

# 中國醫藥大學

碩士論文

編號：IEH-1517

複合式樹脂之唾液中釋出物固相微萃取高  
效液相層析儀分析方法研究

**SPME-HPLC Analytical Method  
Development for Eluted Composite Resins  
in Whole Saliva**

所 別：環境醫學研究所

指導教授：王文忻

學 生：黃龍成

學 號：9265017

中華民國 九十五年 七 月

## 誌 謝

在撰寫致謝的時候正是論文口試完那天，有口試完成的喜悅，但感到更深的難過，在老師的教誨下，真的成長了許多，不只單單在研究方面的發現問題、思考問題、解決問題，在思考方面也增加了邏輯能力，難過的是對於研究的態度無法達到老師的期望及要求。

在研究所階段，體驗到收穫與付出不一定是成正比，但這是一種必經的磨練，沒有解決不了的問題，只要你付出的夠多。

感謝王文忻老師這三年來無論是學識上的督促及指導或生活上關心，讓生活在異鄉的我，感受到實驗室有家的感覺，感謝論文口委-陳三餘老師在研究上總是不厭其煩的教導，讓對於牙科領域一開始一無所知的我，順利完成研究，同時感謝蔡素珍教授對論文的指導。

另外感謝賴俊雄院長，職安系趙克平老師、蔡詩偉老師、廖宏章老師及環醫所全體老師在課業上的指導。

感謝實驗室學弟妹在研究路上的相陪，感謝仕杭、思瑜、俊鳴學長實驗上的教導，還有早我一步先畢業的同窗好友聖鈞、延瑜、國源、建宗、雅萍、雅婷課業上協助，感謝對我無盡付出的家人。

老師常說不要跟別實驗室比，但還是會偷偷的比較，比完覺得真不公平，不公平的是我學到的東西比別人多很多，感謝你王文忻老師。

# 複合式樹脂之唾液中釋出物固相微萃取高效液相 層析儀分析方法研究

**目的：**複合式樹脂為牙科中常使用填補材料，其主要成分 Bis-GMA

(bisphenylglycidyl dimethacrylate)、TEGDMA (triethylene glycol

dimethacrylate)、UDMA (urethane dimethacrylate) 因聚合不完全

與唾液的侵蝕分解導致單體溶出進入人體, 造成健康危害。本研究

擬開發一個以直接固相微萃取( Solid-Phase Microextraction ;

SPME) 吸附的方式，結合高效液相層析儀(High Performance Liquid

Chromatography ; HPLC) 來分析唾液中樹脂溶出物，進而探討聚合

時間、溫度與 pH 影響溶出量的關係。

**方法：**本研究以 60  $\mu\text{m}$  Polydimethylsiloxane-divinylbenzene(PDMS/DVB)

纖維作為吸附介質，以直接法萃取樹脂溶出物。完成萃取後的纖

維浸入 HPLC 的 Chamber 進行靜態脫附，脫附完後進行分析。

實驗室技術建立時，製備標準溶液進行條件探討。研究探討的參

數包括：纖維種類、脫附溶劑、吸附時間、脫附時間、吸附溫度、

攪拌速度、及 pH 值。

於不同聚合時間: 20、40、60、80、120 秒；不同培養溫度: 0°C、

27°C、40°C; 不同 pH 值: 3.0、5.0、7.6、9.0、11.0 下，以商品 Tetric

Ceram 培養 7 日後分析，探討聚合時間、溫度、pH 值對溶出量的

影響，並探討樹脂於不同天數下釋出量的變化。

**結果：**1.SPME方法為：將標準品添加於未經pH值調整唾液中，裝滿4 mL vial，瓶中加入攪拌磁石，密封後於40°C、轉速200 rpm(0.18g)下，以60  $\mu$ m PDMS/DVB纖維直接吸附20分鐘，再以移動相(65 % 乙腈、35 %D.I.水)靜態脫附15分鐘。

2.在此萃取分析條件下，所求得的檢量線範圍為 TEGDMA：

0.3~30 $\mu$ g/mL；UDMA：0.5~50  $\mu$ g/mL；Bis-GMA：0.5~50 $\mu$ g/mL，其相關係數(r)皆在 0.995 以上；偵測極限分別為 TEGDMA：0.04  $\mu$ g/mL；UDMA：0.28  $\mu$ g/mL；Bis-GMA：0.06  $\mu$ g/mL。

