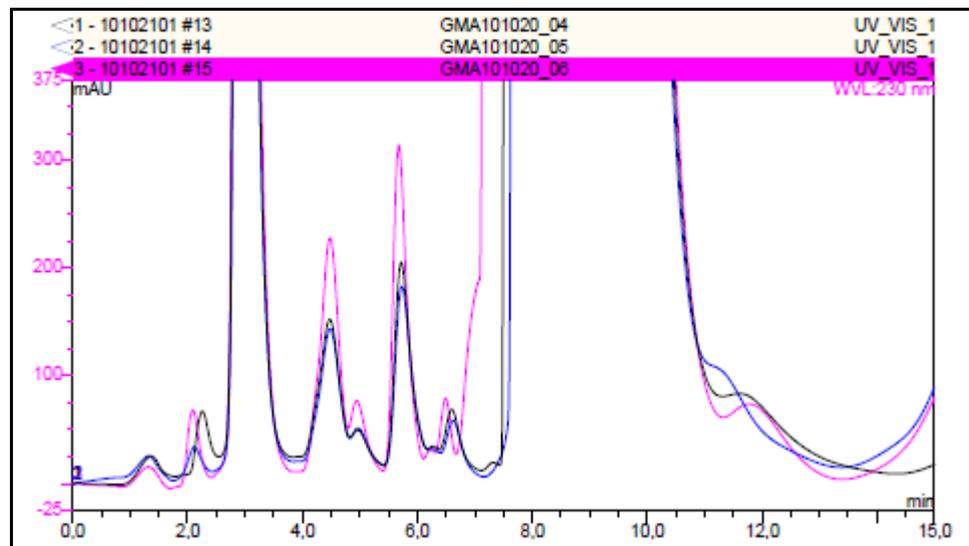


Abbildung 32: Chromatogramme GMA101020_04 = schwarze Kurve, GMA101020_05 = blaue Kurve und GMA101020_06 = rosa Kurve der Diodenarraydetektion

In den Abbildungen 31 und 32 sind keine Peaks für Bisphenol A zu erkennen.

4. Ergebnisse

4.1.7.2.1 Vergleich der Chromatogramme von Delton FS⁺ mit der Standardlösung

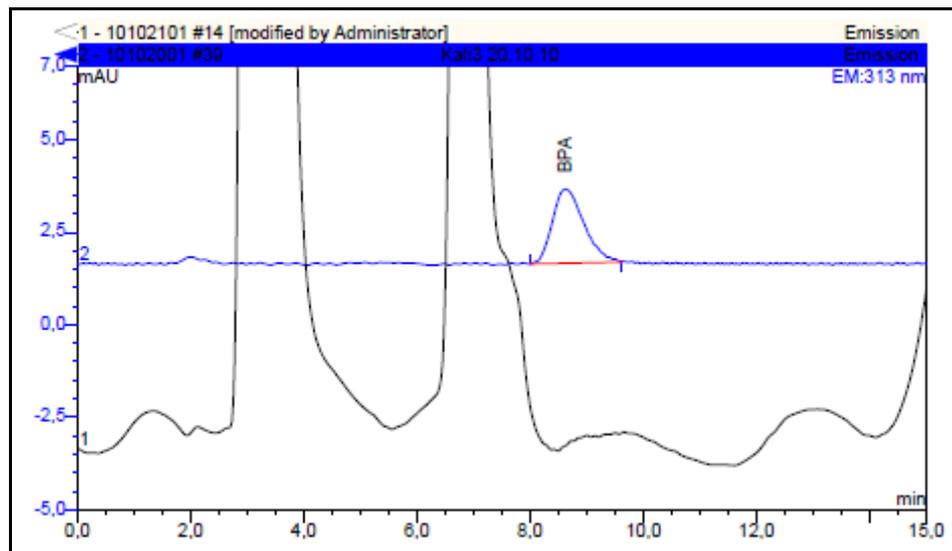


Abbildung 33: Überlagerung der Chromatogramme GMA101020_05 = schwarze Kurve und STD Kal3 = blaue Kurve (100,7 ng/g; 88,9 ng/ml) der Fluoreszenzdetektion; Retentionszeitbereich = rot

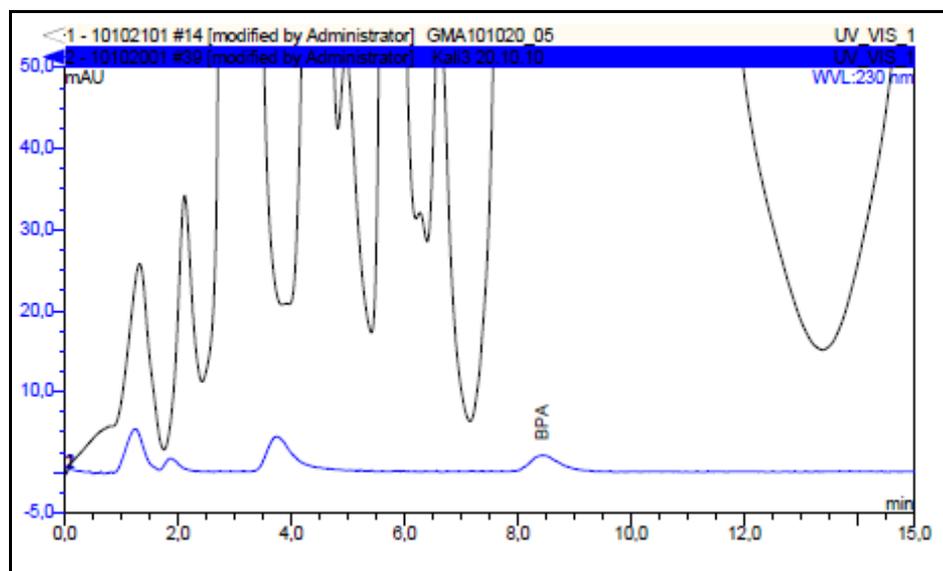


Abbildung 34: Überlagerung der Chromatogramme GMA101020_05 = schwarze Kurve und STD Kal3 = blaue Kurve (100,7 ng/g; 88,9 ng/ml) der Diodenarraydetektion

Der Vergleich der Chromatogramme für die Versieglermasse dieser Probenreihe mit den Standardlösungen, ist aus den Abbildungen 33 und 34 zu entnehmen. Die Chromatogramme weisen im Vergleich mit denen der Standardlösungen keinen Bisphenol-A-Gehalt auf.

4. Ergebnisse

4.1.7.3 Versieglermasse (Bis-GMA); GMA101020_07, GMA101020_08 und GMA101020_09

Im gesamten Chromatogramm konnten Peaks detektiert werden. Im Folgenden sind in den Abbildungen 35 und 36 die Chromatogramme der Versieglermasse mit den Probencodes GMA101020_07 bis _09 zu erkennen.

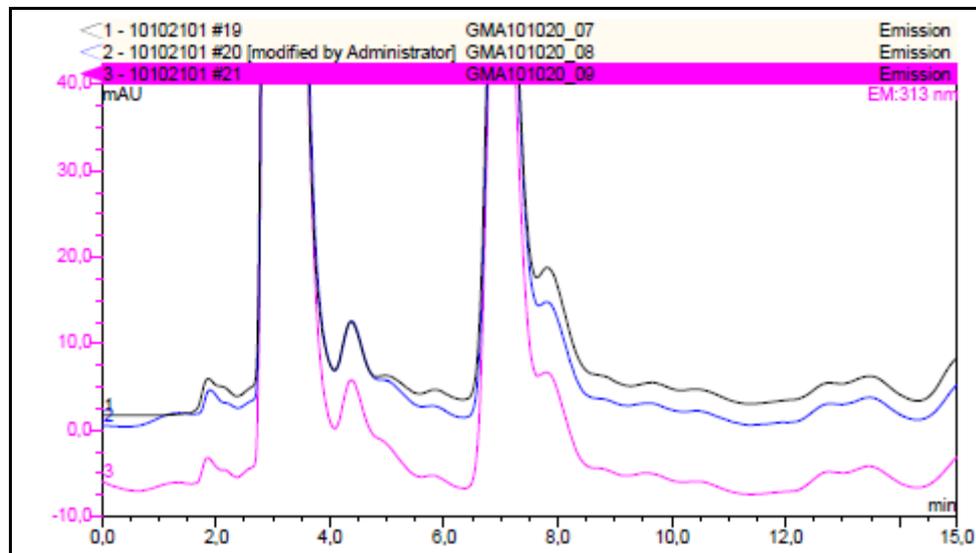


Abbildung 35: Chromatogramme GMA101020_07 = schwarze Kurve, GMA101020_08 = blaue Kurve und GMA101020_09 = rosa Kurve der Fluoreszenzdetektion

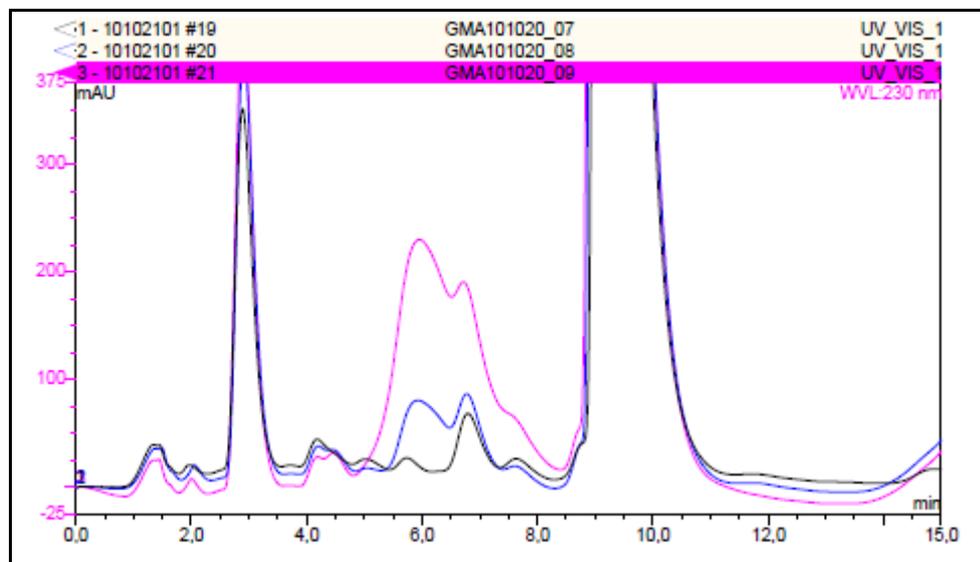


Abbildung 36: Chromatogramme GMA101020_07 = schwarze Kurve, GMA101020_08 = blaue Kurve und GMA101020_09 = rosa Kurve der Diodenarraydetektion

Weder in den Untersuchungsreihen mit der Fluoreszenzdetektion (Abb. 35) noch in der Diodenarraydetektion (Abb. 36) sind Bisphenol-A-Peaks ersichtlich.

4. Ergebnisse

4.1.7.3.1 Vergleich der Chromatogramme von Proben (Bis-GMA) mit Standardlösungen von Bisphenol A

Die Abbildungen im Folgenden stellen ein Vergleich der Probenchromatogramme mit Chromatogrammen von Standardlösungen dar. Durch Übereinanderlegen der beiden Chromatogramme wird ein direkter Vergleich dieser ersichtlich.

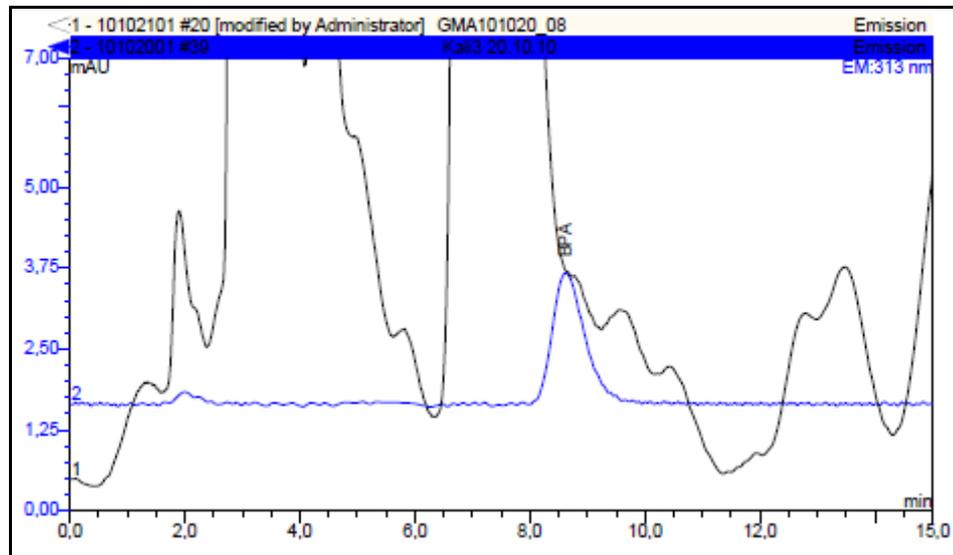


Abbildung 37: Überlagerte Chromatogramme GMA101020_08 = schwarze Kurve und STD Kal3 = blaue Kurve (100 ng/g; 88,9 ng/ml) der Fluoreszenzdetektion

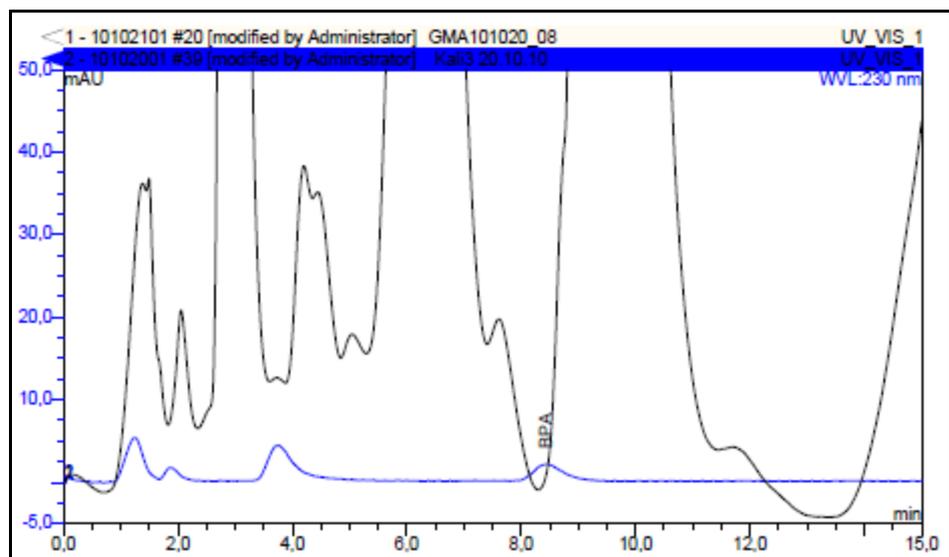


Abbildung 38: Übereinander gelegte Chromatogramme GMA101020_08 = schwarze Kurve und STD Kal3 = blaue Kurve (100 ng/g; 88,9 ng/ml) der Diodenarraydetektion

4. Ergebnisse

Beim Übereinanderlegen der Chromatogramme wird ersichtlich, dass kein Peak in der Retentionszeit für Bisphenol A vorhanden ist.

4.1.7.4 Versieglermasse TMXDI-Dimethacrylat; GMA101020_10, GMA101020_11 und GMA101020_12

In den gesamten Chromatogrammen sind Peaks zu erkennen (Abb. 39 und 40).

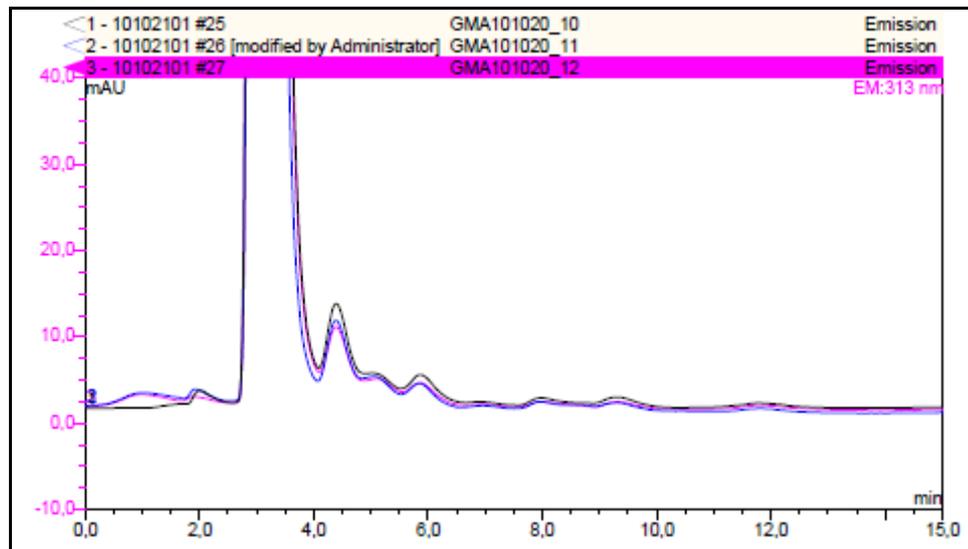


Abbildung 39: Chromatogramme GMA101020_10 = schwarze Kurve, GMA101020_11 = blaue Kurve und GMA101020_12 = rosa Kurve der Fluoreszenzdetektion

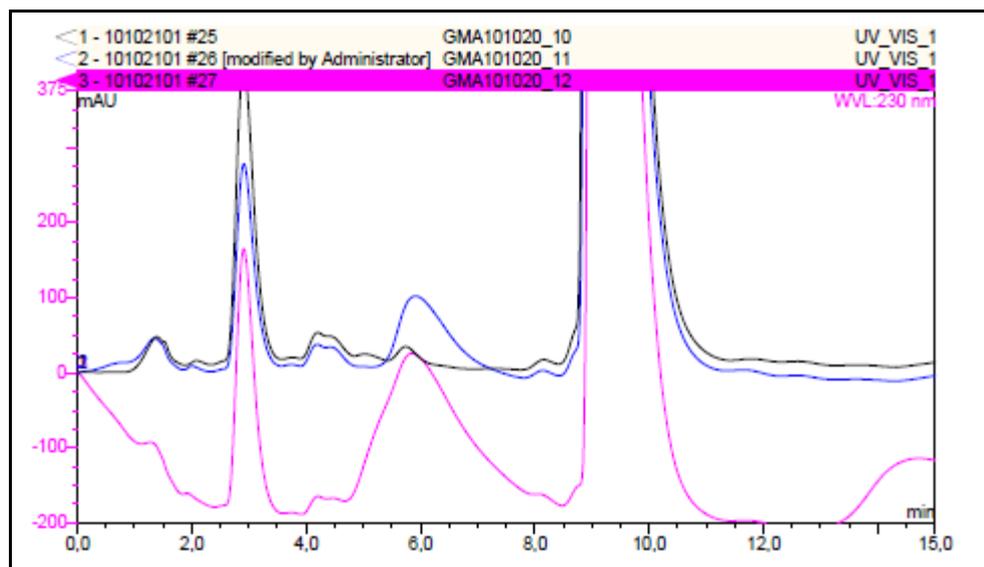


Abbildung 40: Chromatogramme GMA101020_10 = schwarze Kurve, GMA101020_11 = blaue Kurve und GMA101020_12 = rosa Kurve der Diodenarraydetektion

4. Ergebnisse

Es besteht kein Hinweis auf Bisphenol A. Der Vergleich dieser Chromatogramme mit denen der Chromatogramme der Standardlösungen ist aus den Abbildungen 41 und 42 zu entnehmen.

4.1.7.4.1 Vergleich der Chromatogramme von Proben (TMXDI-Dimethacrylat) mit Standardlösungen von BPA

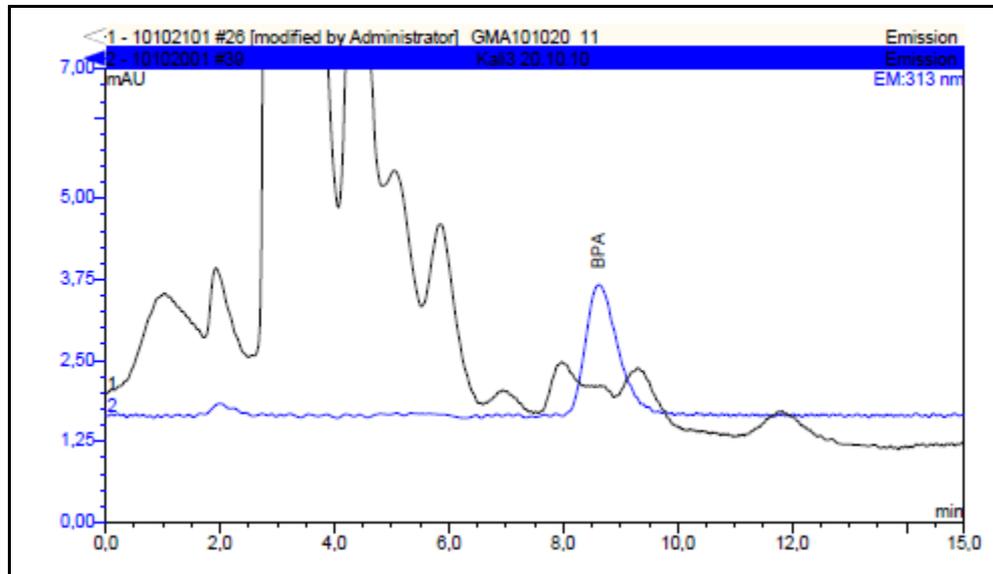


Abbildung 41: Überlagerte Chromatogramme GMA101020_11 = schwarze Kurve und STD Kal3 = blaue Kurve (100,7 ng/g; 88,9 ng/ml) der Fluoreszenzdetektion

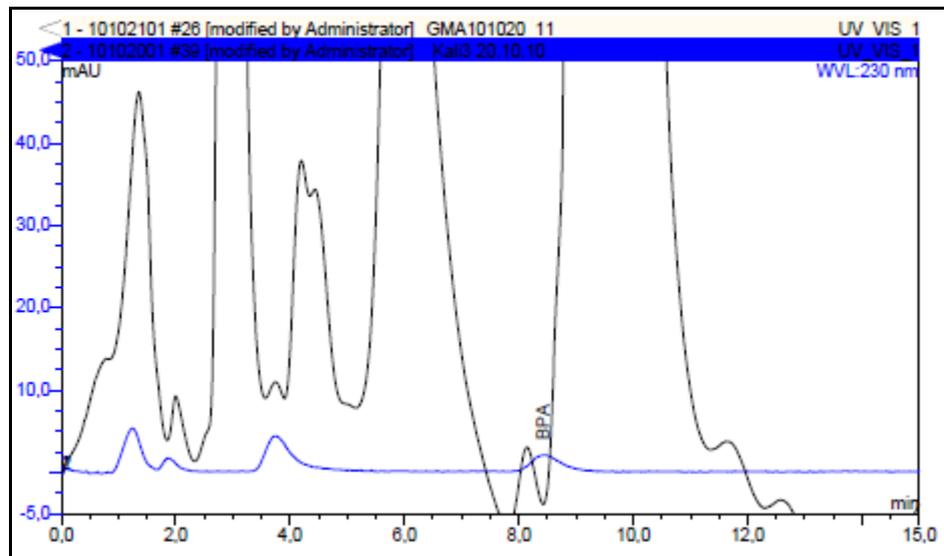


Abbildung 42: Überlagerte Chromatogramme GMA101020_11 = schwarze Kurve und STD Kal3 = blaue Kurve (100,7 ng/g; 88,9 ng/ml) der Diodenarraydetektion

In direktem Vergleich ist in Abbildung 42 kein Peak in der Retentionszeit für Bisphenol A zu erkennen.

4. Ergebnisse

4.1.7.5 Wiederfindungsprobe GMA101020_14

Das dotierte Bisphenol A wurde als Wiederfindungsprobe in ein Gefäß mit Wasser hinzugegeben und konnte in der Probe nachgewiesen werden (Abb. 43 und 44). Die Wiederfindungsrate für die Fluoreszenzdetektion lag bei 84,4 Prozent und bei 75,0 Prozent bei der Diodenarraydetektion.

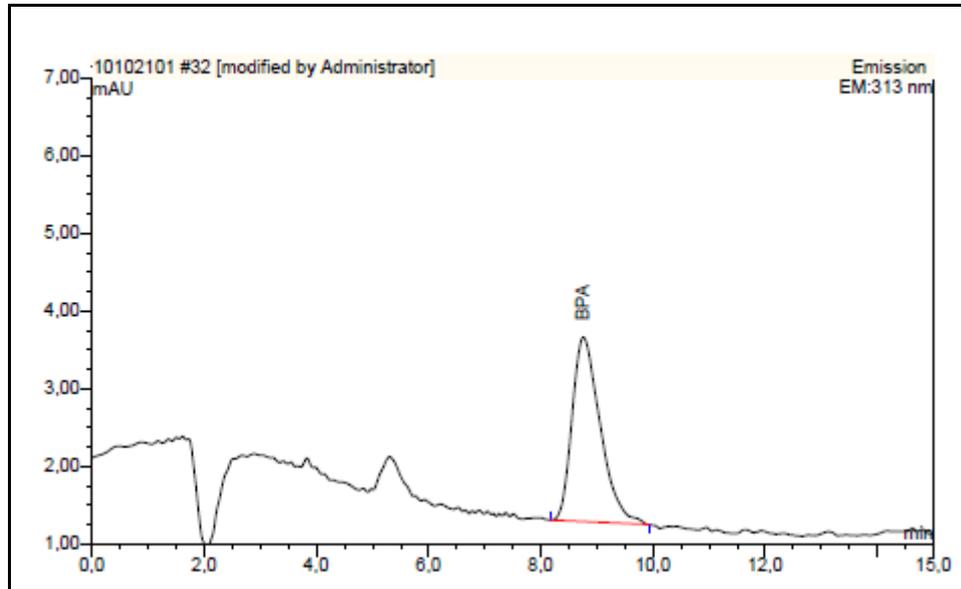


Abbildung 43: Chromatogramm der Wiederfindungsprobe GMA101020_14 der Fluoreszenzdetektion; Retentionszeitbereich = rot

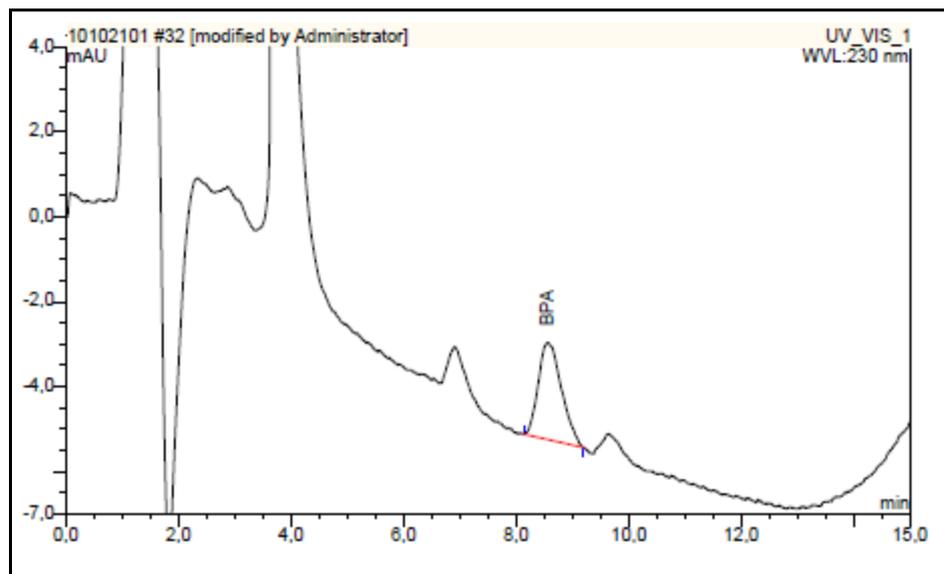


Abbildung 44: Chromatogramm der Wiederfindungsprobe GMA101020_14 der Diodenarraydetektion; Retentionszeitbereich = rot

4. Ergebnisse

4.1.7.6 Blindwertproben GMA101020_13 und GMA101020_15

Die Alufolie, die zur Herstellung der Proben diente (Probencode GMA101020_13), wurde auf ihren Bisphenol-A-Gehalt überprüft und diente zusammen mit einer reinen Wasserprobe aus Milli-Q-Wasser (Probencode GMA101020_15) als Blindwertprobe. Keine der beiden Blindwertproben, weder die Probe mit der Alufolie (Abb. 45 und 46) noch die Wasserprobe (Abb. 47 und 48), wiesen Kontaminationen mit Bisphenol A auf.

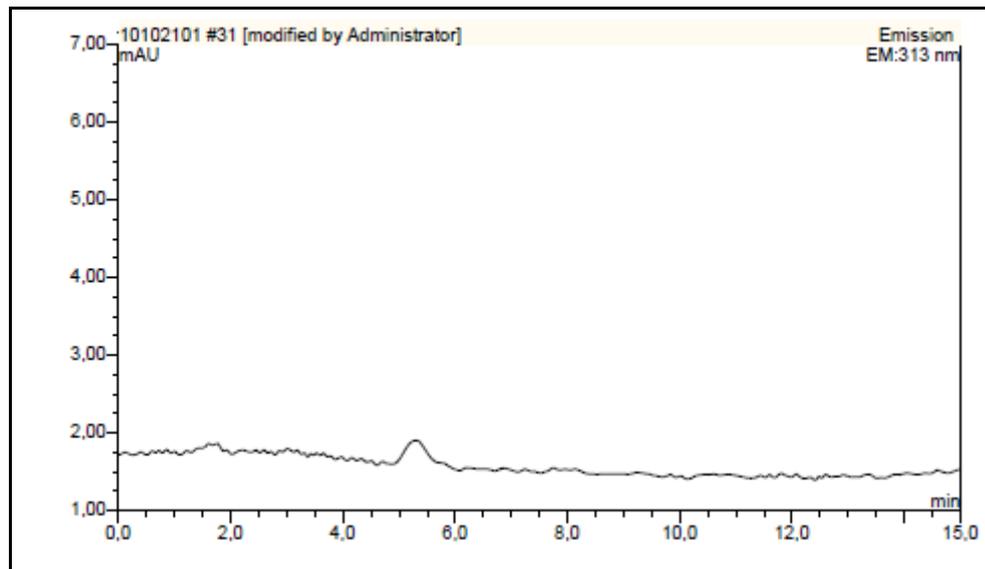


Abbildung 45: Chromatogramm der Blindwertprobe GMA101020_13 (Alufolie) der Fluoreszenzdetektion

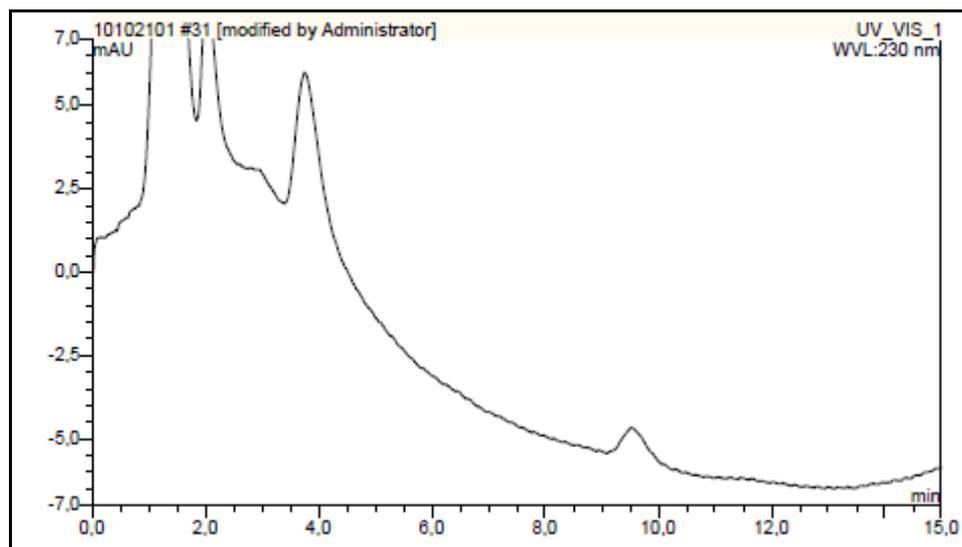


Abbildung 46: Chromatogramm der Blindwertprobe GMA101020_13 (Alufolie) der Diodenarraydetektion

4. Ergebnisse

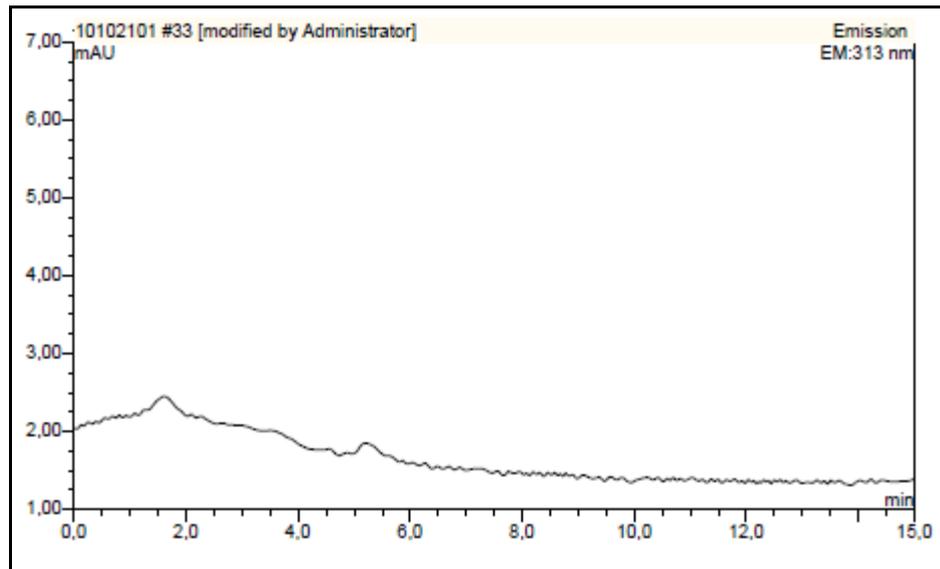


Abbildung 47: Chromatogramm der Blindwertprobe GMA101020_15 (Wasser) der Fluoreszenzdetektion

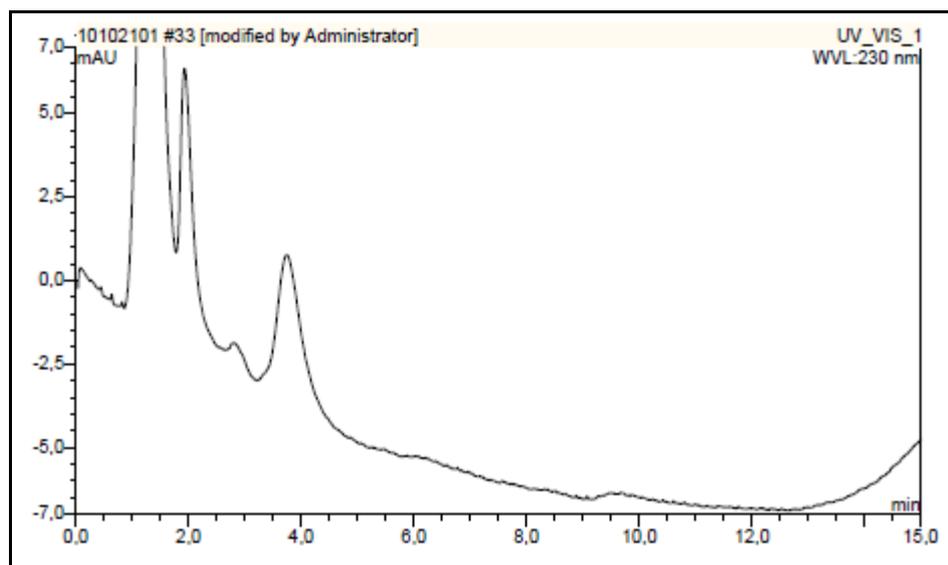


Abbildung 48: Chromatogramm der Blindwertprobe GMA101020_15 (Wasser) der Diodenarraydetektion

4.2 Standardaddition

4.2.1 Dotierte Probenextrakte

Bisphenol A wurde zu den Probenextrakten der einzelnen Versieglerproben in definierter Konzentration im relevanten Bereich zugegeben, um die Intensität des Bisphenol-A-Peaks zu ermitteln und eine Differenzierung von anderen Komponenten vornehmen zu können. Die Ergebnisse der Chromatogramme der dotierten Proben wurden mit den undotierten Probenextrakten und einer Standardlösung (nach Zugabe von dotiertem Bisphenol A) verglichen (Abb. 49, 50, 51, 52).

Tabelle 26: Bisphenol-A-Konzentration nach Standardaddition

Probencode	ng/g	ng/ml
GMA101118_01 (Probenextrakt von Fissurit F)	134,7	119,0
GMA101118_02 (Probenextrakt von Delton FS ⁺)	123,3	108,8
GMA101118_03 (Probenextrakt von Bis-GMA)	110,2	97,3
GMA101118_04 (Probenextrakt von TMXDI-Dimethacrylat)	133,4	117,8

Bei der Fluoreszenzdetektion konnte ein aus der Grundlinie des ursprünglichen Probenchromatogramms herausragender Bisphenol-A-Peak beobachtet werden (Abb. 49, 50, 51, 52). Um eine eindeutige Unterscheidung zu den Probenextrakten zu erhalten, reichte in der Diodearraydetektion die zugegebene Menge an Bisphenol A nicht aus.

Abbildung 49 überlagert die Probe Fissurit F (blaue Kurve), Fissurit F nach Standardaddition mit 20 ng Bisphenol A (schwarze Kurve) und die Kalibrierlösung (grüne Kurve). Das Chromatogramm der Kalibrierlösung (grüne Kurve) und der Dotierlösung (schwarze Kurve) weist einen Bisphenol-A-Peak bei einer Retentionszeit von 8,7 min auf.

4. Ergebnisse

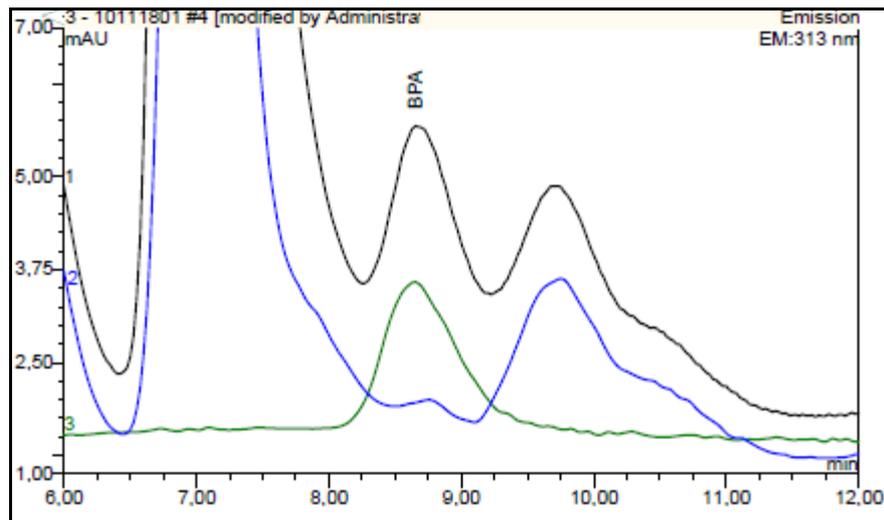


Abbildung 49: Fluoreszenzdetektion-Chromatogramme des dotierten Probenextraktes 101118_01 = schwarze Kurve mit 20 ng BPA, GMA101020_02 = blaue Kurve und Kal3 = grüne Kurve

Aus Abbildung 50 sind die Chromatogramme für die Versieglermasse Delton FS⁺ (blaue Kurve), der Dotierlösung nach Zugabe von 20 ng Standard Bisphenol A (schwarze Kurve) und der Kalibrierlösung (grüne Kurve) zu entnehmen.

Das blaue Chromatogramm (Delton FS⁺) der Abbildung 50 weist keinen Peak in der Retentionszeit für Bisphenol A auf. In dem Chromatogramm der Dotierlösung (schwarze Kurve) und bei der Kalibrierlösung (grüne Kurve) ist ein Peak im Sinne von Bisphenol A bei einer Retentionszeit von 8,7 zu erkennen.

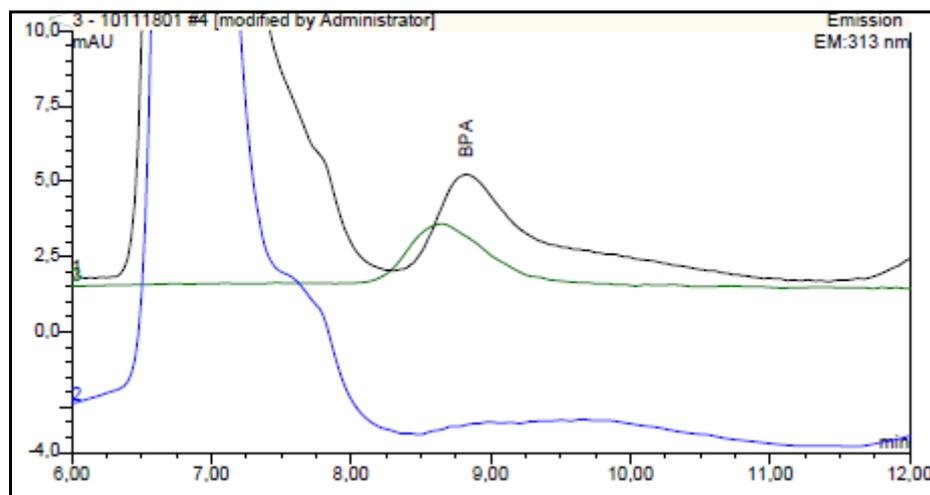


Abbildung 50: Chromatogramme des dotierten Probenextraktes 101118_02 = schwarze Kurve und GMA101020_05 = blaue Kurve und Kal3 = grüne Kurve der Fluoreszenzdetektion

4. Ergebnisse

In Abbildung 51 sind die Chromatogramme für die Probe mit Bis-GMA (blaue Kurve), das dotierte Probenextrakt nach Zugabe von 20 ng Bisphenol A (schwarze Kurve) und die Kalibrierlösung (grüne Kurve) übereinandergelegt.