3.複合式樹脂的溶出量隨著天數增加而增加，在第7日時達到一個較高值。

4.溫度與 pH 值皆會影響溶出，隨著溫度增加 UDMA、Bis-GMA 溶出量增加；隨著 pH 減少，溶出量隨著增加，而影響最大的是聚合時間，增加聚合時間可降低其溶出量。

**結論：**以Direct-SPME-HPLC的方式來分析樹脂溶出物，可省去繁雜的前處理步驟，同時其具有免溶劑、快速、方法簡便、以及不受樣本基質干擾等優點。

樹脂於唾液中的溶出物快速的被酵素分解，隨即進入人體循環系統，評估樹脂溶出物對人體健康的危害，應針對釋出物分解後產

物較適合。

在填補完牙齒的第一周，以漱口來降低口腔溫度，沖淡口腔酸性

環境，盡量少吃過熱及偏酸的食物，以減少溶出量。

**關鍵字：**複合式樹脂、單體溶出、固相微萃取、高效能液相層析儀



# SPME-HPLC Analytical Method Development for Eluted Composite Resins in Whole Saliva

**Objective :** Dental composite resin materials are widely used for fixing teeth.

The main components are BisGMA (bisphenylglycidyl dimethacrylate) 、TEGDMA (triethylene glycol dimethacrylate) 、UDMA (urethane dimethacrylate ). These resin monomers may be released due to incomplete polymerization and have cytotoxicity and genotoxicity to human. The purpose of this study is to develop an analytical method for determining the resin monomers in saliva using solid phase microextraction followed by high performance liquid chromatography (HPLC) analysis.

**Method :** The 60  $\mu\text{m}$  Polydimethylsiloxane-divinylbenzene(PDMS/DVB)fiber through direct extraction was tested to be the most suitable material for sample extraction. The SPME fiber was inserted into the injection chamber of HPLC and analyzed. The optimum extraction parameters investigated are pH 、extraction temperature, stirring speed, extraction time 、desorption time 、desorption solvent.

The effect of polymeric time (20 、40 、60 、80 、120s), temperature ( $0^{\circ}\text{C}$  、 $27^{\circ}\text{C}$  、 $40^{\circ}\text{C}$ ) and pH(3.0 、5.0 、7.6 、9.0 、11.0) to releasing amount are investigated. The test sample were polymerized for 120 s and stored in ethanol and saliva solution in room temperature with

noadjustment pH for 12 h, 24 h, 3, 5, 7 or 10 days to investigate influence of immersing solution and time.

- Results :**
1. The SPME method was placing magnetic stirring-bar in an 4 mL vial, stirring 200 rpm at 40 °C, PDMS/DVB fiber was used to perform direct solid-phase microextraction for 20 min and mobile phase(65 %acetonitrile:35 %D.I. water) desorption for 15 min.
  2. For the quality control calibration, the concentration ranges of TEGDMA, UDMA, and Bis-GMA were 0.3~30 µg/mL, 0.5~50 µg/mL, 0.5~50 µg/mL. The correlation coefficients(r) were all above 0.995. The method detection limit (MDL) for TEGDMA, UDMA, and Bis-GMA were 0.04 µg/mL , 0.28 µg/mL and 0.064µg/mL respectively.
  3. Results showed a maximum concentration of monomers after 7 days almost.
  4. Under longer polymeric time, can reducing the amount of releasing. With higher temperature and lower pH, releasing will increase.

**Conclusion :** The analytical method of eluted composite resins in whole saliva by Direct-SPME-HPLC can be reduced complicated pretreated procedure, as well as having the advantage of solvent-free, rapidity, simplicity, and avoid interfering with a complex matrix.

The enzyme of saliva will react with releasing fast and into blood circulation.