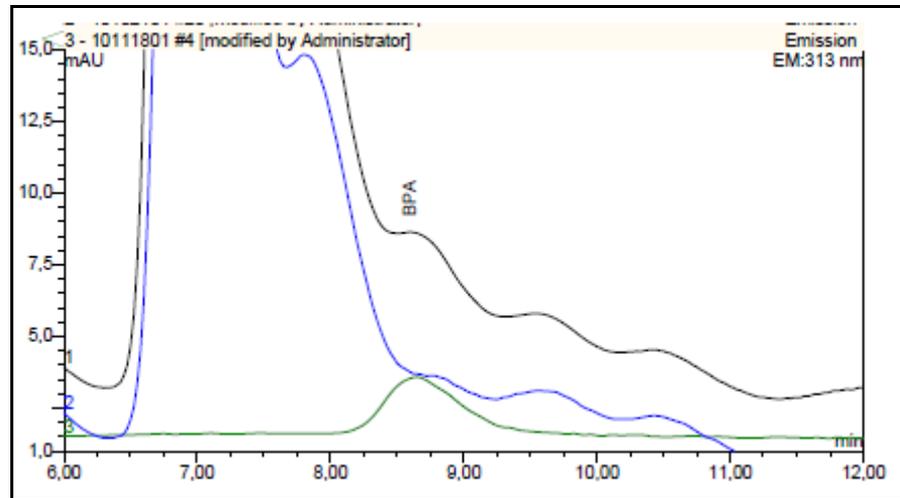


Abbildung 51: Chromatogramme des dotierten Probenextraktes 101118_03 = schwarze Kurve und GMA101020_08 = blaue Kurve und Kal3 = grüne Kurve der Fluoreszenzdetektion von Batch 10111801

Die Chromatogramme des dotierten Probenextraktes (schwarze Kurve) und Kalibrierlösung (grüne Kurve) weisen Peaks in der Retentionszeit für Bisphenol A auf. Aus dem Chromatogramm (blaue Kurve) für das Material ist kein Peak für Bisphenol A aus der Abbildung 51 zu entnehmen.

In Abbildung 52 sind die Chromatogramme für das Material TMXDI-Dimethacrylat (blaue Kurve), das dotierte Probenextrakt mit 20 ng Bisphenol A (schwarze Kurve) und die Kalibrierlösung (grüne Kurve) zum Vergleich überlagert.

4. Ergebnisse

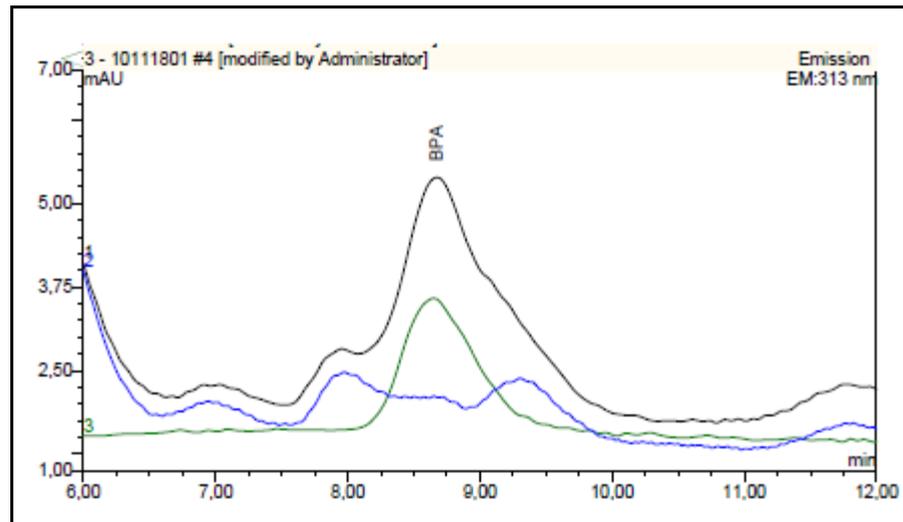


Abbildung 52: Chromatogramme des dotierten Probenextraktes 101118_04 = schwarze Kurve und GMA101020_11 = blaue Kurve und Kal3 = grüne Kurve der Fluoreszenzdetektion von Batch 10111801

Die Dotierlösung und die Kalibrierlösung wiesen einen Bisphenol-A-Peak auf (Abb. 52).

4.2.2 Wiederfindungsprobe der Dotierungsprobe und Blindwert

Um die Dotierungsprobe zu überprüfen, wurde bei einer zusätzlichen Probe die chromatographische Untersuchung durchgeführt. Standardisiertes Bisphenol A (20 ng) wurde der Wiederfindungsprobe (Standardaddition) hinzugegeben und mit einer Blindwertprobe verglichen. In der Wiederfindungsprobe konnte das dotierte Bisphenol A nachgewiesen werden. Die Wiederfindungsrate lag dabei für die Standardaddition (dotierte Proben) bei 101,2 % für die Fluoreszenzdetektion und 99,8 % bei Diodenarraydetektion.

4. Ergebnisse

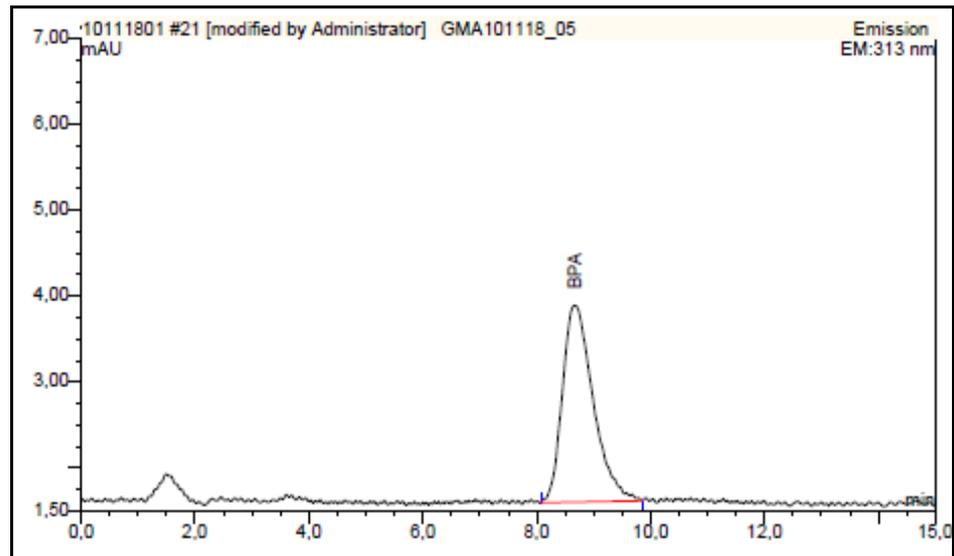


Abbildung 53: Chromatogramm der Wiederfindungsprobe GMA101118_05 der Fluoreszenzdetektion von Batch 10111801; Retentionszeitbereich = rot

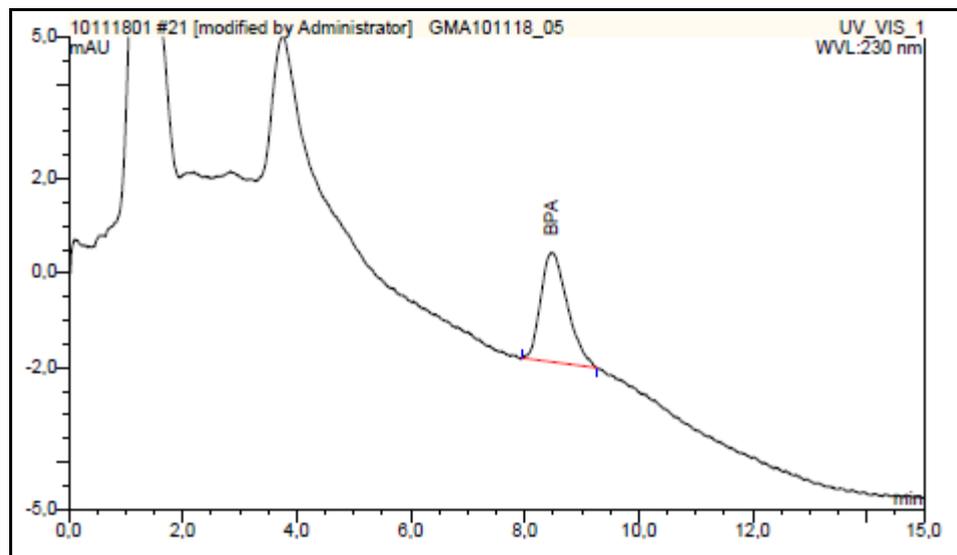


Abbildung 54: Chromatogramm der Wiederfindungsprobe GMA101118_05 der Diodenarraydetektion von Batch 10111801; Retentionszeitbereich = rot

Es konnte bei der Blindwertkontrolle des Ansatzes der Standardaddition kein Bisphenol A nachgewiesen werden.

4. Ergebnisse

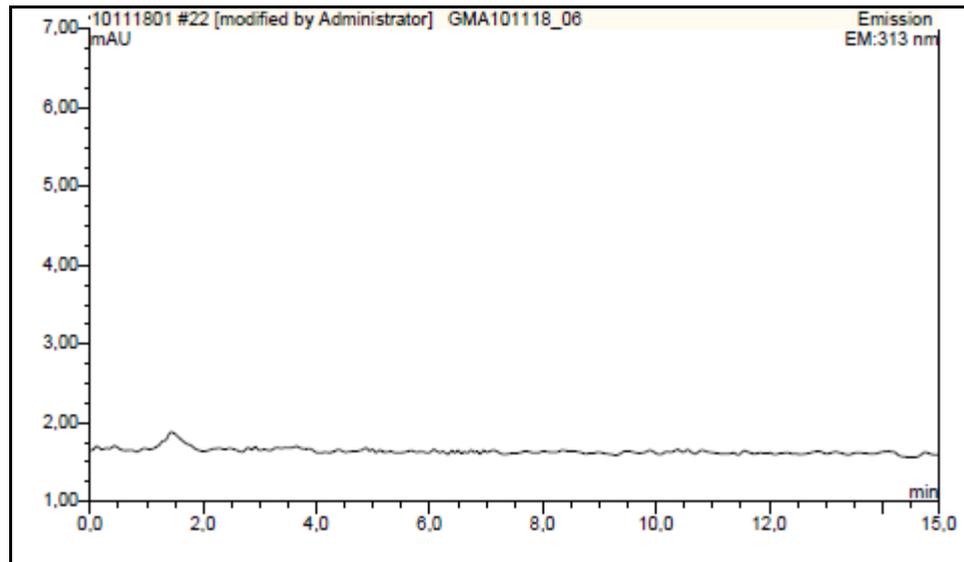


Abbildung 55: Chromatogramm der Blindwertprobe GMA101118_06 der Fluoreszenzdetektion von Batch 10111801

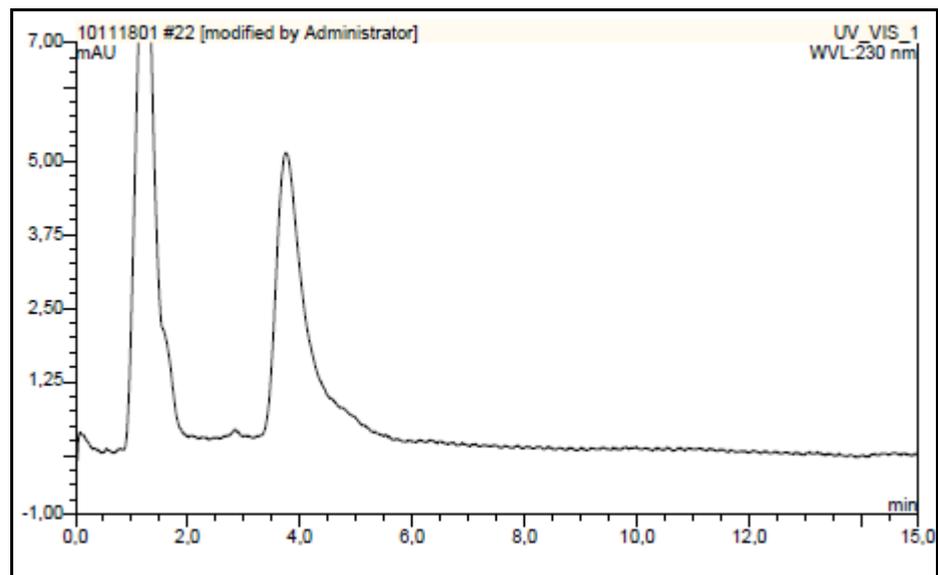


Abbildung 56: Chromatogramm der Blindwertprobe GMA101118_06 der Diodenarraydetektion von Batch 10111801

4.3 Vergleichsmessung mit HPLC-MS/MS

Die HPLC-MS/MS Messmethode zur Bestimmung des Bisphenol-A-Gehaltes wurde angewandt, um die Ergebnisse der HPLC-DAD/FLD Messungen abzusichern.

4. Ergebnisse

4.3.1 Kalibrierung

Die Bezugslösungen KAL2 bis KAL6 (32,1 ng/g bis 116,3 ng/g; 30,4 bis 110,3 ng/ml) wurden zur Berechnung der linearen Kalibrierfunktion des Arbeitsbereiches verwendet. Die Kalibrierungsgerade ergibt sich somit aus 10 Punkten und 5 verschiedenen Konzentrationsniveaus.

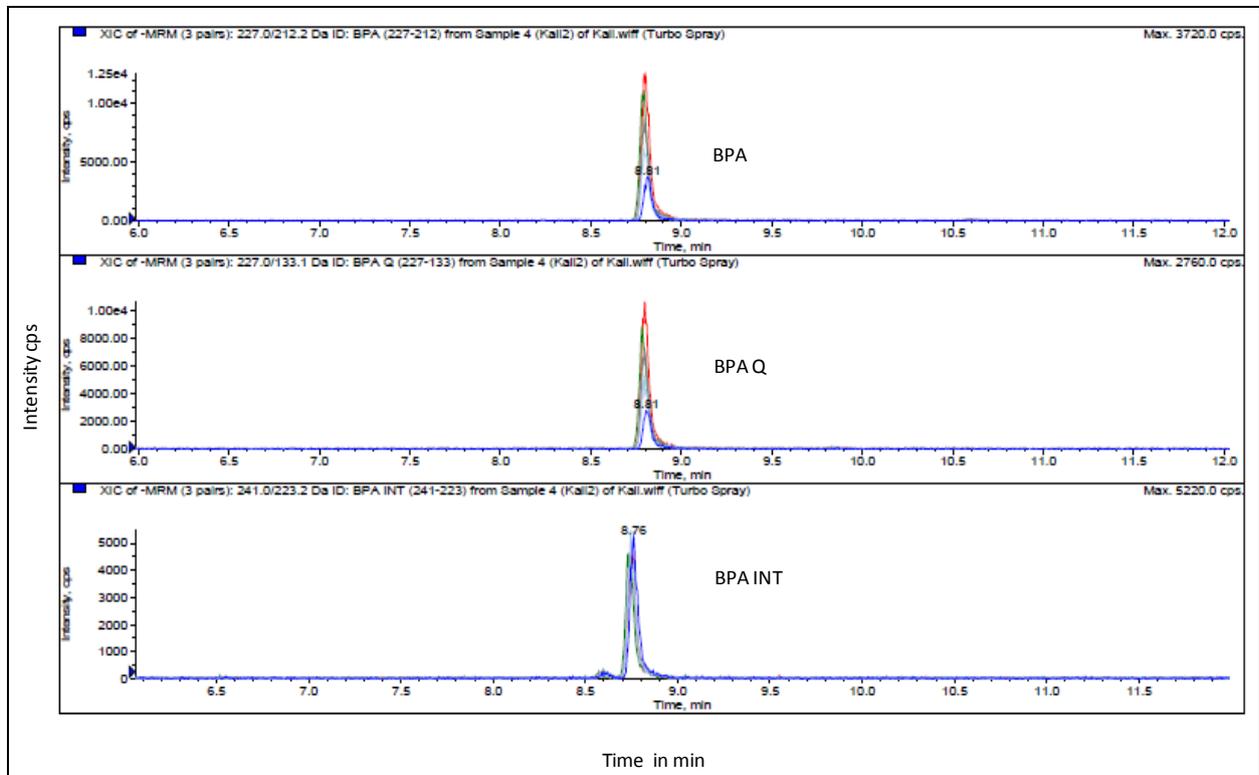


Abbildung 57: Overlay der Chromatogramme der Kalibrierlösungen Kal2 bis Kal6; Massenspuren Bisphenol A, BPA Q und BPA INT

Aus Tabelle 27 sind die Kenndaten der Kalibrierung HPLC-MS/MS zu entnehmen.

4. Ergebnisse

Tabelle 27: Kenndaten der Kalibrierungsgerade HPLC-MS/MS

Steigung a	1,2875
Achsenabschnitt b	0,022
Y Mittelwert	1,64
X Mittelwert	1,25
Korrelationskoeffizient r	0,9973
Reststandardabweichung S_y	0,054 S_y
Verfahrensstandardabweichung S_{x0}	0,042 S_{x0}
Rel. Verfahrensstandardabweichung V_{x0}	3,31 % V_{x0}

In Abbildung 58 ist die Kalibrierungsgerade MS/MS-Messung dargestellt.

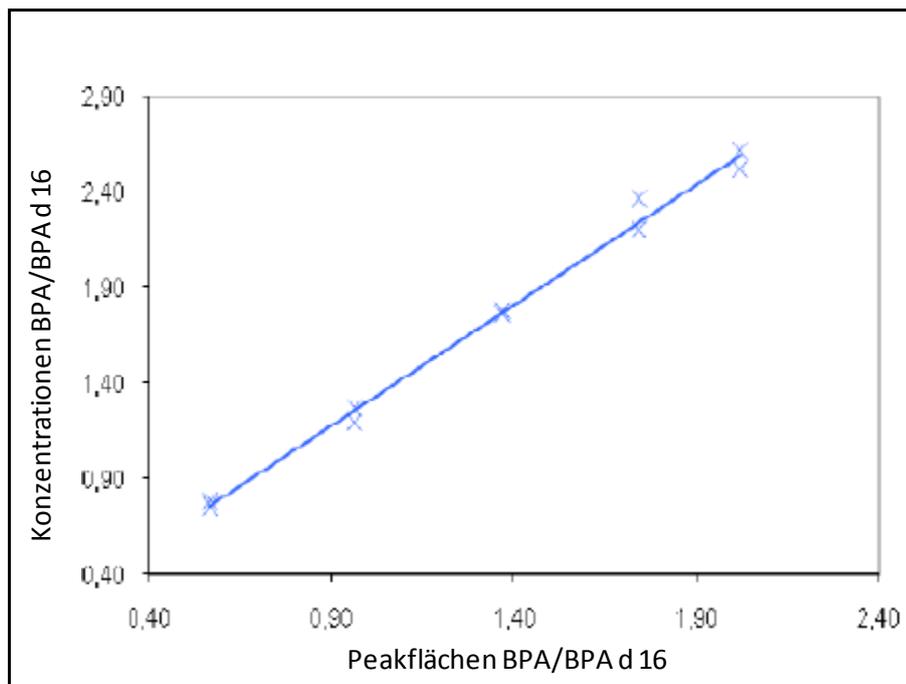


Abbildung 58: Kalibrierungsgerade MS/MS

Die Retentionszeit von Bisphenol A wurde aus den Messungen der Kalibrierungspunkte bestimmt.

4. Ergebnisse

Tabelle 28: Retentionszeit in Minuten der HPLC-MS/MS (n=10)

Streuungsmaße	BPA	BPA d16
Mittelwert	8,80	8,75
Standardabweichung	0,008	0,008
Varianzkoeffizient	0,09	0,10

4.3.2 Nachweisvermögen

Die Abschätzung des Nachweises von Bisphenol A für die HPLC-MS/MS-Messung erfolgte aus der Kalibrierungslösung KAL1. Die Standardlösung Kal1 (11,0 ng/g; 10,4 ng/ml) wies ein S/N von 16,5 beim Quantifizier-Ion und von 12,1 beim Qualifizier-Ion (Fragmente im Massenübergang) auf.

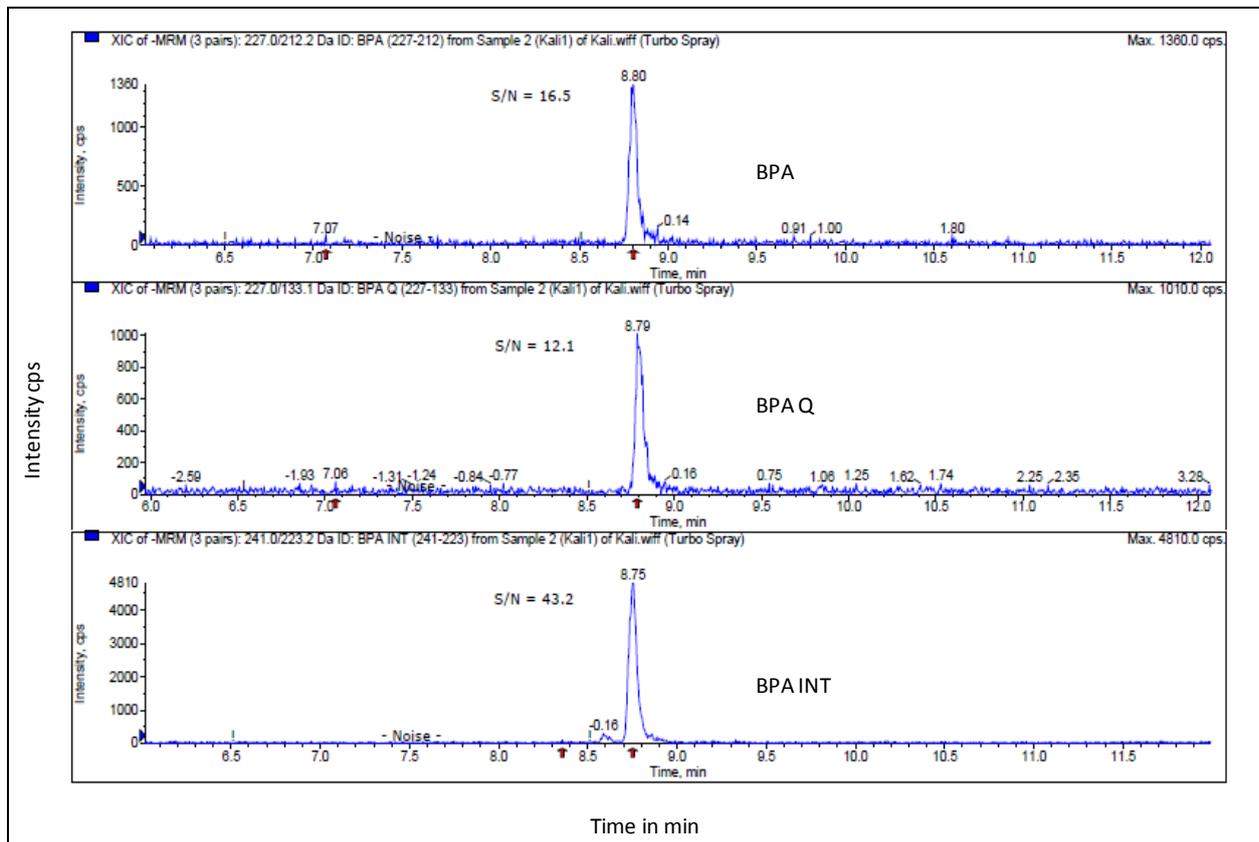


Abbildung 59: Chromatogramme der Standardlösung Kal1 (11,8 ng/g; 10,4 ng/ml) mit S/N, Massenspuren BPA, BPA Q und BPA INT

4.3.3 Versieglermasse Fissurit F; GMA101020_02

Die mittels HPLC-MS/MS gewonnenen Chromatogramme zeigten verschiedene Peaks.

4. Ergebnisse

Durch den Vergleich der Probenchromatogramme (Fissurit F) mit dem Chromatogramm der Standardlösung wurde die Anwesenheit des Bisphenol A untersucht (Abb. 60)

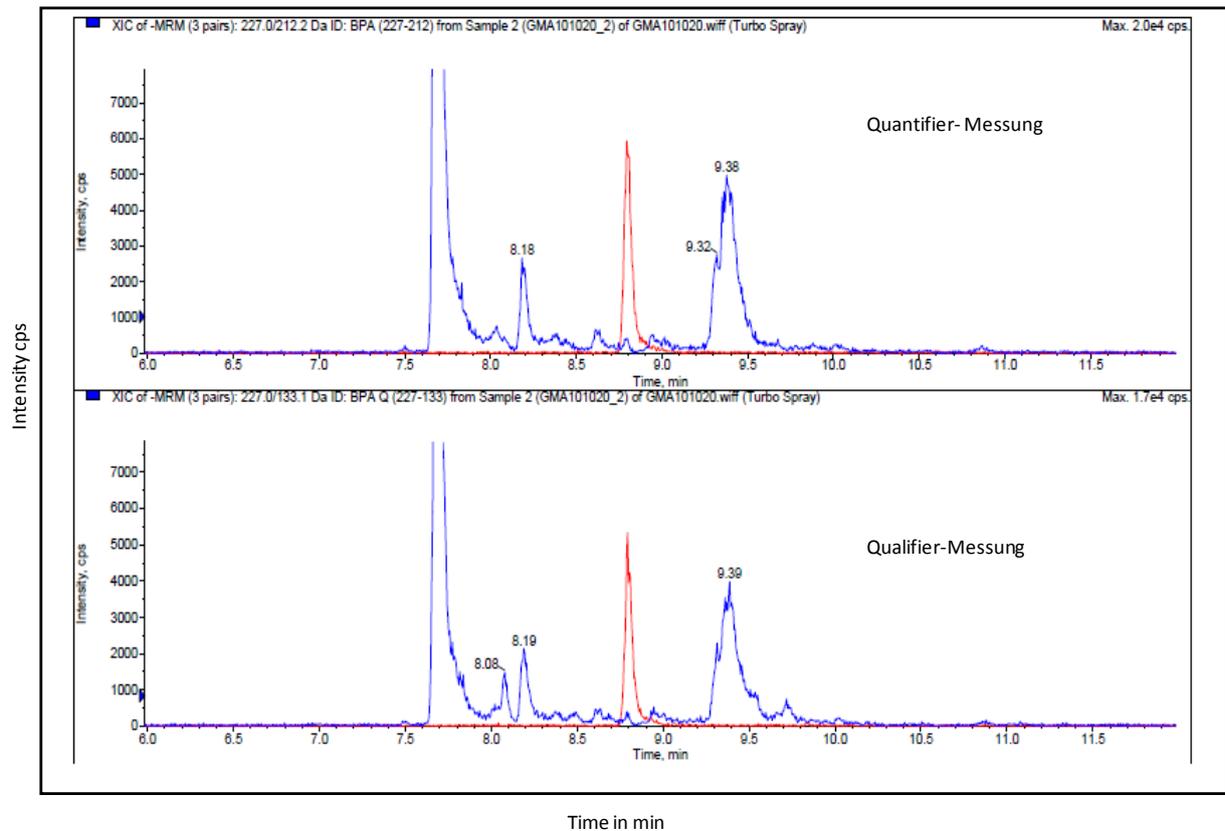


Abbildung 60: Chromatogramme BPA und BPA Q mit Overlay von GMA101020_02 und STD Kal3 (100,7 ng/g; 88,9 ng/ml); rot = Kalibrierlösung, blau = Versieglermasse

In Abbildung 60 ist im oberen Teil der Grafik die Quantifier-Messung und unten die Qualifier-Messung dargestellt. Beim Vergleich des Chromatogramms (Kalibrierlösung) und der Versieglermasse ist zu erkennen, dass das blaue Chromatogramm keinen Bisphenol-A-Peak aufweist. Bei den roten Chromatogrammen (Vergleichsreferenz für das blaue Chromatogramm; Versieglermasse) ist ein Peak im Sinne von Bisphenol A bei einer Retentionszeit von 8,8 min zu erkennen.

4. Ergebnisse

4.3.4 Versieglermasse Delton FS+; GMA 101020_05

In den Chromatogrammen wurden verschiedene Peaks detektiert.

Durch den Vergleich der Probenchromatogramme mit denen der Standardlösungen wurde die Anwesenheit von Bisphenol A überprüft.

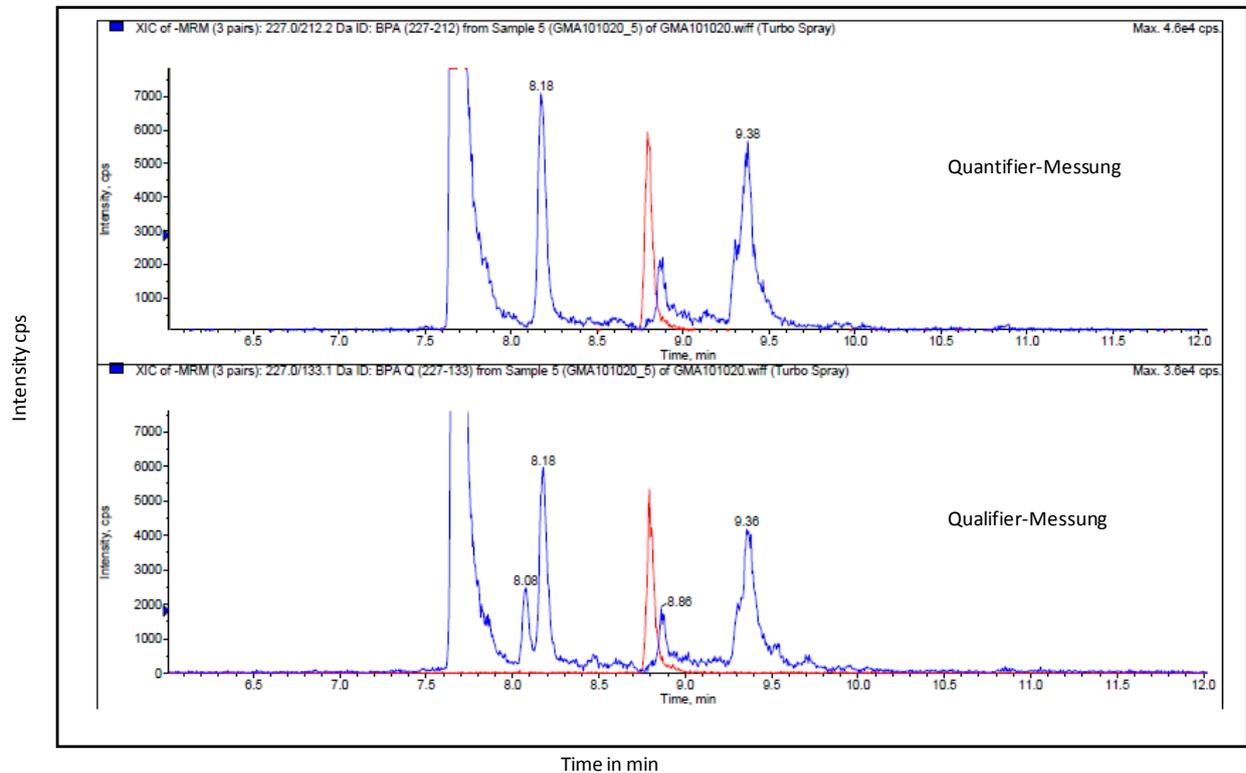


Abbildung 61: Chromatogramme BPA und BPA Q mit Overlay von GMA101020_05 und STD Kal3 (100,7 ng/g; 88,9 ng/ml); rot = Kalibrierlösung, blau = Versieglermasse

In dem oberen Abschnitt der Abbildung 61 ist die Quantifizier-Messung und im unteren die Qualifizier-Messung dargestellt. Bei der Retentionszeit von 8,7 min ist ein Peak im roten Chromatogramm und blauen Chromatogramm leicht versetzt bei 8,86 min zu erkennen. Aufgrund des starken Rauschens (kleines S/N-Quotient [Signal zu Rauschverhältnis]) ist keine eindeutige Aussage zum Bisphenol-A-Gehalt zu treffen. Die roten Linien sind eindeutig als Bisphenol A zu identifizieren.

4.3.5 Versieglermasse Bis-GMA; GMA101020_08

Im Chromatogramm wurden verschiedene Peaks detektiert. Durch den Vergleich der Probenchromatogramme mit denen der Standardlösungen wurde die Anwesenheit von Bisphenol A überprüft.

4. Ergebnisse

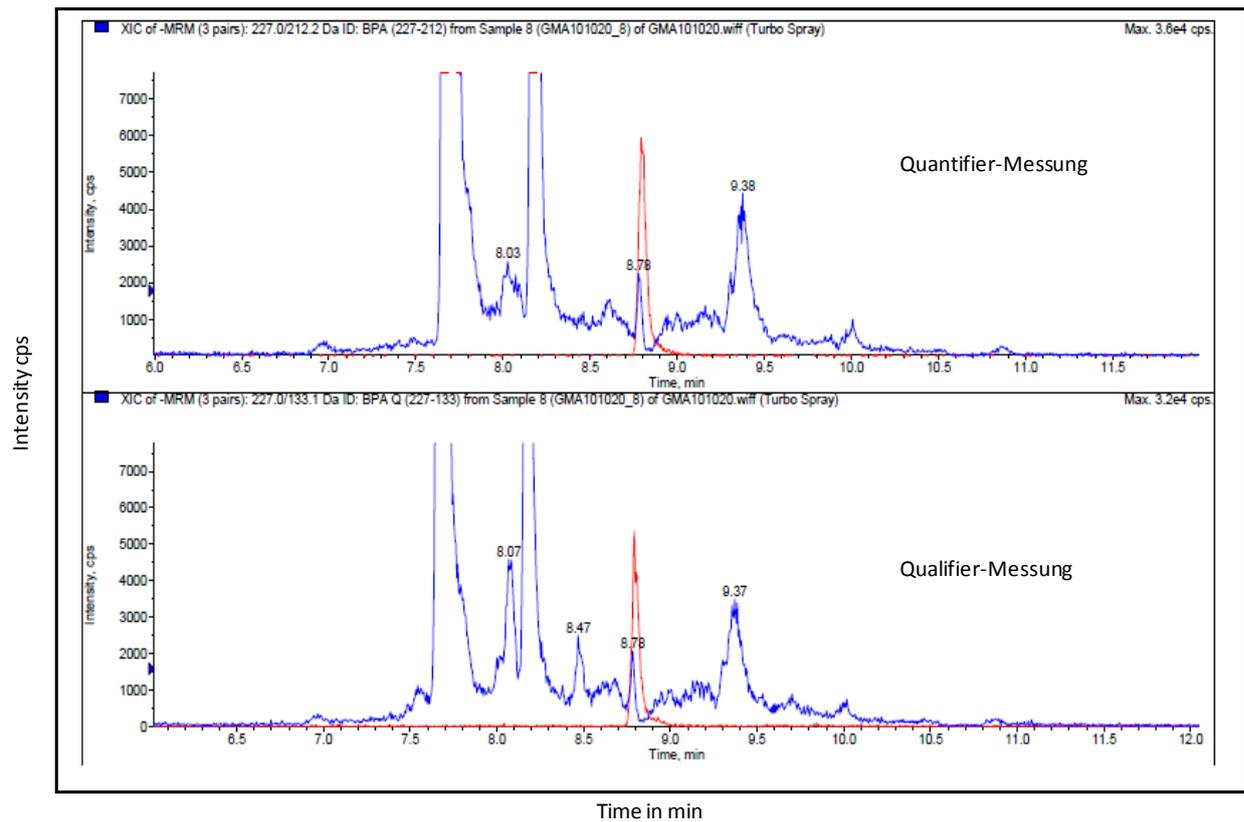


Abbildung 62: Chromatogramme BPA und BPA Q mit Overlay GMA101020_08 und STD Kal3 (100,7 ng/g; 88,9 ng/ml); rot = Kalibrierlösung, blau = Versieglermasse

In der Abbildung 62 ist im oberen Abschnitt die Quantifier und im unteren Abschnitt die Qualifier Messung dargestellt. Das blaue, sowie das rote Chromatogramm weisen bei der gleichen Retentionszeit bei 8,78 min einen Peak auf. Dieser Peak liegt in der Retentionszeit für Bisphenol A.

Da der Peak von Bisphenol A (Retentionszeit 8,7 min) in den Chromatogrammen des Versieglers bei beiden Massenübergängen (Quantifier und Qualifier) detektierbar war, erfolgte zur genaueren Überprüfung auf eine Übereinstimmung der Retentionszeiten von Bisphenol A ein Vergleich mit mehreren Standardlösungen (Abb. 63).

4. Ergebnisse

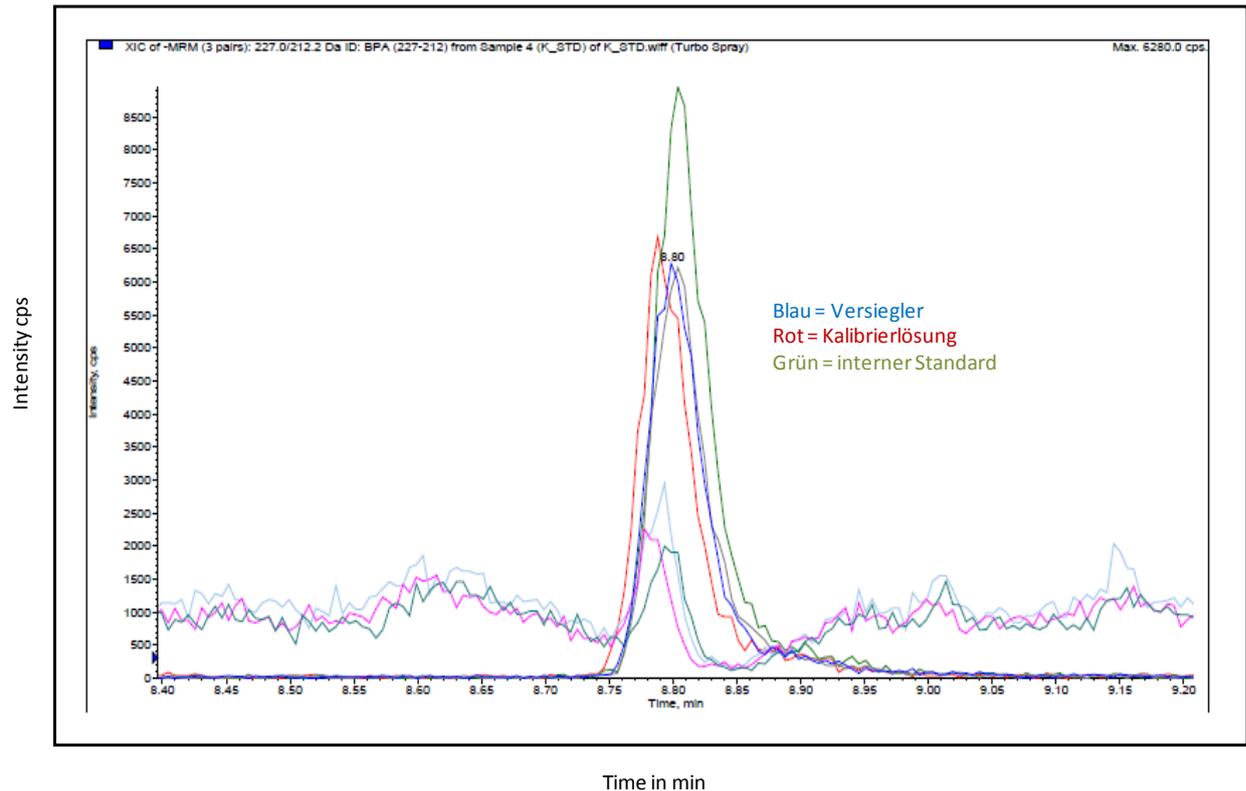


Abbildung 63: Chromatogramme BPA GMA101020_08, GMA101020_09 und GMA101020_10 sowie 4 Standardlösungen

Demnach kann der Peak der Bis-GMA-basierten Versieglermasse (Vergleichsmaterial) der Retentionszeit von Bisphenol A zugeordnet und in beiden MRM-Übergängen detektiert werden. Eine Quantifizierung des Bisphenol A ist aufgrund des geringen Signals, bei Rauschverhältnissen von ca. 1:5, nicht möglich.

4.3.6 Versieglermasse TMXDI-Dimethacrylat; GMA101020_11

Im Chromatogramm des HPLC-MS/MS wurden keine Peaks detektiert. Durch den Vergleich der Probenchromatogramme mit denen der Standardlösungen wurde die Anwesenheit von Bisphenol A überprüft (Abb. 64).

4. Ergebnisse

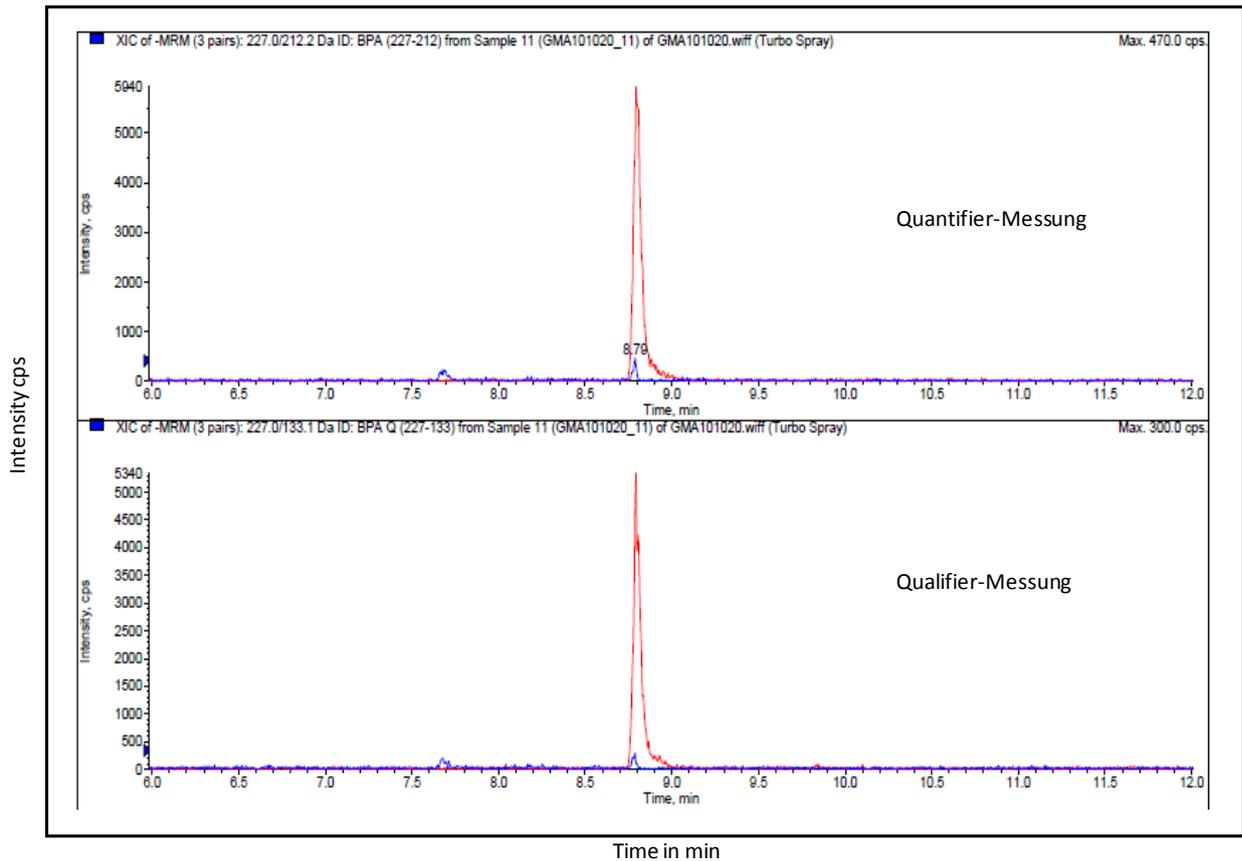


Abbildung 64: Chromatogramme BPA und BPA Q mit Overlay GMA101020_11 und STD Kal3 (100,7 ng/g; 88,9 ng/ml); rot = Kalibrierlösung, blau = Versieglermasse

Im oberen Abschnitt der Abbildung 64 ist die Quantifier-Messung und im unteren die Qualifier-Messung dargestellt. Das rote Chromatogramm zeigt einen eindeutigen Peak bei 8,7 min, der als Bisphenol A identifiziert werden kann. Bei der blauen Linie sind keine Bisphenol-A-Peaks zu erkennen.