**Key word :** composite resins, monomer, solid phase microextraction, high performance liquid chromatography





# 目 錄

第壹章 序論.....	1
第一節 研究背景.....	1
第二節 研究目的.....	4
第三節 研究內容.....	4
第四節 研究假設.....	4
第貳章 文獻探討.....	5
第一節 填補牙材的演化.....	5
第二節 複合式樹脂及聚合.....	6
第三節 單體溶出、唾液分解與健康危害.....	9
第四節 物化性及毒性.....	11
(一) TEGDMA.....	11
(二) UDMA.....	11
(三) Bis-GMA.....	11
(四) 分解產物與毒性.....	11
第五節 傳統萃取唾液中溶出物方法.....	13
第六節 固相微萃取(Solid-Phase Microextraction).....	14
(一) 直接固相微萃取.....	14
(二) 頂空固相微萃取.....	15

(三) 固相微萃取裝置.....	16
(四) 固相微萃取操作程序.....	16
(五) 影響固相微萃取效率的因素.....	16
(六) 分配係數.....	21
(七) 固相微萃取法於生物檢體的應用.....	22
<b>第叁章 材料設備與方法.....</b>	<b>30</b>
<b>第一節 儀器設備與試藥.....</b>	<b>30</b>
(一) 試藥.....	30
(二) 設備.....	31
<b>第二節 儀器參數條件.....</b>	<b>34</b>
(一) HPLC 條件.....	34
(二) LC-MS 條件.....	35
<b>第三節 研究架構.....</b>	<b>36</b>
(一) HPLC 分析方法的建立.....	36
(二) 直接固相微萃取方法建立.....	36
(三) 分配係數.....	39
(四) 分析品質管制.....	39
(五) 真實樣本培養.....	40
<b>第肆章 結果與討論.....</b>	<b>48</b>

第一節 HPLC 分析.....	48
第二節 固相微萃取方法建立.....	49
(一) 固相微萃取纖維的選擇.....	49
(二) 萃取時間.....	49
(三) 脫附溶劑.....	49
(四) 脫附時間探討.....	50
(五) 萃取溫度探討.....	50
(六) 攪拌速度對萃取的影響.....	51
(七) 樣本 pH 值探討.....	51
第三節 分配係數.....	52
第四節 分析品質管制.....	53
(一) 檢量線建立.....	53
(二) 方法偵測極限(MDL).....	53
(三) 分析之精密度與準確度.....	53
第五節 真實樣本培養.....	54
(一) 市售複合式樹脂.....	54
(二) LC-MS-MS 質譜.....	54
(三) 聚合時間探討.....	54
(四) 溫度探討.....	55

(五) pH 值探討 .....	55
第六節 討論 .....	56
(一) 固相微萃取 .....	56
(二) 複合式樹脂 .....	59
第五章 結論與建議 .....	104
(一) 結論與建議 .....	104
(二) 未來發展 .....	105
參考文獻 .....	106



## 圖 目 錄

圖 2-1 TEGDMA, UDMA, Bis-GMA 結構圖 .....	24
圖 2-2 固相微萃取裝置分解圖 .....	25
圖 2-3 SPME-HPLC Chamber 圖解.....	26
圖 2-4 固相微萃取操作圖解 .....	27
圖 3-1 唾液樣本 SPME-HPLC 分析方法建立 .....	44
圖 3-2 真實樣本培養架構 .....	45
圖 3-2 SPME 實驗操作流程.....	46
圖 4-1 HPLC 分析圖 .....	62
圖 4-2-1a 纖維的探討 .....	63
圖 4-2-1b 不同纖維的 RSD 圖 .....	63
圖 4-2-2a 吸附時間對吸附量的影響 .....	64
圖 4-2-2b 吸附時間曲線圖 .....	64
圖 4-2-3a 脫附劑探討 .....	65
圖 4-2-3b 不同脫附劑下之 RSD 值 .....	65
圖 4-2-4a 脫附時間探討 .....	66
圖 4-2-4b 脫附時間曲線圖 .....	66
圖 4-2-4c 不同脫附時間下之 RSD 值 .....	67
圖 4-2-5a 萃取溫度探討 .....	68

圖 4-2-5b 不同萃取溫度下之 RSD 值 .....	68
圖 4-2-6a 攪拌速度探討 .....	69
圖 4-2-6b 不同攪拌速度下之 RSD 值 .....	69
圖 4-2-7a pH 值探討 .....	70
圖 4-2-7b 不同 pH 值下之 RSD 值 .....	70
圖 4-5-1a 商品 Tetric Ceram .....	71
圖 4-5-1b 商品 Spectrum .....	71
圖 4-5-1c 商品 Palfique Estelite .....	72
圖 4-5-1d 商品 Compoglass flow .....	72
圖 4-5-1e 商品 Dyract .....	73
圖 4-5-1f 商品 7 日釋出量比較 .....	73
圖 4-5-2a 標準溶液 TEGDMA LC-MS-MS 質譜圖 .....	74
圖 4-5-2b 樹脂培養液 TEGDMA LC-MS-MS 質譜圖 .....	74
圖 4-5-2c 標準溶液 UDMA LC-MS-MS 質譜圖 .....	75
圖 4-5-2d 樹脂培養液 UDMA LC-MS-MS 質譜圖 .....	75
圖 4-5-2e 標準溶液 Bis-GMA LC-MS-MS 質譜圖 .....	76
圖 4-5-2f 樹脂培養液 Bis-GMA LC-MS-MS 質譜圖 .....	76
圖 4-5-3 聚合時間影響釋出量探討 .....	77
圖 4-5-4 溫度影響釋出量探討 .....	78