4.3.7 Wiederfindungsprobe GMA101020_14

Das dotierte Bisphenol A konnte in der Wiederfindungsprobe nachgewiesen werden (Abb. 65).

4. Ergebnisse

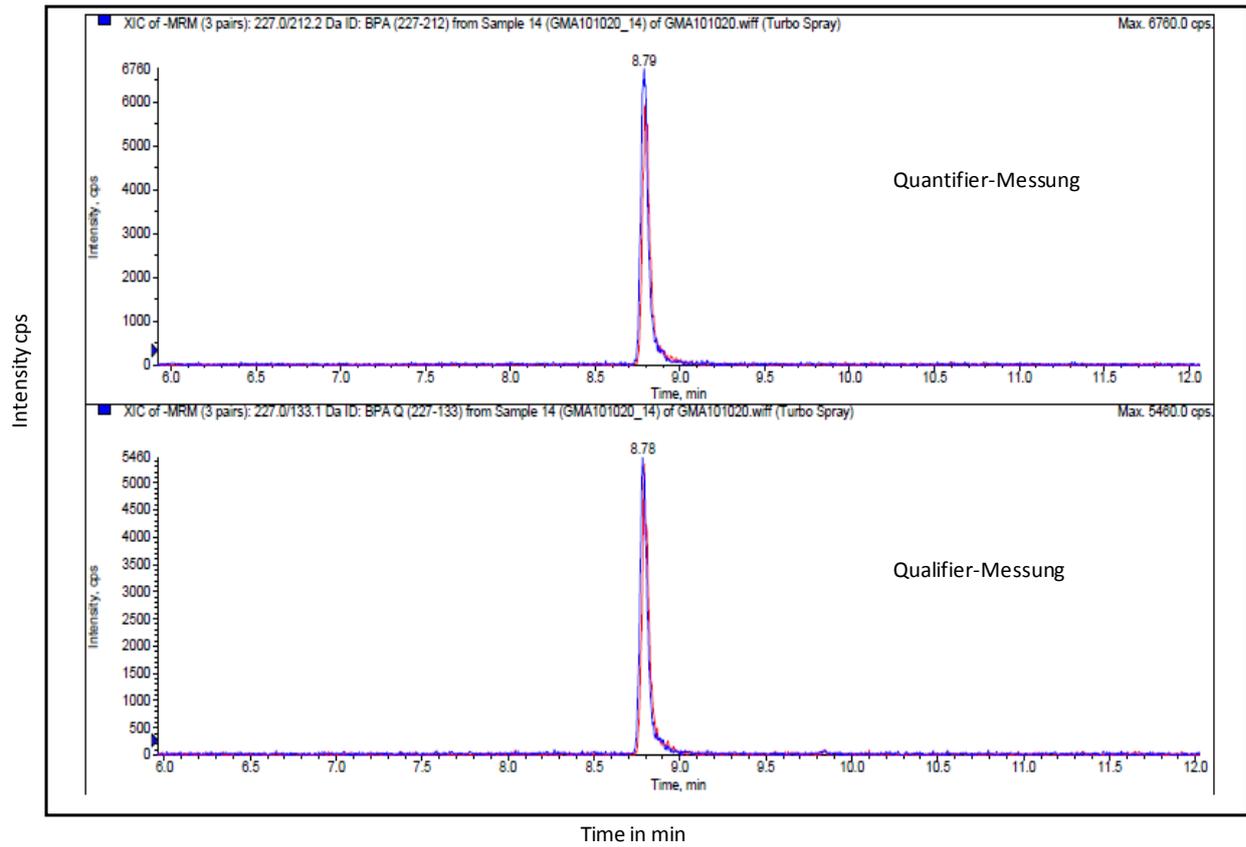


Abbildung 65: Chromatogramme BPA und BPA Q mit Overlay GMA101020_14 und STD Kal3 (100,7 ng/g; 88,9 ng/ml); rot = Kalibrierlösung, blau = Wiederfindungsprobe

4. Ergebnisse

4.3.8 Blindwertproben GMA101020_13 und GMA101020_15

Die Blindwertproben, die zur Herstellung der Probenkörper und Wasser, das als Migrationsmedium diente, wurden auf mögliche Bisphenol-A-Quellen hin untersucht. Keine der beiden Proben wies einen Bisphenol-A-Gehalt auf (Abb. 66 und 67).

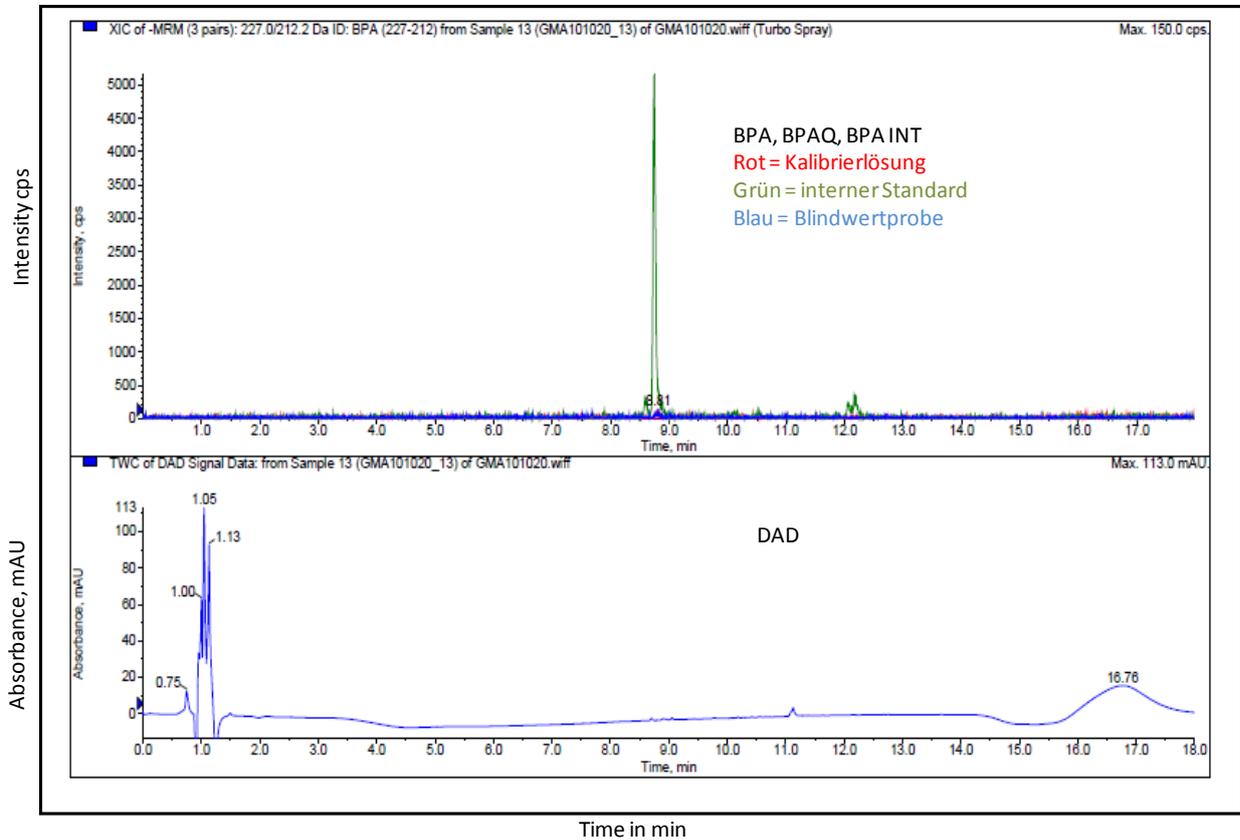


Abbildung 66: Chromatogramme von GMA101020_13 Blindwertprobe, Overlay Massenspuren BPA, BPA Q und BPA INT sowie Diodenarraydetektion

4. Ergebnisse

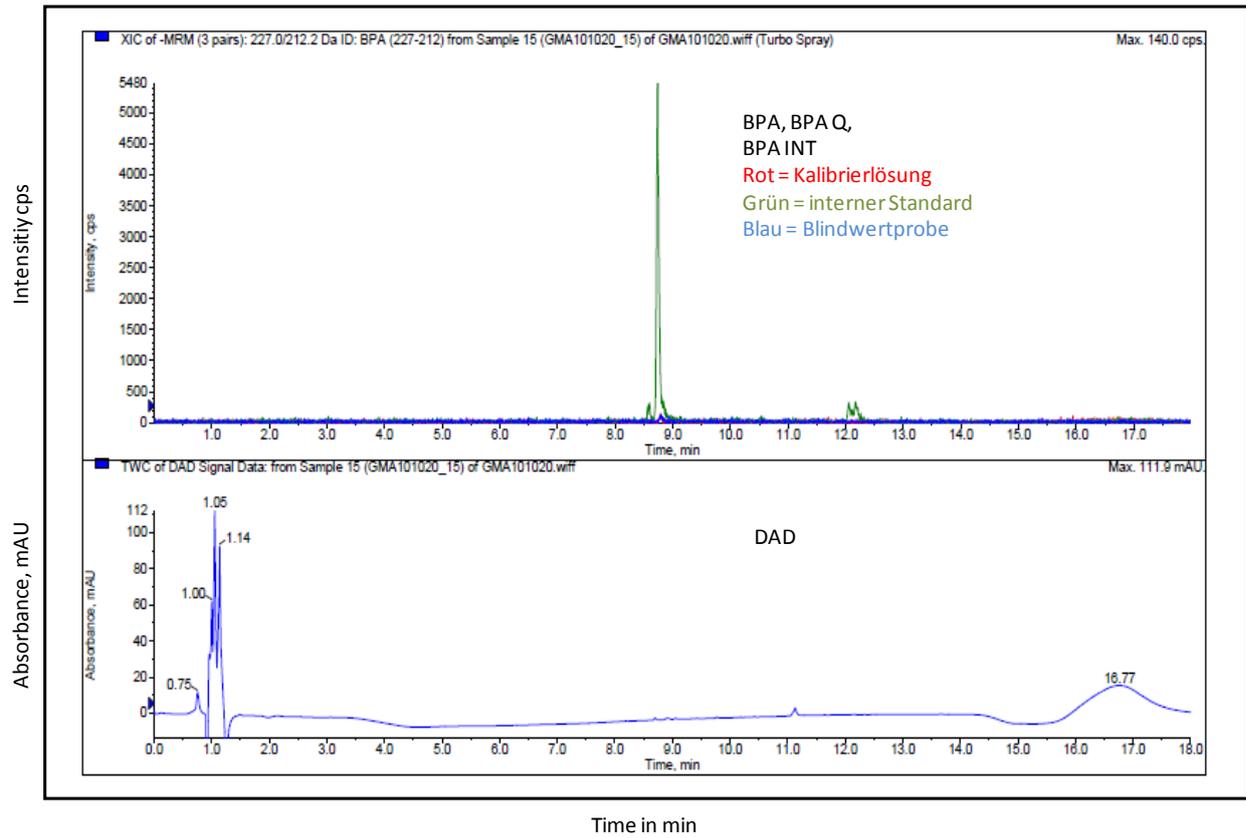


Abbildung 67: Chromatogramme GMA101020_14 Blindwertprobe, Overlay Massenspuren BPA, BPA Q und BPA INT sowie Diodenarraydetektion

5 Diskussion

5.1 Diskussion der untersuchten Materialien

Die Materialien (Fissurit F und Delton FS⁺), die Bestandteil der Untersuchung waren, wurden aus zwei unterschiedlichen Preiskategorien ausgewählt. Die Untersuchung beschränkte sich auf Fissurenversiegler, da bei diesen aufgrund des geringeren Füllkörpergehalts im Vergleich zu dentalen Kompositen für die Füllungstherapie mit einer vermehrten Umsetzung der Monomere zu Bisphenol A zu erwarten ist. Beide untersuchten Fissurenversiegler basieren auf Bis-GMA. Als Negativ-Kontrolle diente ein Bis-GMA freies Material, das TMXDI-Dimethacrylat, und als Positiv-Kontrolle ein Kunststoff auf Bis-GMA-Basis. Beide Materialien wurden direkt von der Firma Ivoclar Vivadent bezogen und sind nicht auf dem freien Markt verfügbar.

Der Versiegler Delton wurde in zahlreichen Studien untersucht [6,31,46,76,84]. Diese Studien unterscheiden sich von der vorliegenden Arbeit hinsichtlich der Zusammensetzung des Versieglers. Sie untersuchten den Fissurenversiegler Delton LC von der Firma Dentsply auf Bis-DMA Basis.

Die Auswahl der Materialien beschränkte sich in der vorliegenden Arbeit somit auf Bis-GMA-basierte Versiegler, die derzeit auf dem Markt befindlich sind.

5.2 Diskussion der Methode

5.2.1 Probenherstellung

Aus zwei unterschiedlichen Fissurenversiegelungsmaterialien und zwei Kontrollproben wurden nach Herstellerangaben jeweils pro Material 21 Formkörper für 3 Probendurchläufe hergestellt. Die Formkörper wurden für jedes Material in drei Probenserien mit jeweils 7 Probenkörpern ($n=7$) für jede Serie unterteilt. Die Probenkörper sollten zur Gewährleistung der Migration von Bisphenol A eine Mindestmasse von 1,5 g besitzen, die bei insgesamt 7 Probenkörpern für eine Serie gegeben ist. Die von den Herstellern geforderte Polymerisationszeit von mindestens 20 Sekunden wurde eingehalten. Da die Größe der Probenkörper 3 mm x 8 mm beträgt, wurden diese beidseitig mit einer LED-Lampe für jeweils 40 Sekunden ausgehärtet um eine genügende Polymerisationstiefe zu erreichen. Nach Herstellerangaben beträgt die Polymerisationstiefe für die getesteten Materialien 3 mm. Durch die Aushärtung von beiden Seiten sollte ein ausreichender Polymerisationsgrad erreicht werden. Die Lichtleistung der Polymerisationslampe betrug 1.000 mw/cm². Zur Untersuchung von zytotoxischen Effekten von dentalen Kunststoffen applizierten Schweikl et al. den Komposit ebenfalls in einen Glasring mit einer Größe von 5 mm x 2,5 mm und härteten die Probenkörper mit einer Polymerisationslampe (Lichtleistung = 780

5. Diskussion

mW/cm²) aus [88]. Pulgar et al. polymerisierten die Probenkörper mit einer Schichtdicke von 1 mm, in einem kleinen Glaszylinder für 40 Sekunden [76]. Polymerisationslampen mit höherer Lichtleistung erzielen einen höheren Polymerisationsgrad. Dadurch verbessern sich die mechanischen Eigenschaften der Materialien, jedoch kommt es zu größeren Polymerisationsschrumpfungen [74]. Dies könnte eine Erklärung für die deutliche Schrumpfung der Proben mit dem Material Fissurit F darstellen. Um eine Kontamination zu vermeiden, wurden die Proben direkt in die Gefäße für den Migrationsversuch überführt. Die Probenherstellung fand in der Zahnklinik der Charité statt und bis zum Beginn der Migration bei der BAM wurden die Formkörper in den Glasbehältern, in der die Migration stattfand, trocken gelagert. Am nächsten Tag wurde den Gefäßen, in denen sich die Probenkörper befanden, jeweils 20 ml doppelt entionisiertes Wasser hinzugegeben und bei Raumtemperatur für 24 Stunden in einem Horizontalschüttler in Bewegung gehalten. Nach einer 24-stündigen Migration wurden die Extrakte aufgearbeitet und auf ihren Bisphenol-A-Gehalt geprüft. Die Aufarbeitung der Probenlösungen erfolgte mittels einer Flüssig-Flüssig-Extraktion.

5.2.2 Prüfkörpergeometrie

Die Herstellung der Prüfkörper erfolgte in einem Glasring mit einem Durchmesser von 8 mm und einer Höhe von 3 mm. Somit ergibt sich eine Prüfkörpergeometrie in der Größe des formgebenden Glasring. Die Formkörper besitzen im Verhältnis zur Oberfläche ein relativ großes Volumen. Es muss jedoch zur Diskussion gestellt werden, ob die Oberfläche eine größere Relevanz für die Abgabe von Bisphenol A darstellt oder aber die Masse der Prüfkörper ausschlaggebend ist. Es stellt sich daher die Frage, ob sich die Eigenschaften der Prüfkörper bezüglich der Degradation bei größerer Oberfläche verändern. Es wäre zu vermuten, dass bei steigender Angriffsfläche die Umsetzung von Bis-GMA in Bisphenol A erhöht sein kann.

Es bestanden Gewichtsunterschiede der Prüfkörper von ca. 1 g (siehe Tabelle 25) zwischen dem Material Fissurit F und den anderen Fissurenversiegelungsmaterialien. Diese Schwankungen sind mit der Auskleidung des Glasringes (Alufolie) zu erklären. Da die Folie eine natürliche Spannung und im Glasring die Tendenz besitzt wieder zusammenzurollen, ist es denkbar dass dadurch Differenzen in der Masse entstanden sind. Außerdem ist eine weitere Ursache in der unterschiedlichen Dichte der einzelnen Materialien zu vermuten. Nach Herstellerangaben ist Delton FS⁺ ein bis zu 55 % glasgefüllter Versiegler und die relative Dichte beträgt laut Sicherheitsdatenblatt 1,3 g/cm³. Der Füllstoffgehalt bei Fissurit beträgt ca. 10 % und die Dichte ist laut Herstellerangaben nicht bestimmt. Bei der Herstellung der Prüfkörper war bei dem Material Fissurit F eine deutlichere Schrumpfung zu erkennen als bei den anderen drei Materialien. Um die Polymerisationsschrumpfung zu minimieren, sollte der Versiegler schichtweise ausgehärtet werden. Die Masse, die zur Herstellung der Probenkörper benutzt wurde, entspricht nicht der

5. Diskussion

klinisch angewandten Menge zum Versiegeln der Fissuren und somit sollte die Polymerisationszeit angepasst oder das Material schichtweise appliziert und polymerisiert werden. Außerdem ist zu diskutieren, ob eine flachere und dünnere Schicht der Probenkörper von ca. 1 mm (entsprechend der Fissurentiefe) mit größerem Durchmesser zu geringerer Polymerisationschumpfung führt. In einer klinischen Untersuchung konnte gezeigt werden, dass bei Fissurit F deutliche Lufteinschlüsse an der Oberfläche nach Applikation entstehen können, wobei sich keine signifikanten Unterschiede zwischen absoluter (unter Kofferdam) und relativer Trockenlegung (Watterollen) ergaben [32]. Dies kann ebenfalls ein Grund für die geringere Masse der Probenkörper von Fissurit F darstellen.

5.2.3 Untersuchungsmethode

Zur Qualitätssicherung des Arbeitsablaufes wurden jegliche Flaschen der Lösemittel an ihrer Originalverpackung unmittelbar vor den Messungen angebrochen und die Herstellung neuer Standardlösungen erfolgte durch Einwaage der Referenzsubstanzen (BPA-Kalibrierung, BPA-Kontrollstandard, BPA d16 interner Standard, siehe Tabelle 8) und entsprechende Verdünnungen. Da die Gravimetrie die einzig rückführbare Größe in der analytischen Chemie ist, erfolgten die Berechnungen der Verdünnungen gravimetrisch. Zu jeder Messung wurden Vergleichsmessungen mit Blindwertproben durchgeführt, um eine mögliche Kontamination mit den Chemikalien oder auch durch die Geräte, die zur Herstellung oder Prüfung der Proben dienten (siehe Tabelle 3 und Tabelle 5), ausschließen zu können. Die Ergebnisse der Blindwertproben der Fluoreszenz- und Diodenarraydetektion (Abbildungen 21-24, 45-48 und 55-56) zeigten keine Kontamination mit Bisphenol A. Die Ergebnisse der Blindwertproben der HPLC sind aus den Abbildungen 66 und 67 ersichtlich. Die Richtigkeit aller Ergebnisse wurde mit Wiederfindungsmessungen bestätigt. Alle Wiederfindungsproben (Abbildungen 15, 16, 19, 20, 43 und 44) haben Bisphenol A nachgewiesen. Dies bestätigt das Nachweisvermögen der angewandten Methode.

Die Richtigkeit der Methode wurde mittels Kontrollstandards (Standard-Bisphenol A) überprüft. Ein deuterierter Standard¹ wurde als interner Standard für die massenspektrometrische Messung eingesetzt. Dieser interne Standard ist somit Isotopen-markiert und kann als solcher in der HPLC Messung detektiert werden.

Es wurden Kalibrierungschromatogramme (Abbildungen 13, 14, 17 und 18) der Diodenarray- und Fluoreszenzdetektion mit standardisiertem Bisphenol A angefertigt. Die Chromatogramme (Abbildungen 13 und 14) dienen zusammen mit der Vergleichsmessung (n=4) eines unabhän-

¹ Das heißt, die Wasserstoffatome des Bisphenol A wurden durch Deuterium ersetzt, wodurch die Molekülmasse verändert wird.

5. Diskussion

gigen Kontrollstandards zur Kontrolle der Richtigkeit der Kalibrierung. Die systematische Differenz von 0,3 min zwischen den Chromatogrammen der Kalibrierlösung und des Kontrollstandards (Abb. 13 und 14) ist verursacht durch das verwendete Lösemittel in der Standardlösung. Es konnte eine Wiederfindung bei der Kalibrierung (Tabelle 23) für die Fluoreszenzdetektion von 112,3 % und für die Diodenarraydetektion von 112,6 % ermittelt werden. Die Wiederfindungen können bedingt durch das Messverfahren auch über 100% liegen. Die Grenzwerte für die Wiederfindung liegen bei 120 %. Ein Mindestwert von 70 % ist für die Wiederfindung angemessen [13].

Die restlichen Chromatogramme der Kalibrierung (Abbildungen 17 und 18) dienen zum Ermitteln von Bisphenol A aus den Versiegelungsmaterialien. In den Abbildungen 57 und 59 sind die Kalibrierungschromatogramme der HPLC Messung zu erkennen.

Die Bestimmung des Bisphenol-A-Gehaltes aus den Fissurenversiegelungsmaterialien erfolgte in Anlehnung an die Europäische Norm EN 14372:2004 (E) „Child use and care articles - Cutlery and feeding utensils - Safety requirements and tests“ zur Bestimmung von Bisphenol A aus Nahrungsmittelbehältnissen. Die Trennung der Substanzen erfolgte nach der Empfehlung dieser Europäischen Norm mit Hilfe einer Hochleistungsflüssigkeitschromatographie und anschließender Detektion mittels UV- und Diodenarraydetektor. Die Angaben zur Herstellung der Kalibrierlösungen und Standardlösungen sind der EU-Norm zu entnehmen. Als alternative Testmethode ist die Gaschromatographie zu erwähnen. Jedoch besitzt die HPLC den Vorteil, dass bei diesem Testverfahren keine Derivatisierung notwendig ist [27].

Im ersten Probendurchlauf erfolgte die Detektion mittels UV- und Diodenarraydetektor. Da aufgrund sehr vieler unterschiedlicher Peak-Signale kein sicherer Nachweis von Bisphenol A erbracht werden konnte, wurde anschließend eine weitere Untersuchung mit dem Massenspektrometer durchgeführt. Das Messverfahren mit dem Massenspektrometer hat eine höhere Trennleistung und besitzt eine bessere Selektivität als die vorher angewandten Messmethoden, die Fluoreszenz- und Diodenarraydetektion [49,62].

Zur Detektion von Bisphenol A wurden mit dem Diodenarraydetektor zwei Wellenlängen aufgenommen. Die erste Wellenlänge von 230 nm stellte das UV-Maximum der Komponente dar und die zweite diente bei 280 nm im zweiten UV-Maximum der Plausibilitätskontrolle [9]. Zur Quantifizierung von Bisphenol A durch UV-Detektion mittels Fluoreszenzdetektion wurde die Wellenlängenschaltung aus EN14374 übernommen. Im Massenspektrometer wurden zwei Massenübergänge aufgenommen. Der erste diente zur Quantifizierung und der zweite zur Absicherung der richtigen Identifizierung der Analyten [9]. Die Ergebnisse wurden mit den Chromatogrammen von Standardlösungen auf ihre Richtigkeit bzw. auf die Anwesenheit von Bisphenol A verglichen.

5. Diskussion

Da auch in der Testreihe mit massenspektrometrischer Detektion kein Bisphenol A aus den Proben nachweisbar war, wurde ein Wiederfindungsversuch durchgeführt. Dabei wurde ein deuterierter Standard (CDN Isotopes, Artikelnummer D-2151) an Bisphenol A zu den Probenlösungen hinzugegeben und anschließend die Bisphenol-A-Anwesenheit bestimmt. Die Vermutung, dass ein Nachweis von Bisphenol A aufgrund verschiedener Störgrößen durch Migration anderer Substanzen nicht möglich ist, konnte mit dem Nachweis von zugegebenem Standard-Bisphenol-A widerlegt werden. Nach Zugabe von standardisiertem Bisphenol A konnte im Rahmen des Wiederfindungsversuches das Bisphenol A detektiert werden.

Die angewandte Methode stellt eine Standardmethode zum Nachweis von Bisphenol A dar [6,7,31,66,71,76,84]. In der vorliegenden Arbeit wurden zur Absicherung der Ergebnisse unterschiedliche Methoden zur Detektion des Bisphenol A in der Probenlösung angewandt. Beginnend mit der Diodenarraydetektion wurden die Messungen mit der Fluoreszenzdetektion und der HPLC-Detektion ergänzt. Die HPLC-MS/MS Messung besitzt dabei die höchste Selektivität und Spezifität, da bei diesem Verfahren eine Fragmentierung und Trennung nach der Molekülmasse erfolgt [12].

5.2.4 Migrationsmedium

Eine vergleichbare Studie stellt die Untersuchung von Fissurenversiegelungsmaterialien auf Bis-GMA-Basis von Pulgar et al. dar [76]. Sie lagerten die Probenkörper für 24 Stunden in destilliertem Wasser und untersuchten die Proben anschließend mittels Gaschromatographen mit anschließender massenspektrometrischer Detektion und Hochleistungsflüssigkeitschromatographen mit UV-Detektion. In der Arbeit von Pulgar et al. wurden die Proben zu Beginn des Migrationsversuches kurz stark gerüttelt. In der vorliegenden Untersuchung waren die Proben während der Lagerungsdauer ständig in Bewegung. Ein weiterer Unterschied zwischen der hier vorliegenden Studie und der In-vitro-Untersuchung von Pulgar und Mitarbeitern liegt in der unterschiedlichen pH-Wert-Einstellung. Während die Autoren pH-Werte von 1, 7, 9 und 12 einstellten, erhöhte sich die Bisphenol-A-Abgabe mit steigendem pH-Wert.

Atkinson et al. [7] lagerten Standardlösungen von Bisphenol A, Bis-DMA (Bisphenol-A-Dimethacrylat) und TEGDMA (Triethylenglycoldimethacrylat) in Ruhespeichel von 10 Probanden, die keine Kunststoffüllungen aufwiesen und veränderten die Temperatur während der Lagerung. Die erste Gruppe der Proben, die sie bei 37 °C lagerten, untersuchten sie nach 24 Stunden und konnten Bisphenol A aus den Proben nachweisen. Proben, die sie bei Minusgraden über mehrere Monate gelagert hatten, wiesen kein Bisphenol A auf. Demzufolge lässt sich behaupten, dass die unterschiedlichen Lagerungsmedien in der Studie von Atkinson et al. die Bisphenol-A-Freisetzung beeinflussten. Die chemische Verbindung des Bis-DMA blieb bei Minustemperaturen stabil.

5. Diskussion

Nathanson et al. [66] lagerten ihre Proben in Ethanol und untersuchten die Extrakte nach vierminütiger Migration. Die untersuchten Fissurenversiegler in der Studie von Nathanson et al. waren Bis-GMA-basierte Materialien. In dieser Studie konnte kein Nachweis von Bisphenol A erbracht werden.

Im Gegensatz zu Nathanson et al. [66] konnten alle anderen Autoren, wie Schmalz et al. [84], Atkinson et al. [7] und Pulgar et al. [76], Bisphenol A durch unterschiedliche Lagerungsbedingungen (pH-Wert, Temperatur) und Lagerungsmedien (Alkohol, Speichel) nachweisen. Die Studie von Nathanson et al. und Pulgar et al. unterscheidet sich von den übrigen Untersuchungen durch die Materialauswahl. Im Rahmen der Studie von Nathanson et al. und Pulgar et al. wurden Bis-GMA-basierte Versiegelungsmaterialien, vergleichbar mit der vorliegenden Arbeit, auf die Abgabe von Bisphenol-A untersucht. Nathanson et al. konnten ebenfalls keine Bisphenol-A-Freisetzung nachweisen. Der Nachweis von Bisphenol A aus Bis-GMA-basierten Versiegeln gelang nur Pulgar et al. Die Freisetzung von Bisphenol A ist nicht nur abhängig von den Lagerungsbedingungen, sondern auch vom Material. Da die meisten Autoren eine Bisphenol-A-Abgabe aus Bis-DMA-basierten Versiegeln nachweisen konnten, lässt sich schlussfolgern, dass die Bisphenol-A-Freisetzung aus diesen Fissurenversiegelungsmaterialien möglich erscheint. Die Verbindung des Bisphenol A in Bis-GMA-basierten Kunststoffen scheint dagegen so stabil zu sein, dass nach 24 stündiger Lagerung im gewählten Studiendesign kein Bisphenol-A-Nachweis gelingt. Es stellt sich jedoch die Frage, warum eine Bisphenol-A-Freisetzung aus der Positiv-Kontrolle möglich war, denn die Positiv-Kontrolle ist ein Bis-GMA-basiertes Material. Wenn die Freisetzung aus Bis-GMA-basierten Versiegelungsmaterialien möglich ist, stellt sich die Frage, warum aus den Fissurenversiegelungsmaterialien der vorliegenden Arbeit und auch der Studie von Nathanson et al. [66] kein Nachweis von Bisphenol A möglich war. Hingegen konnten Pulgar et al. [76] durch Erhöhung des pH-Wertes des Migrationsmediums, Bisphenol A aus Fissurenversiegelungsmaterialien auf Bis-GMA-Basis nachweisen.

5.3 Diskussion der Ergebnisse

Bei keiner der zwei untersuchten Versiegelungsmaterialien konnte eine Bisphenol-A-Freisetzung nachgewiesen werden. Entgegen der Erwartung und im Widerspruch zu den Ergebnissen von Olea et al. [71], Schmalz et al. [84], Arenholt-Bindslev et al. [6], Joskow et al. [46], Fung et al. [31] und Pulgar et al. [76] stehend, konnte ein Bisphenol-A-Nachweis nicht erbracht werden. Diese Autoren konnten Bisphenol A in Fissurenversiegelungsmaterialien jedoch nachweisen. In der vorliegenden Arbeit war unter diesen Versuchsbedingungen (24 stündige Rüttelung der Proben bei Raumtemperatur; gelagert in entionisiertem Wasser), der Nachweis

5. Diskussion

von Bisphenol A in der Positivkontrolle möglich. Die Negativ-Kontrolle, Eluate von TMXDI-Dimethacrylat, wies kein Anhalt auf Bisphenol A auf.

Im Rahmen der Überprüfung der Anwesenheit von Bisphenol A mit Hilfe der UV- und Diodearraydetektion konnte kein Bisphenol A detektiert werden. Da jedoch sehr viele unterschiedliche Peaks erkennbar waren, liegt die Vermutung nahe, dass viele weitere Substanzen aus den Materialien migriert sind, die die Quantifizierung von Bisphenol A erschweren. Die Abbildungen 27 und 28 (Fissurit F), die Abbildungen 31 und 32 (Delton FS +), sowie die Abbildungen 35 und 36 (Bis-GMA) und die Abbildungen 39 und 40 (TMXDI-Dimethacrylat) weisen keine Peaks auf, die einen Hinweis auf einen Bisphenol-A-Gehalt geben. Es sind mehrere Peaks außerhalb der Retentionszeit für Bisphenol A zu erkennen, zu deren Quantität keine eindeutige Aussage getroffen werden kann.

Die Streuung zwischen den drei Chromatogrammen (siehe Abstand des rosa Chromatogramms zu den anderen zwei) in Abbildung 27, 31 und 40 stellen materialabhängige Störgrößen dar und sind möglicherweise durch Inhomogenitäten der Materialien bedingt. Dadurch sind unterschiedliche Matrixeffekte in den Messungen deutlich. Zur Identifikation weiterer Peaks in den Chromatogrammen nutzten einige Autoren [31,66,76] Standardlösungen von bekannten Substanzen in Versiegelungsmaterialien, wie TEGDMA (Triethylenglycoldimethacrylat), Bisphenol A, Bis-DMA (Bisphenol-A-Diglycidylmethacrylat), UDMA (Urethandimethacrylat) und Bis-GMA (Bisphenol-A-Glycidylmethacrylat). Der Fokus beschränkte sich eingangs auf die Fragestellung nach der Freisetzung von Bisphenol A. Die Frage zur Identifikation weiterer Bestandteile stellte sich erst nach Erhalt der Ergebnisse. Deshalb beschränkte sich die Auswahl der Standardlösung bei diesen Untersuchungen auf Bisphenol A und als Positiv-Kontrolle diente ein Bis-GMA-basierter Kunststoff.

In den Abbildungen 29, 30, 33, 34, 37, 38, 41 und 42 sind die Chromatogramme der Fissurenversiegler mit denen der Kalibrierlösungen überlagert. Durch den direkten Vergleich wird ersichtlich, dass die Peaks der Chromatogramme der Versieglermassen (blaue Chromatogramme) außerhalb der Retentionszeiten (siehe schwarze Chromatogramme der Kalibrierlösung) für Bisphenol A liegen.

In den Abbildungen 25 und 26 sind die Ergebnisse der Testprobe (Bis-GMA) dargestellt. Auch hier ist ein Bisphenol-A-Peak nicht erkennbar. Deshalb wurden die Proben ebenfalls mit einem Massenspektrometer detektiert, welches eine höhere Trennleistung und eine bessere Selektivität, insbesondere bezüglich des Bisphenol A, besitzt. Auch in dieser Messreihe waren verschiedene Peaks zu detektieren, was auf unterschiedliche Substanzen hindeutet, die das Bisphenol A im Chromatogramm verdecken können. Die Chromatogramme für diese Massenspektrometer-Messreihen können den Abbildungen 60 (Fissurit F), 61 (Delton FS+), 62 (Bis-GMA) und 64

5. Diskussion

(TMXDI-Dimethacrylat) entnommen werden. Außer in Abbildung 62 (Bis-GMA) ist in keinem Chromatogramm Bisphenol A detektierbar. Da in einer Probe Bisphenol A mit der Messung durch LC-MS/MS (Liquid chromatography/Mass spectrometry) detektierbar war (siehe blaues Chromatogramm in der Abbildung 62), wurden zur genaueren Überprüfung auf eine Übereinstimmung der Retentionszeiten von Bisphenol A mehrere Standardlösungen verglichen. Die Ergebnisse sind der Abbildung 63 entnehmbar. Aus den Messungen mehrerer Standardlösungen ist die Reproduzierbarkeit der Methode zu erkennen. Die Menge kann aufgrund des geringen Signals nicht bestimmt werden. Andere Autoren bestätigten ebenfalls ihre Ergebnisse mit einer weiteren Messmethode [66,76]. Beide Autoren bestätigten ihre Ergebnisse aus der Untersuchung mit einem Flüssigkeitschromatographen zusätzlich mit einer gaschromatographischen Untersuchung.

Im Wiederfindungsversuch konnte das hinzugegebene Bisphenol A im Chromatogramm detektiert werden. Die Wiederfindungsrate lag dabei bei 84,4 % bei der Fluoreszenzdetektion und 75,0 % bei der Diodenarraydetektion. Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe sind aus der Abbildung 65 ersichtlich. Somit konnte bestätigt werden, dass kein Bisphenol A in die Probenlösung migriert ist, denn nach Zugabe von definiertem Bisphenol A konnte mit dieser Methode das zugegebene Bisphenol A nachgewiesen werden. Die Untersuchungsmethode kann als gesichert betrachtet werden, da nach Zugabe von Standardlösungen mit Bisphenol A, das Bisphenol A detektierbar war. Einige Autoren fordern eine Wiederfindungsrate von mindestens 50 % [48,72,73]. Braggio et al. fordern Wiederfindungswerte von mindestens 70 % [13]. Angesichts der Wiederfindungswerte aus der Diodenarray- und Fluoreszenzdetektion zwischen 75 % und 84,4% im Vergleich zu den geforderten Werten aus der Literatur, ist die Zuverlässigkeit der Wiederfindung als hoch einzustufen.

Die eingangs aufgestellte Arbeitshypothese, dass bei Bis-GMA-basierten Fissurenversiegelungsmaterialien eine Freisetzung von Bisphenol A zu erwarten ist, konnte nicht bestätigt werden. Bei dem hier gewählten Versuchsaufbau kam es nicht zu einer Migration von Bisphenol A in Wasser. Die Falsifikation der These kann sich jedoch nur auf die Materialien der untersuchten Chargen beziehen. Es stellt sich daher die Frage, ob dieselben Materialien anderer Chargen ebenfalls stabil bleiben und im polymerisierten Zustand kein Bisphenol A abgeben. Es kann jedoch nicht sicher ausgeschlossen werden, dass die Materialien kein Bisphenol A abgeben. Bis-GMA oder Bis-DMA-basierte Fissurenversiegelungsmaterialien sind eine chemische Verbindung aus Bisphenol A und Glycidylmethacrylat, bzw. Diglycidylmethacrylat [42] und dienen in vielen dentalen Kunststoffen als Basismonomer [30,31,95]. Nach Polymerisation ist die chemische Verbindung stabil. Gleichwohl können solche Kunststoffe unter bestimmten Bedingungen Bisphenol A abgeben oder es entsteht ein Degradationsprodukt, welches in Lösung geht.

5. Diskussion

Es sollte jedoch im Rahmen weiterer Untersuchungen geklärt werden, ob unter anderen Lagerungsbedingungen eine Abgabe von Bisphenol A stattfindet. Shaji et al. untersuchten mikrogefüllte Komposite auf ihre Bisphenol-A-Abgabe nach Inkubation der Proben mit Cholesterolesterasen und konnten dadurch Degradationsprodukte des Bis-GMA, das 2,2-bis [4 (2,3-hydroxypropoxy)-phenyl] propane (bis-HPPP) nachweisen [93]. Die chemische Degradation der auf Bis-GMA basierenden Komposite konnten auch andere Autoren [44,82,94] nachweisen. Die Ergebnisse dieser Autoren werfen die Frage auf, ob das Polymergerüst in Anwesenheit von Wasser stabil bleibt und eine Degradation erst durch den Kontakt des Materials mit bestimmten Enzymen hervorgerufen wird.

Noda et al. [68] begründen die unterschiedlichen Ergebnisse aus der Literatur mit der Anwendung unterschiedlicher Migrationsmedien. In deren Studien zur Untersuchung der Freisetzung von Bisphenol A aus Fissurenversiegelungsmaterialien diente als Migrationsmedium Wasser, Speichel oder Ethanol. Da dentale Kunststoffe jedoch hydrophobe Eigenschaften besitzen, lässt sich nach Noda et al. kein Bisphenol A aus den Kunststoffen in einem wässrigen Medium lösen. Außerdem sei nach Noda et al. Bisphenol A ein Fremd- oder Verunreinigungsstoff, welches während der Synthese von Bis-GMA zurückbleibt, der in sehr geringen Mengen anwesend ist. Die Autoren verwendeten als Extraktionsmedium Acetonitil, ein organisches Lösungsmittel aus der Gruppe der Nitrile, und untersuchten unpolymerisierte dentale Kunststoffe mit Hilfe eines Hochleistungsflüssigkeitschromatographen mit anschließender UV-Detektion. Da bei der Absorption zwischen 195 und 228 nm Überlappungen der Peaks zu erkennen waren, nahmen Noda et al. an, dass es sich bei der detektierten Substanz um Bisphenol A handelt. Die Behauptung, dass aufgrund der hydrophoben Eigenschaften der Kunststoffe keine Migration stattfinden kann, widerlegen die Studien, die in wässrigem Medium Bisphenol A nachweisen konnten [7,71,76,84].

Die Aussage von Noda et al. [68], dass dentale Kunststoffe hydrophobe Eigenschaften besitzen, bezieht sich auf deren unpolymerisierten Zustand. Da die Autoren die Komposite im unpolymerisiertem Zustand untersucht haben, gelang es ihnen, Bisphenol A in Acetonitril zu extrahieren. Die meisten Autoren [7,71,76,84] mit Ausnahme von Pulgar et al. [76], verwendeten Speichel als Migrationsmedium. Sie konnten gleichwohl Bisphenol A aus den Proben detektieren. Pulgar et al. [76] gelang der Nachweis der Freisetzung von Bisphenol A in destilliertem Wasser, indem der pH-Wert des Migrationsmediums erhöht wurde. In der vorliegenden Arbeit wurde doppelt entionisiertes Wasser als Migrationsmedium verwendet, da Wasser eine kostengünstige Variante darstellt und auch die Freisetzung von Bisphenol A in Wasser in der Literatur [76] angegeben wird. Pulgar et al. [76] erhöhten vergleichsweise die pH-Werte von 1 bis 11. In der vorliegenden Arbeit betrug der pH-Wert 5 bis 6. Es bleibt zu diskutieren, ob eine Bisphenol-A-Migration durch Erhöhung des pH-Wertes nachweisbar gewesen wäre. Wasser stellt außer-

5. Diskussion

dem ein reines Medium dar, bei dem eine Kontamination mit Bisphenol A nicht zu erwarten ist. Speichel z.B. birgt die Gefahr einer Bisphenol-A-Kontamination aus alltäglichen Gebrauchsgegenständen, wie beschichteten Konservendosen [16], Mikrowellengeschirr [67], Babyschnullern [33] und Kunststoffflaschen [52].

Wichtig sind ferner die Unterschiede zwischen In-vitro- und In-vivo-Bedingungen zu beachten. Es besteht ein großer Unterschied zwischen den thermischen, chemischen und mechanischen Bedingungen, die im ständigen Wechsel die Degradation bzw. die Alterung der Fissurenversiegelung beeinflussen können. Es ist relativ schwierig, orale Bedingungen in vitro nachzuahmen. Zahlreiche andere, nicht standardisierbare Einflüsse, wie die Belastung mit Bisphenol A aus alltäglichen Gebrauchsgegenständen [15,17,20,34,52,67,103] können die Untersuchungen in vivo beeinflussen. Außerdem ist der Abbau von Bisphenol A von bestimmten Enzymen, wie der UDP-Glucuronosyltransferase, abhängig [104]. Das Bisphenol A wird als Glucuronide renal oder biliär ausgeschieden. Da Bisphenol A bei Tieren langsamer als im menschlichen Organismus ausgeschieden wird, ist der Nachweis einer östrogenen Wirkung bei Tierversuchen möglich [79]. Die Übertragung dieser Ergebnisse und die Wertung der Wirkungen von Bisphenol A für den menschlichen Organismus ist deshalb jedoch problematisch.