## 表 目 錄

表 2-1 市售固相微萃取纖維 .....	28
表 2-2 各種纖維的耐受溫度 .....	29
表 3-1 市售複合式樹脂商品 .....	47
表 4-2-2 吸附時間探討 .....	80
表 4-2-3 脫附劑探討 .....	81
表 4-2-4 SPME 脫附時間探討 .....	82
表 4-2-5 SPME 萃取溫度探討 .....	83
表 4-2-6 攪拌與否探討 .....	84
表 4-2-7 pH 值探討 .....	85
表 4-3-a TEGDMA 低濃度分配係數 .....	86
表 4-3-b TEGDMA 高濃度分配係數 .....	86
表 4-3-c UDMA 低濃度分配係數 .....	87
表 4-3-d UDMA 高濃度分配係數 .....	87
表 4-3-e Bis-GMA 低濃度分配係數 .....	88
表 4-3-f Bis-GMA 高濃度分配係數 .....	88
表 4-4-1 檢量線製作 .....	89
表 4-4-2 方法偵測極限 .....	90
表 4-4-3 準確度與精密度測試 .....	92



表 4-5-3 聚合時間對溶出量影響 .....	95
表 4-5-4 溫度對溶出量影響 .....	98
表 4-5-5 pH 值對溶出量影響 .....	101



# 第壹章 序論

## 第一節 研究背景

銀汞合金為早期齲齒填補主要材料，銀汞合金充填材料在牙科填補的使用已超過一百五十年，由於銀汞合金在室溫下是一種可塑性的合金，可放到牙齒窩洞內進行充填，經過一段時間銀汞合金即可固化，但由於銀汞金屬會因口腔中之物理、化學作用而逐漸滲出，有汞危害之虞，危害人體健康，於是發展出聚合式複合樹脂。

聚合物(polymer)乃指分子量在  $10^4 \sim 10^6$  間，由許多的小分子彼此接合所產生的巨大分子，組成聚合物的單位分子稱為單體(monomer)而由小分子相互結合的過程稱為聚合作用(polymerization)。

聚合作用的發生需藉由單體彼此間相互結合而形成大分子，分子間的接合須靠單體中的共價雙鍵(covalent double bond)進行聚合，當能量加入(列如：光、熱或化學能)而促使聚合反應發生，就可形成分子量較大的聚合物<sup>1</sup>，牙科樹脂的形成就是單體與單體間發生聚合反應後的產物<sup>2</sup>。

牙科樹脂廣泛應用於牙科材料，如牙科臨時牙橋、人工牙齒及義齒基底材料等，填補牙齒所使用的複合式樹脂主要由不同成份材質所組成，聚合本體由丙烯酸酯類為主要原料並與其他單體聚合而成<sup>3</sup>，例如 Bis-GMA (bisphenylglycidyl dimethacrylate), TEGDMA(triethylene glycol dimethacrylate), UDMA(urethane dime-thacrylate) 等。

複合樹脂充填在早期是以化學自聚式硬化方式，由於硬度較差，只能用於前牙充填。在最近十年內發展非常快，主要的優點是和牙齒的顏色一樣，可以比色選擇，便宜、製作方便、修補容易而且安定性高<sup>4</sup>。

目前牙材樹脂應用於補牙技術是採用光聚合機使複合樹脂在瞬間硬化，硬度也和牙齒一樣，因此可用於牙齒的充填，因銀汞合金的金屬滲出導致健康危害，發展出取代的複合式樹脂材料，大量的使用了複合式樹脂一段時間之後，學者對於複合樹脂的研究陸續投入，諷刺的是，這些研究指出，複合式樹脂在聚合過程中，會因聚合條件不同：聚合方式、聚合溫度、樹脂材料等因素，有不同程度的單體溶出<sup>5</sup>。