Die In-vivo-Studien von Joskow et al. [46], Fung et al. [31] und Arenholt-Bindslev et al. [6] belegen eine Bisphenol-A-Abgabe nach Legen von Fissurenversiegelungen. Arenholt-Bindslev und Mitarbeitern gelang es, bis zu 24 Stunden nach der Versiegelung Bisphenol A in den Speichelproben ihrer Probanden nachzuweisen [6]. Den Nachweis von Bisphenol A in Speichelproben erbrachten auch Fung et al. [31]. Joskow et al. untersuchten neben Speichelproben auch noch Urinproben und konnten Bisphenol A in allen Proben nachweisen [46]. Ein systemischer Nachweis einer östrogen wirksamen Substanz, wie der Nachweis von Bisphenol A in Urinproben, kann ein gesundheitliches Risiko darstellen und betont den enormen Forschungsbedarf zu dieser Thematik.

5.4 Klinische Bewertung der Ergebnisse

5.4.1 Belastungsgrenzen für Bisphenol A

Östrogen wirkende Substanzen greifen in das hormonelle Steuerungssystem ein und entfalten ihre Wirkung auch im Niedrig-Dosis-Bereich [20]. Es reichen geringste Mengen an endokrin wirksamen Stoffen aus, um das Gleichgewicht zwischen männlichen und weiblichen Hormonen negativ zu beeinflussen [20]. Der Niedrig-Dosis-Bereich wurde für östrogene Stoffe mit 50 mg/kg Körpergewicht/Tag angegeben und ist ein Wert, der in Tierexperimenten noch eine Wirkung erzielt, der so genannte LOAEL (lowest observed adverse effect level) [28,47,57,100]. Mit

5. Diskussion

einem Sicherheitsfaktor von 1000 wird aus dem Wert für den Niedrig-Dosis-Bereich ein Wert berechnet, von dem bei langfristiger und regelmäßiger Aufnahme keine Schädigung zu erwarten ist. Dieser liegt definitionsgemäß bei 0,05 mg/kg Körpergewicht und wird als „tolerable daily intake“ (TDI) angegeben [47]. Da Bisphenol A Schädigungen an den Reproduktionsorganen hervorrufen kann, senkte die Europäische Kommission (Scientific committee on food) [21] aufgrund der toxikologischen Datenlage den TDI auf 10 µg/kg/Tag [47,57].

Endogen wirksame Stoffe, wie das Bisphenol A, folgen nicht der klassischen Wirkungsweise, wie man sie aus der Toxikologie kennt, wo die Wirkung von der Menge der Substanz abhängt, sondern Bisphenol A erzeugt durch den Eingriff in das neuroendokrine System, unabhängig von der Menge, Schädigungen im menschlichen Organismus [20].

In der vorliegenden Arbeit konnte, außer in der Positiv-Kontrolle für die untersuchten Materialien, kein Bisphenol A nachgewiesen werden. Für andere Fissurenversiegelungsmaterialien wurde jedoch eine Bisphenol-A-Freisetzung nachgewiesen [6,31,46,71,84]. Olea et al. zum Beispiel haben Werte zwischen 3,3 und 30,0 µg/ml Speichel direkt nach der Versiegelung der Zähne in den Speichelproben nachweisen können [71]. Ein Kind mit einem Körpergewicht von 30 kg darf nach den Vorgaben der Europäischen Kommission (Scientific committee on food) nur 300 µg Bisphenol A aufnehmen. Nach diesem Worst-case-Szenario wäre eine Überdosierung an Bisphenol A denkbar. Pulgar et al. [76] fanden in vitro Bisphenol-A-Werte zwischen 1,4 und 116 µg/ml Wasser. Es ist jedoch zu erwähnen, dass dies eine Migration in Wasser und eine In-vitro-Studie darstellt.

5.4.2 Bewertung der Gesundheitsgefährdung durch Bisphenol A

Braniste und Mitarbeiter konnten in einer tierexperimentellen Untersuchung an Ratten belegen, dass Bisphenol A im Niedrig-Dosis-Bereich bei einem TDI von 50 µg/kg Körpergewicht die Darmepithelbarriere schädigen kann [14]. Piomenova et al. konnten durch die Inkubation schwangerer Ratten mit Bisphenol-A-Mengen von 40 µg/kg Verhaltensstörungen und Lernschwächen bei den neugeborenen Tieren auslösen [75].

Die Zahl adipöser Kinder steigt. Einige Autoren sehen eine Ursache im steigenden Konsum von Nahrungsmitteln, die in Plastikverpackungen gelagert werden, die den „Weichmacher“ BPA enthalten. Die Belastung aus alltäglichen Gebrauchsgegenständen, wie zum Beispiel aus beschichteten Konservendosen [20,34], Kunststoffflaschen [20], Mikrowellengeschirr [67], Plastikbesteck und Plastiktüten [20] ist relativ hoch. Auch Babyflaschen und Babyschnuller enthalten Bisphenol A [15,17,52]. Im Auftrag der Umweltorganisation Global 2000 untersuchte eine akkreditierte Prüfstelle (ISO/IEC 17015) unterschiedliche Babyschnuller aus Latex und Silikon und stellte Bisphenol-A-Freisetzungen aus allen Schnullern fest [33]. Das könnte einen Zusammen-

5. Diskussion

hang von der frühen Belastung mit den endokrin wirksamen Substanzen und Adipositas im Kindesalter erklären. Bisphenol A kann zu Insulinresistenzen und somit zu Adipositas-assoziiertem Diabetes mellitus führen [40]. Adachi et al. konnten demonstrieren, dass die Insulinsekretion in vitro aus den Pankreasinseln durch den Einfluss von Bisphenol A gefördert wird [2]. Bisphenol A verursacht über intrazelluläre Östrogenrezeptoren eine vermehrte Ausschüttung von Insulin über zytosolische oder auch nukleäre Östrogenrezeptoren [2]. Aus diesen Ergebnissen schlussfolgerten die Autoren, dass eine langandauernde Hyperinsulinämie zum Untergang der Pankreaszellen und damit verbunden zu Diabetes mellitus führen kann [2].

Ähnliche Ergebnisse stellen Alonso-Magdalena und Mitarbeiter vor [5]. Nach Behandlung von Mäusen mit Bisphenol-A-Konzentrationen von 10 µg/kg/Tag bis 100 µg/kg/Tag konnte eine Abnahme der Glucosetoleranz beobachtet werden. Außerdem konnte eine Zunahme der Insulinresistenz bewiesen werden, wodurch das Diabetesrisiko ansteigt [5]. Es ist erschreckend, dass solche geringen Mengen an Bisphenol A bei Mäusen Schädigungen in diesen Ausmaßen hervorrufen können. Es ist relativ schwierig, diese Effekte direkt in vivo am Menschen zu demonstrieren, jedoch können diese Erkrankungen mit einer nachgewiesenen Bisphenol-A-Belastung in Zusammenhang gebracht werden.

Die schädigende Wirkung von Bisphenol A ist zumindest in tierexperimentellen Versuchen bestätigt worden [2,14,58,70,75]. Das sollte in Langzeitstudien beobachtet werden, um Folgeschäden erkennen zu können. So sollten der Bisphenol-A-Gehalt in Routineuntersuchungen, vor allem bei Risikopatienten, die an einer Erkrankung, wie Diabetes mellitus, Adipositas, Unfruchtbarkeit, Flatulenz, Obstipation, Diarrhoe und krampfartige Magenschmerzen leiden, untersucht werden. Da jedoch der Abbau im tierischen Organismus unterschiedlich zum menschlichen abläuft [79], ist die Bewertung der Risiken anhand tierexperimenteller Studien nicht möglich.

Viele der mit Bisphenol A in Verbindung gebrachten Erkrankungen werden auch durch andere Faktoren verursacht. Deshalb ist der Nachweis von Bisphenol A als Ursache der oben genannten Erkrankungen schwierig.

Die Dosis-Wirkungsbeziehung östrogen wirkender Substanzen aus toxikologischer Sicht ist ebenfalls relativ schwierig, da die Wirkung nicht von der Menge der schädigenden Substanz abhängig ist.

Die präventive Wirkung der Fissurenversiegelungsmaterialien ist von großer Bedeutung und besitzt in der Zahnheilkunde einen hohen Stellenwert. Es sollte jedoch eine Risikoabwägung erfolgen. Die zahnärztlichen Präventionsmaßnahmen müssten im Falle eines Nachweises gesundheitlicher Risiken durch die Fissurenversiegelungsmaterialien umstrukturiert werden. In

5. Diskussion

Zukunft sollte die Dentalindustrie weiter auf diesem Gebiet forschen, um Bisphenol-A-freie Fissurenversiegelungsmaterialien herzustellen. Ferner sollten diese Materialien auch hinsichtlich der Zusammensetzung der Substanzen unbedenklich sein. Die Materialien, die in der vorliegenden Arbeit untersucht wurden, wiesen weitere unbekannte Substanzen auf, deren Abklärung und Identifikation notwendig sind. Die Materialien, die in der Zahnheilkunde verwendet werden, sollten alle Qualitätsstandards, die für die Unbedenklichkeit bezüglich der Gesunderhaltung des Menschen erforderlich sind, erfüllen.

5.5 Schlussfolgerungen

Im Ergebnis zeigt sich, dass bei dem hier verwendeten Studiendesign Bisphenol A nur in der Positivprobe nachgewiesen werden konnte. Es konnte kein Unterschied zwischen Bis-GMA-basierten und Bis-GMA-freien Fissurenversiegelungsmaterialien nachgewiesen werden. Zur Absicherung der Ergebnisse wurde zusätzlich zur UV- und Diodenarraydetektion eine massenspektrometrische Messung durchgeführt. Auch in dieser Messreihe konnte kein Bisphenol A nachgewiesen werden. Die Ergebnisse wurden stets mit Standardlösungen verglichen und auf ihre Richtigkeit hin geprüft. Zudem stellt die Methode eine übliche Messung für den Nachweis von Bisphenol A dar. Auf der Basis der hier gewonnenen Daten kann für die untersuchten Chargen eine Bisphenol-A-Freisetzung unter diesen Versuchsbedingungen ausgeschlossen werden. Unter Umständen waren das Migrationsmedium Wasser oder auch die Versuchsbedingungen (pH-Wert, Temperatur, Dauer) unzureichend, um eine Migration oder Degradation des Bisphenol A hervorzurufen. Im Rahmen weiterer Untersuchungen sollte die Bisphenol-A-Abgabe bei unterschiedlichen pH-Werten, wechselnden Temperaturen und unter Zugabe von Enzymen und Esterasen sowie unter mechanischer Belastung überprüft werden.

Außerdem wurden verschiedene Peaks detektiert, über die ohne weitergehende Untersuchungen keine Rückschlüsse oder Wertung abgegeben werden kann.

Nach gegenwärtigem Kenntnisstand sind die untersuchten Fissurenversiegler hinsichtlich der Bisphenol-A-Abgabe jedoch unbedenklich. Da sich die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit auf Bis-GMA-basierte Komposite beschränkt, können keine Aussagen über Bis-DMA-basierte Materialien getroffen werden.

5.6 Ausblick

Die Fissurenversiegelungsmaterialien sollten unter verschiedenen Bedingungen getestet werden. Dazu zählen das Migrationsmedium, die Temperatureinstellungen und die mechanische Belastungskomponente, um sicher ausschließen zu können, dass die Materialien auch unter anderen Situationen stabil bleiben. Außerdem sollten die Materialien auch unter In-vivo-Bedingungen untersucht werden.

5. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden Bis-GMA-basierte Versiegler auf ihre Bisphenol-A-Freisetzung untersucht. Im Rahmen weiterer Untersuchungen sollten Bis-DMA-basierte Versiegler untersucht und mit Bis-GMA-basierten Fissurenversiegelungsmaterialien verglichen werden.

Die vorliegende Analyse beschränkte sich auf die Untersuchung des Gehaltes an Bisphenol A, dessen schädigende Wirkung in der Literatur dokumentiert ist. Weitere Fragestellungen entstehen aus den chromatographisch detektierten unterschiedlichen Peaks, die hier nicht analysiert wurden. Die Fissurenversiegelungsmaterialien sollten hinsichtlich dieser Substanzen untersucht und alle Bestandteile, die im Rahmen dieser Untersuchung migriert sind, identifiziert werden, um gesundheitliche Risiken durch andere Bestandteile aus den Materialien ausschließen zu können.

6 Zusammenfassung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung von Fissurenversiegelungsmaterialien hinsichtlich der Freisetzung von Bisphenol A.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Fissurenversiegelungsmaterialien (Fissurit F und Delton FS⁺) sowie eine Positiv- und eine Negativ-Kontrolle auf eine Bisphenol-A-Abgabe untersucht. Für jedes Material wurden jeweils 21 Proben hergestellt, von denen jeweils sieben Proben für eine Probenreihe verwendet wurden. Unabhängig von diesen Proben wurde eine Testprobe (1,62 g Bis-GMA) aufgearbeitet und der Bisphenol-A-Gehalt im Eluat untersucht.

Zur Herstellung von Proben der gleichen Größe, wurden die Versiegler in einen Glasring (ausgekleidet mit einer Metallmatrize) definierter Größe mit 8 mm Innendurchmesser und 3 mm Höhe appliziert und von beiden Seiten insgesamt 40 Sekunden lang mit einer LED-Lampe polymerisiert. Nach Polymerisation der Proben wurden diese in ein Glasgefäß überführt. Die Glasgefäße wurden nach Zugabe von entionisiertem Wasser zu den Proben in einen Horizontalschüttler eingespannt und unter ständiger Bewegung bei Zimmertemperatur 24 Stunden der Migration überlassen. Anschließend wurden mit einer Flüssig-Flüssig-Extraktion die Extrakte aufgearbeitet.

In Anlehnung an die Europäische Norm EN 14372:2004 (E) zur Bestimmung von Bisphenol A aus Nahrungsmittelbehältnissen wurden die Proben auf den Gehalt an BPA in flüssigem Medium überprüft.

Das aus der Flüssigkeit erhaltene Migrat wurde mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie gemessen. Der Bisphenol-A-Gehalt wurde in den ersten Probenreihen mit Hilfe einer Fluoreszenz- und Diodenarraydetektion untersucht. Da kein Nachweis von Bisphenol A möglich war und sehr viele verschiedene Peaks detektiert wurden, erfolgte zur Absicherung der Ergebnisse eine weitere Untersuchung der Proben mittels Massenspektrometer (HPLC-MS/MS). Diese Methode besitzt eine höhere Trennleistung und höhere Selektivität im Vergleich zur UV- oder Diodenarraydetektion. Mit der HPLC Messung konnte Bisphenol A nur in der Positiv-Kontrolle detektiert werden. Zur Sicherung der Reproduzierbarkeit der Methode und zur Bestätigung der Ergebnisse dieser Proben wurden mehrere Messungen von Standardlösungen durchgeführt. Der Nachweis von Bisphenol A aus der Probenreihe der Positiv-Kontrolle (Bis-GMA) konnte dadurch bestätigt werden. Eine quantitative Aussage war aufgrund des geringen Peak-Signals nicht möglich.

Da aufgrund der vielen Peaks in den anderen Proben keine eindeutige Aussage über BPA getroffen werden konnte, wurde ein Wiederfindungsversuch durchgeführt. In diesem Zusammen-

6. Zusammenfassung

hang wurde dotiertes Bisphenol A zu den Probenlösungen hinzugegeben und mit dem gleichen Verfahren untersucht. Die Richtigkeit der Ergebnisse wurde stets mit dem Vergleich der Chromatogramme der Standardlösungen gesichert.

Eine vergleichende statistische Auswertung ist aufgrund des fehlenden Nachweises von Bisphenol A nicht möglich. Im Fall der Positiv-Kontrolle ist trotz des Nachweises von Bisphenol A aufgrund des geringen Peaks keine Quantifizierung möglich.

Da Bisphenol A in dem Wiederfindungsversuch zu detektieren war, kann geschlussfolgert werden, dass in den vorherigen Proben kein Bisphenol A enthalten war. Eine abschließende Wertung bezüglich der Grenzwerte hinsichtlich gesundheitlicher Risiken von Bisphenol A kann aus den vorliegenden Ergebnissen nicht abgeleitet werden. Die in Wasser freigesetzte BPA-Mengen waren insgesamt sehr gering.

6.1 Summary

The objective of this dissertation was to investigate the stability of bisphenol A contained in dental fissure sealants. In particular, two fissure sealants (Fissurit F and Delton FS+) were tested alongside a positive (Bis-GMA-based resin) and a negative control (TMXDI, an experimental Bis-GMA-free sealant). Independently of these test samples, another test sample (1.62 g Bis-GMA) was examined.

For each material, 21 discs were prepared by placing the fissure sealant into a glass ring that was lined with a metal matrix band and had an internal diameter of 8 mm and a height of 3 mm. These discs were polymerized for 40 seconds on both sides with an LED curing light. Seven discs of each material were needed to conduct a test cycle. The polymerized discs were transferred to a glass vial. Deionized water was added and then the vials were mounted on a horizontal shaker. The samples were subjected to continuous motion at room temperature for 24 hours to allow migration. After completion of the migration time, extracts were obtained by means of liquid-liquid extraction. The stability of bisphenol A in dental fissure sealants was tested in accordance with the European standard EN 14372:2004 (E) "Child use and care articles. Cutlery and feeding utensils. Safety requirements and tests" to determine the bisphenol A levels released from food containers in liquid medium.

The migrates were tested for bisphenol A with the help of high-performance liquid chromatography. Bisphenol A was analyzed by fluorescence and diode-array detection. Because many peak levels were detected in conjunction with these measurements, the bisphenol A levels were additionally quantified with mass spectrometry (HPLC-MS/MS). This test method offers a higher selectivity and separating efficiency than UV or diode array detection methods. Bisphenol A was found only in the positive control group when the HPLC method was used. The level of bi-

6. Zusammenfassung

spfenol A could not be calculated because the peak signal was not high enough to be quantified.

As many peaks were observed in the other sets of tests, it was impossible to draw a clear conclusion and, therefore, it was necessary to carry out recovery tests. To conduct the recovery tests, selected bisphenol A was applied to the test liquids and then determined using the same test method as above. The accuracy of the test results was ensured with the help of the chromatograms of the standard fluids.

A comparative statistical analysis was not possible because no bisphenol A was present. In the case of the positive control group, a quantification of bisphenol A could not be performed because the peak levels were too weak.

In conclusion, no bisphenol A was present in the migrates in the test series before the recovery test. Bisphenol A was detected on the chromatograms only after standard bisphenol A had been added to the test liquids. It is difficult to define a limit value for estrogen-like substances to prevent health risks. The migration of BPA into water was overall very low in sets of tests.

7 Literaturverzeichnis

1. Ackerman LK, Noonan GO, Heiserman WM, Roach JA, Limm W, Begley TH. Determination of Bisphenol A in U.S. Infant Formulas: Updated Methods and Concentrations. *J Agric Food Chem* 2010;58:2307-13.
2. Adachi T, Yasuda K, Mori C, Yoshinaga M, Aoki N, Tsujimoto G, Tsuda K. Promoting insulin secretion in pancreatic islets by means of bisphenol A and nonylphenol via intracellular estrogen receptors. *Food Chem Toxicol* 2005;43:713-9.
3. Adewale HB, Todd KL, Mickens JA, Patisaul HB. The impact of neonatal bisphenol-a exposure on sexually dimorphic hypothalamic nuclei in the female rat. *Neurotoxicology* 2010;32:38-49.
4. Alonso-Magdalena P, Ropero AB, Soriano S, Quesada I, Nadal A. Bisphenol-A: a new diabetogenic factor? *Hormones (Athens)* 2010;9:118-26.
5. Alonso-Magdalena P, Vieira E, Soriano S, Menes L, Burks D, Quesada I, Nadal A. Bisphenol A exposure during pregnancy disrupts glucose homeostasis in mothers and adult male offspring. *Environ Health Perspect* 2010;118:1243-50.
6. Arenholt-Bindslev D, Breinholt V, Preiss A, Schmalz G. Time-related bisphenol-A content and estrogenic activity in saliva samples collected in relation to placement of fissure sealants. *Clin Oral Investig* 1999;3:120-5.
7. Atkinson JC, Diamond F, Eichmiller F, Selwitz R, Jones G. Stability of bisphenol A, triethylene-glycol dimethacrylate, and bisphenol A dimethacrylate in whole saliva. *Dent Mater* 2002;18:128-35.
8. Azarpazhooh A, Main PA. Is there a risk of harm or toxicity in the placement of pit and fissure sealant materials? A systematic review. *J Can Dent Assoc* 2008;74:179-83.
9. BAM. Prüfbericht I.2/2010-AA-276; Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung. Berlin; 2010: S. 1-36.
10. Barak S, Oettinger-Barak O, Oettinger M, Machtei EE, Peled M, Ohel G. Common oral manifestations during pregnancy: a review. *Obstet Gynecol Surv* 2003;58:624-8.
11. Ben-Jonathan N, Hugo ER, Brandebourg TD. Effects of bisphenol A on adipokine release from human adipose tissue: Implications for the metabolic syndrome. *Mol Cell Endocrinol* 2009;304:49-54.