在樹脂聚合的技術上，聚合不完全的問題一直存在<sup>6</sup>，研究指出聚合的程度範圍約 52-77%<sup>7、8、9、10</sup>，因聚合不完全或唾液的侵蝕分解<sup>11</sup>導致單體溶出進入人體，造成健康危害，且具細胞及基因毒性<sup>12</sup>，此外，牙科技術人員接觸這些物質也會造成接觸性皮膚炎或過敏現象<sup>13</sup>。

目前研究文獻中，針對牙材聚合物的釋出物分析<sup>14</sup>，以及溶出物與唾液分解後產物分析<sup>15</sup>，主要以高效液相層析儀法(High Performance Liquid Chromatography；HPLC)分析 TEGDMA、UDMA、Bis-GMA，主要原因是分子量及沸點高，另有文獻係使用氣相層析火燄離子化偵檢器分析 TEGDMA、Bis-GMA<sup>16</sup>。

大部分的研究，使用乙腈、乙醇、水、甲醇等溶劑當作複合樹脂溶

出培養液，唾液中含有特殊酵素會影響溶出的量<sup>17</sup>，評估健康效應以唾液當浸泡液是最適當的<sup>18</sup>。

傳統以唾液為浸泡液分析需複雜瑣碎的離心、溶液萃取等前處理步驟<sup>19</sup>相較於傳統的液-液相萃取，萃取程序複雜、費時且需要大量有機溶劑萃取造成日後廢液處理及環境污染問題，針對釋出單體 TEGDMA, UDMA, Bis-GMA 的分析，應用固相微萃取 (Solid-Phase Microextraction ; SPME) 之技術，進行水基質的樣本萃取，結合液相層析儀分析，可降低樣品處理的繁複手續，得到更有效率的分析結果，

以固相微萃取的方式，可整合取樣、萃取、濃縮及樣品注入等四個步驟於一個分析方法中，本研究擬開發直接浸入式固相微萃取(SPME)之高效液相層析儀(HPLC)分析方法，針對溶出單體 TEGDMA, UDMA, Bis-GMA 進行唾液中的樹脂溶出物檢測。

## 第二節 研究目的

- (一) 開發一個以直接浸入式固相微萃取結合液相層析儀的方法來分析唾液中牙材樹脂溶出物檢測的方法。
- (二) 探討影響樹脂溶出量的參數: 浸泡液溫度、浸泡液 pH 值、聚合時間。
- (三) 將探討完的影響釋出量參數套用於不同天數下乙醇浸泡 (HPLC 分析)與唾液浸泡(SPME-HPLC 分析)探討。

## 第三節 研究內容

- (一) 探討影響固相微萃取裝置吸附效率、脫附效率以及儀器設定等參數，進而探討分配係數，並執行檢量線製作、精密度、準確度、方法偵測極限。
- (二) 探討影響樹脂溶出因素: 浸泡液溫度、浸泡液 pH 值、聚合時間。
- (三)以開發之 SPME 方法比較唾液與非唾液浸泡液相同天數下釋出差別。

## 第四節 研究假設

- (一) Fick's First Law
- (二) Fick's second law

## 第貳章 文獻探討

### 第一節 填補牙材的演化

從西元1930年，各式各樣的材料開始被應用在移動性假牙的製作上，1937提出熱聚合樹脂Biolon商品來製作修補牙床(Prosthodontics gums)。到了1947年，一些用在製作臨時假牙的自聚式聚甲基丙烯酸甲酯樹脂(Polymethyl methacrylate)紛紛問市，在臨床上使用過後，發現聚甲基丙烯酸甲酯樹脂雖然有低的體積收縮度，但是有硬度不佳、容易斷裂與變色等問題，到了1960年代，學者以增加分子量形成共聚物的觀點提出了乙烯聚乙基丙烯酸甲酯(Vinyl polyethyl methacrylate)的材料<sup>20</sup>。

1969年，針對聚合過程中發生的高放熱與收縮現象可能造成的牙髓刺激與尺寸改變，提出了不同化學結構的乙基亞胺衍生物(Ethyl imine derivatives)之材料Scutan，此材料聚合後放熱較低、有較低的體積收縮度與反應後較少的單體含量等優點，但是它不像共聚物可任意添加材料，且表面硬度不佳，所以在市場上只風行一陣子<sup>21</sup>。