7. Literaturverzeichnis

12. Berger I. HPLC-MS/MS Analyse von Immunsuppressiva direkt in Vollblut. Diss. Medizinische Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität zu München; München; 2010.
13. Braggio S, Barnaby RJ, Grossi P, Cugola M. A strategy for validation of bioanalytical methods. *J Pharm Biomed Anal* 1996;14:375-88.
14. Braniste V, Jouault A, Gaultier E, Polizzi A, Buisson-Brenac C, Leveque M, Martin PG, Theodorou V, Fioramonti J, Houdeau E. Impact of oral bisphenol A at reference doses on intestinal barrier function and sex differences after perinatal exposure in rats. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010;107:448-53.
15. Brede C, Fjeldal P, Skjevraak I, Herikstad H. Increased migration levels of bisphenol A from polycarbonate baby bottles after dishwashing, boiling and brushing. *Food Addit Contam* 2003;20:684-9.
16. Brotons JA, Olea-Serrano MF, Villalobos M, Pedraza V, Olea N. Xenoestrogens released from lacquer coatings in food cans. *Environ Health Perspect* 1995;103:608-12.
17. Cao XL, Corriveau J. Migration of bisphenol A from polycarbonate baby and water bottles into water under severe conditions. *J Agric Food Chem* 2008;56:6378-81.
18. Carrillo-de-Albornoz A, Figuero E, Herrera D, Bascones-Martinez A. Gingival changes during pregnancy: II. Influence of hormonal variations on the subgingival biofilm. *J Clin Periodontol* 2010;37:230-40.
19. Carwile JL, Luu HT, Bassett LS, Driscoll DA, Yuan C, Chang JY, Ye X, Calafat AM, Michels KB. Polycarbonate bottle use and urinary bisphenol A concentrations. *Environ Health Perspect* 2009;117:1368-72.
20. Chahoud I. Hormone in der Babyflasche. Bisphenol A: Beispiel einer verfehlten Chemikalienpolitik. Sind Kunststoffbestandteile Ursache vieler Zivilisationskrankheiten? 2008 [zitiert 21.07.2010]. Verfügbar unter:
http://www.bund.net/fileadmin/bundnet/publikationen/chemie/20081022_chemie_studie_bisphenol_a.pdf.
21. Commission E. Opinion of the Scientific Committee on Food on Bisphenol A; Scientific committee on food; 2002: S. 1-22.
22. Craig RG, Powers JM, Wataha JC. Zahnärztliche Werkstoffe. München: Elsevier; 2006.S. 43-6

7. Literaturverzeichnis

23. DGPT. Hormonell aktive Substanzen in der Umwelt: Xenoöstrogene. Umweltmed Forsch Prax 1999;4:367-74.
24. Drozd K, Wysokinski D, Krupa R, Wozniak K. Bisphenol A-glycidyl methacrylate induces a broad spectrum of DNA damage in human lymphocytes. Arch Toxicol 2010:1-9.
25. Eisenbrand G, Mußler B. Kombinationswirkungen hormonartig wirkender Chemikalien. 2000 [zitiert 21.07.2010]. Verfügbar unter:
http://www.ifado.de/forschung_praxis/umsetzung/schriften_anwender/AP_2_2000_S27.pdf.
26. Eisenbrand G, Seng D, Mußler B. Erfassung der hormonellen Aktivität von Lebensmittelinhaltsstoffen und Umweltkontaminanten mittels funktioneller Reporterassays. Förderkennzeichen: U 96 017; 2000:1-11.
27. EN. Child use and care articles-Cutlery and feeding utensils-Safety requirements and tests; EN 14372:2004 (E) 2004: S. 1-25.
28. Erler C, Novak J. Bisphenol A exposure: Human risk and health policy. J Pediatr Nurs 2010;25:400-7.
29. Finer Y, Jaffer F, Santerre JP. Mutual influence of cholesterol esterase and pseudocholinesterase on the biodegradation of dental composites. Biomaterials 2004;25:1787-93.
30. Fleisch AF, Sheffield PE, Chinn C, Edelstein BL, Landrigan PJ. Bisphenol A and related compounds in dental materials. Pediatrics 2010;126:760-8.
31. Fung EY, Ewoldsen NO, St Germain HA, Jr., Marx DB, Miaw CL, Siew C, Chou HN, Gruninger SE, Meyer DM. Pharmacokinetics of bisphenol A released from a dental sealant. J Am Dent Assoc 2000;131:51-8.
32. Gleim A. Retentionsraten und klinische Verarbeitungseigenschaften der Fissurenversiegler Helioseal-F und Fissurit-F im Vergleich. Diss. Justus-Liebig-Universität; Gießen; 2005.
33. Global2000. Prüfbericht 1001/09. Chemkon GmbH 2009:1-6.
34. Goodson A, Summerfield W, Cooper I. Survey of bisphenol A and bisphenol F in canned foods. Food Addit Contam 2002;19:796-802.
35. Greim H. Chemikalien mit endokrin wirksamem Potenzial: eine Gefährdung für die menschliche Gesundheit? Angew Chem 2005;117:5704-11.

7. Literaturverzeichnis

36. Gursoy M, Haraldsson G, Hyvonen M, Sorsa T, Pajukanta R, Kononen E. Does the frequency of *Prevotella intermedia* increase during pregnancy? *Oral Microbiol Immunol* 2009;24:299-303.
37. Hayatpour J, Monsees TK. Einfluss von Xenoöstrogenen auf sekretorische Funktionen von Sertoli-Zellen. *J Urol Urogynäkol* 2000;7:20-7.
38. Hofmann J. Aufbau eines Reporterassays zur Untersuchung der Wechselwirkung Endokriner Disruptoren mit der T3-regulierten Transaktivierung. Diss. Humboldt-Universität zu Berlin; Berlin; 2008.
39. Howdeshell KL, Hotchkiss AK, Thayer KA, Vandenberg JG, vom Saal FS. Exposure to bisphenol A advances puberty. *Nature* 1999;401:763-4.
40. Hugo ER, Brandebourg TD, Woo JG, Loftus J, Alexander JW, Ben-Jonathan N. Bisphenol A at environmentally relevant doses inhibits adiponectin release from human adipose tissue explants and adipocytes. *Environ Health Perspect* 2008;116:1642-7.
41. Huppelsberg J, Walter K. *Kurzlehrbuch Physiologie*. Stuttgart, New York: Thieme; 2005. S. 206-26.
42. Ivoclar vivadent. *Helioseal® Fissurenversiegler*; Produktinformation: S. 1-13.
43. Iwakura T, Iwafuchi M, Muraoka D, Yokosuka M, Shiga T, Watanabe C, Ohtani-Kaneko R. In vitro effects of bisphenol A on developing hypothalamic neurons. *Toxicology* 2010;272:52-8.
44. Jaffer F, Finer Y, Santerre JP. Interactions between resin monomers and commercial composite resins with human saliva derived esterases. *Biomaterials* 2002;23:1707-19.
45. Janda R. Toxikologie der polymerisierbaren Füllungsmaterialien. *DFZ* 2007;10:56-63.
46. Joskow R, Barr DB, Barr JR, Calafat AM, Needham LL, Rubin C. Exposure to bisphenol A from bis-glycidyl dimethacrylate-based dental sealants. *J Am Dent Assoc* 2006;137:353-62.
47. Kang JH, Kondo F, Katayama Y. Human exposure to bisphenol A. *Toxicology* 2006;226:79-89.
48. Karnes HT, Shiu G, Shah VP. Validation of bioanalytical methods. *Pharm Res* 1991;8:421-6.

7. Literaturverzeichnis

49. Kellner R. Chromatographische Trennmethode. In: Lottspeich F, Engels JW. (Hrsg): Bioanalytik. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag; 2006. S. 215-28.
50. Lang IA, Galloway TS, Scarlett A, Henley WE, Depledge M, Wallace RB, Melzer D. Association of urinary bisphenol A concentration with medical disorders and laboratory abnormalities in adults. *JAMA* 2008;300:1303-10.
51. Larsen IB, Freund M, Munksgaard EC. Change in surface hardness of BisGMA/TEGDMA polymer due to enzymatic action. *J Dent Res* 1992;71:1851-3.
52. Le HH, Carlson EM, Chua JP, Belcher SM. Bisphenol A is released from polycarbonate drinking bottles and mimics the neurotoxic actions of estrogen in developing cerebellar neurons. *Toxicol Lett* 2008;176:149-56.
53. Lee MS, Hyun SH, Lee CK, Im KS, Hwang IT, Lee HJ. Impact of xenoestrogens on the growth of human endometrial epithelial cells in a primary culture system. *Fertil Steril* 2003;79:1464-5.
54. Leisewitz A, Schwarz W. Stoffströme wichtiger endokrin wirksamer Industriechemikalien (Bisphenol A; Dibutylphthalat/Benzylbutylphthalat; Nonylphenol/Alkylphenoethoxylate). Umweltforschungsplan des Bundesministers für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit. Forschungsbericht 106 01 076; 1997: S. 1-161.
55. Löcherbach J. Auswertung und Visualisierung von Flüssigkeitschromatographie-Tandemmassenspektrometriedaten. Diss. Institut für Mathematik und Informatik der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald; Greifswald; 2005.
56. López-Cervantes J, Paseiro-Losada P. Determination of bisphenol A in, and its migration from, PVC stretch film used for food packaging. *Food Addit Contam* 2003;20:596–606.
57. MacLusky NJ, Hajszan T, Leranath C. The environmental estrogen bisphenol a inhibits estradiol-induced hippocampal synaptogenesis. *Environ Health Perspect* 2005;113:675-9.
58. Manthey D. Östrogene, Östrogenrezeptoren und Nukleäre Rezeptoren in der Neuroprotektion. 2006 [zitiert 21.07.2010]. Verfügbar unter: http://www.uni-mainz.de/FB/Medizin/PhysiolChemie/patho/pro_manth01.htm.
59. Maragou N, Makri A, Lampi EN, Thomaidis NS, Koupparis MA. Migration of bisphenol A from polycarbonate baby bottles under real use conditions. *Food Addit Contam* 2007;25:373–83.

7. Literaturverzeichnis

60. Mariotti A. Sex steroid hormones and cell dynamics in the periodontium. *Crit Rev Oral Biol Med* 1994;5:27-53.
61. Marxkors R, Meiners H. Taschenbuch der zahnärztlichen Werkstoffkunde. Köln: Deutscher Zahnärzte Verlag; 2005. S. 270-5.
62. Meyer HE. Massenspektrometrie. In: Lottspeich F, Engels JW. (Hrsg): *Bioanalytik*. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag; 2006. S. 329.
63. Moors S, Diel P, Degen GH. Toxicokinetics of bisphenol A in pregnant DA/Han rats after single i.v. application. *Arch Toxicol* 2006;80:647-55.
64. Moszner N, Fischer UK, Angermann J, Rheinberger V. A partially aromatic urethane dimethacrylate as a new substitute for Bis-GMA in restorative composites. *Dent Mater* 2008;24:694-9.
65. Mouritsen A, Aksglaede L, Sorensen K, Mogensen SS, Leffers H, Main KM, Frederiksen H, Andersson AM, Skakkebaek NE, Juul A. Hypothesis: exposure to endocrine-disrupting chemicals may interfere with timing of puberty. *Int J Androl* 2010;33:346-59.
66. Nathanson D, Lertpitayakun P, Lamkin MS, Edalatpour M, Chou LL. In vitro elution of leachable components from dental sealants. *J Am Dent Assoc* 1997;128:1517-23.
67. Nerin C, Fernandez C, Domeno C, Salafranca J. Determination of potential migrants in polycarbonate containers used for microwave ovens by high-performance liquid chromatography with ultraviolet and fluorescence detection. *J Agric Food Chem* 2003;51:5647-53.
68. Noda M, Komatsu H, Sano H. HPLC analysis of dental resin composites components. *J Biomed Mater Res* 1999;47:374-8.
69. Nomura Y, Ishibashi H, Miyahara M, Shinohara R, Shiraishi F, Arizono K. Effects of dental resin metabolites on estrogenic activity in vitro. *J Mater Sci Mater Med* 2003;14:307-10.
70. Oehlmann J, Schulte-Oehlmann U, Bachmann J, Duft M, Oetken M, Lutz I, Kloas W, Terne TA. Bisphenol A als Xeno-Östrogen bei Vorderkiemenschnecken. 3. Statusseminar Chemikalien in der Umwelt mit Wirkung auf das endokrine System. 2005:19-37.
71. Olea N, Pulgar R, Perez P, Olea-Serrano F, Rivas A, Novillo-Fertrell A, Pedraza V, Soto AM, Sonnenschein C. Estrogenicity of resin-based composites and sealants used in dentistry. *Environ Health Perspect* 1996;104:298-305.

7. Literaturverzeichnis

72. Peters FT, Drummer OH, Musshoff F. Validation of new methods. *Forensic Sci Int* 2007;165:216-24.
73. Peters FT, Hartung M, Herbold M, Schmitt G, Daldrup T, Mußhoff F. Anforderungen an die Validierung von Analyseverfahren; Gesellschaft für toxikologische und forensische Chemie; 2009: S. 1-24.
74. Peters M. Einfluss verschiedener Parameter auf die Polymerisation von Befestigungskompositen. Diss. Ludwig-Maximilians-Universität zu München; München; 2004.
75. Poimenova A, Markaki E, Rahiotis C, Kitraki E. Corticosterone-regulated actions in the rat brain are affected by perinatal exposure to low dose of bisphenol A. *Neuroscience* 2010;167:741-9.
76. Pulgar R, Olea-Serrano MF, Novillo-Fertrell A, Rivas A, Pazos P, Pedraza V, Navajas JM, Olea N. Determination of bisphenol A and related aromatic compounds released from bis-GMA-based composites and sealants by high performance liquid chromatography. *Environ Health Perspect* 2000;108:21-7.
77. Rainelli A. Beiträge zur Miniaturisierung der Fliessinjektionsanalyse und der Kapillarelektrophorese. Diss. Philosophisch-Naturwissenschaftliche Fakultät der Universität Basel; Basel; 2005.
78. Rehmann K, Schramm KW, Kettrup AA. Applicability of a yeast oestrogen screen for the detection of oestrogen-like activities in environmental samples. *Chemosphere* 1999;38:3303-12.
79. Risikobewertung. Neue Studien zu Bisphenol A stellen die bisherige Risikobewertung nicht in Frage. Bundesinstitut für Risikobewertung; 2008. S. 1-2.
80. Roulet J-FR, Meyer G. Geschichte der Komposites. 2006 [zitiert 21.07.2010]. Verfügbar unter: http://www.erste-zahnarztmeinung.de/zahnwissen-kzvw/zahnwissen/specials/Komposites_Geschichte.htm.
81. Roy JR, Chakraborty S, Chakraborty TR. Estrogen-like endocrine disrupting chemicals affecting puberty in humans-a review. *Med Sci Monit* 2009;15:137-45.
82. Santerre JP, Shajii L, Tsang H. Biodegradation of commercial dental composites by cholesterol esterase. *J Dent Res* 1999;78:1459-68.
83. Schmalz G, Geurtsen W, Arenholt-Bindslev D. Die Biokompatibilität von Komposit-Kunststoffen. *zm* 2006;96:234-42.

7. Literaturverzeichnis

84. Schmalz G, Preiss A, Arenholt-Bindslev D. Bisphenol-A content of resin monomers and related degradation products. *Clin Oral Investig* 1999;3:114-9.
85. Schoeters G, Den Hond E, Dhooze W, van Larebeke N, Leijts M. Endocrine disruptors and abnormalities of pubertal development. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2008;102:168-75.
86. Schönfelder G. Stellungnahme zur Bestimmung von Bisphenol A in den Gummisaugteilen von diversen Beruhigungssaugern im Untersuchungszeitraum 28.09.2009 – 09.10.2009 durch die Umweltorganisation Global 2000. Medizinische Fakultät Institut für Pharmakologie und Toxikologie Lehrstuhl Toxikologie. 2009:1-2.
87. Schulte-Oehlmann U, Tillmann M, Casey D, Duft M, Markert B, Oehlmann J. Östrogenartige Wirkungen von Bisphenol A auf Vorderkiemenschnecken (Mollusca: Gastropoda: Prosobranchia). *UWSF – Z Umweltchem Ökotox* 2001;13:319-33.
88. Schweikl H, Hiller KA, Bolay C, Kreissl M, Kreismann W, Nusser A, Steinhauser S, Wiczorek J, Vasold R, Schmalz G. Cytotoxic and mutagenic effects of dental composite materials. *Biomaterials* 2005;26:1713-9.
89. Schweikl H, Spagnuolo G, Schmalz G. Genetic and cellular toxicology of dental resin monomers. *J Dent Res* 2006;85:870-7.
90. Schwengberg S, Bohlen H, Kleinsasser N, Kehe K, Seiss M, Walther UI, Hickel R, Reichl FX. In vitro embryotoxicity assessment with dental restorative materials. *J Dent* 2005;33:49-55.
91. Schwer C. Proteinanalytik. In: Lottspeich F, Engels JW. (Hrsg): *Bioanalytik*. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag; 2006. S. 272-3.
92. Segura JJ, Jimenez-Rubio A, Pulgar R, Olea N, Guerrero JM, Calvo JR. In vitro effect of the resin component bisphenol A on substrate adherence capacity of macrophages. *J Endod* 1999;25:341-4.
93. Shajii L, Santerre JP. Effect of filler content on the profile of released biodegradation products in micro-filled Bis-GMA/TEGDMA dental composite resins. *Biomaterials* 1999;20:1897-908.
94. Shokati B, Tam LE, Santerre JP, Finer Y. Effect of salivary esterase on the integrity and fracture toughness of the dentin-resin interface. *J Biomed Mater Res* 2010;94:230-7.
95. Söderholm KJ, Mariotti A. BIS-GMA-based resins in dentistry: are they safe? *J Am Dent Assoc* 1999;130:201-9.

7. Literaturverzeichnis

96. Soto AM, Sonnenschein C, Chung KL, Fernandez MF, Olea N, Serrano FO. The e-screen assay as a tool to identify estrogens: an update on estrogenic environmental pollutants. *Environ Health Perspect* 1995;103:113-22.
97. Staehle HJ. Eine Risikoabschätzung bei Kunststoff-Materialien. 2010 [zitiert 21.07.2010]. Verfügbar unter: <http://www.dr-menges.de/fk1103staehle.htm>.
98. Tilbrook AJ, Clarke IJ. Negative feedback regulation of the secretion and actions of gonadotropin-releasing hormone in males. *Biol Reprod* 2001;64:735-42.
99. Villalobos M, Olea N, Brotons JA, Olea-Serrano MF, Ruiz de Almodovar JM, Pedraza V. The E-screen assay: a comparison of different MCF7 cell stocks. *Environ Health Perspect* 1995;103:844-50.
100. vom Saal FS, Hughes C. An extensive new literature concerning low-dose effects of bisphenol A shows the need for a new risk assessment. *Environ Health Perspect* 2005;113:926-33.
101. Wagner B. Experimentelle Untersuchungen zum retroviralen Gentransfer in primäre Chondrozyten des Kaninchens: Entwicklung konstitutiver und Tetrazyklininduzierbarer Expressionssysteme. Diss. Ludwig-Maximilians-Universität; München; 2004.
102. Wagner M, Oehlmann J. Endocrine disruptors in bottled mineral water: total estrogenic burden and migration from plastic bottles. *Environ Sci Pollut Res Int* 2009;16:278-86.
103. Yamamoto T, Yasuhara A. Quantities of bisphenol a leached from plastic waste samples. *Chemosphere* 1999;38:2569-76.
104. Yokota H, Iwano H, Endo M, Kobayashi T, Inoue H, Ikushiro S, Yuasa A. Glucuronidation of the environmental oestrogen bisphenol A by an isoform of UDP-glucuronosyltransferase, UGT2B1, in the rat liver. *Biochem J* 1999;340:405-9.

8 Anhang

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich ein Dank an all diejenigen aussprechen, die mich bei meiner Arbeit mit Rat und Tat unterstützt und zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank geht an Herrn Prof. Dr. Jost-Brinkmann für das Überlassen des Themas. Ich danke ihm für den fachlichen Austausch und seine Anregungen, mit denen diese Arbeit bereichert wurde. Außerdem bedanke ich mich für seine kostbare Zeit, die er trotz seines strammen Zeitplanes, immer für Fragen und Diskussionen zur Verfügung gestellt hat.

Bei Herrn Oberarzt Dr. Christian Finke bedanke ich mich für sein unermüdliches Engagement, mit dem er diese Arbeit betreut hat. Zudem bedanke ich mich für die aufschlussreichen Gespräche, die sich in schwierigen Zeiten als eine große Motivation erwiesen haben.

Ferner danke ich der Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung, insbesondere Frau Prof. Dr. Nehls, Herrn Dr. Piechotta und Herrn Rothe für die Unterstützung zur Durchführung der Labortätigkeiten. Ich bedanke mich bei Frau Prof. Dr. Nehls für das Schaffen der räumlichen Voraussetzungen zur Durchführung der Versuche und für die fachliche Betreuung. Herrn Dr. Piechotta danke ich insbesondere für die sehr hilfreichen Anregungen während den Versuchsdurchführungen.

Außerdem danke ich meiner Familie für die Unterstützung und das Zureden in schlechten Zeiten. Ich möchte mich besonderes bei meinem Ehemann, Koray Ereğ, für seine Unterstützung und Motivation, aber auch für die zahlreichen wissenschaftlichen Anregungen und Ratschläge bedanken.

Lebenslauf Gökçen Erek

"Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht."

Abkürzungsverzeichnis

BPA:	Bisphenol A
BPA INT:	Bisphenol A interner Standard
BPA Q:	Bisphenol A Qualifier und Quantifier Ion
Cps:	counts per second
MRM-Übergang:	Multi Reaction Monitoring
Reststabw sy:	Reststandardabweichung
S/N:	Signal zu Rauschverhältnis
STD KAL:	Standard Kalibrierlösung
Verfahrensstabw sx0:	Verfahrensstandardabweichung
Wf:	Wiederfindung

Versicherung an Eides statt

Ich, Gökçen Erek, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Freisetzung von Bisphenol A aus Fissurenversiegelungsmaterialien in vitro. Eine Pilotstudie zur Frage, ob eine östrogene Wirkung denkbar ist.“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Ort, Datum

Unterschrift