之後1980年推出了複合樹脂材料，宣稱以多種材料複合而成的結構，可以提供較高的斷裂強度，近幾年為了操作方便，出現了同時具有光聚合與自聚合的複合樹脂材料<sup>22</sup>。

## 第二節 複合式樹脂及聚合

複合式樹脂顧名思義就是由兩種以上不同化學物質單體聚合而成的樹脂，而現今市售複合式樹脂材料都是經過調配好的原料及比例而成的商品，主要的原料包括 TEGDMA, UDMA, Bis-GMA 等，不同的原料比例，會有不同的強度效果，列如增加 Bis-GMA 的比例會增加混合樹脂的強度，但是改變此比例也降低樹脂的滲透能力<sup>23</sup>。

現今聚合複合式樹脂的方式大部份為光聚式，所謂的光聚合複合樹脂通常使用 camphoroquinone 或 benzyl 作為聚合起始劑，而三級胺 (amine) 則作為加速劑。當聚合作用不完全時，除了影響樹脂本身的機械性質、體積穩定度、水份吸收及溶解度外，也造成邊緣染色及變色、二次蛀牙、釋出的單體與牙本質接觸，甚至對牙髓造成刺激<sup>24</sup>。

一般牙科樹脂依聚合反應的發生方式，主要可分為三類，分別為自聚式 (autopolymerization)、熱聚式 (heat-polymerization) 及光聚式 (light-polymerization)。

自聚式的材料內之聚合物粒子、單體及增塑劑 (plasticizer) 的比例含量經適當調配，施與壓力作用即可自行聚合。熱聚式的樹脂是在粉劑與液劑混合均勻後、須加熱或置於熱水中使聚合反應完成。光聚式的材料通常作成凝膠式 (gel type) 的包裝，暴露於可見光下即可起始聚合反應，而本研究所使用的光聚型複合樹脂的聚合程度受到三方面的影響，

如材料因素:包括樹脂的化學成分、填料的大小;光學因素:樹脂的色度、透光性、折射係數等,以及可見光照射的強度和時間<sup>24</sup>。

三種不同的聚合方式,在顏色穩定性、邊緣密合度、表面硬度、斷裂強度、抗磨損度、生物相容性等特性上,各有優缺點:1996年 Wang 等研究熱聚式與自聚式樹脂在衰退處理後之顏色變化發現,熱聚式比自聚式產生的顏色變化較小<sup>25</sup>;1998年 Stavros A. 等比較三種聚合方式的樹脂浸泡在水、咖啡與茶後之顏色變化發現,熱聚式較自聚式顏色變化少,光聚式樹脂是顏色變化最多的<sup>26</sup>。

1998年 Michele 等比較光聚式與自聚式複合樹脂的斷裂強度,發現光聚式複合樹脂表現較佳<sup>21</sup>。

1989年 Russell 等對自聚式與光聚式複合樹脂作牙刷磨耗實驗,發現光聚式複合樹脂的抗磨損度較好<sup>27</sup>;1990年 Mohd. Zainal 等針對牙科常用材料的抗磨損度,作一資料整理評估,複合式樹脂的部份,光聚式較自聚式佳<sup>28</sup>。

在生物相容性部分,樹脂的釋出單體會對牙周組織與口腔組織產生刺激而引起過敏反應,2001年 Tai 等以人類口腔上皮細胞株 (Human oral epithelial KB cell) 與初代口腔纖維母細胞 (Primary human oral fibroblast) 觀察三種聚合方式的樹脂釋出細胞毒性,其中自聚式的細胞毒性是最高的<sup>29</sup>。



由以上文獻回顧可知三種聚合方式各有優缺點自聚式樹脂在顏色穩定度、橫向斷裂強度表現較佳，而光聚式樹脂在表面硬度、抗磨損力、生物相容性方面表現較佳，此外如自聚式樹脂較其他聚合方式經濟，光聚式的聚合讓操作者有足夠的時間塑形，且光聚式操作方便，目前修補大部分是使用光聚式，所以本研究所使用的複合樹脂皆為光聚式樹脂。



### 第三節 單體溶出、唾液分解與健康危害

樹脂的聚合是不完全的，以自聚式材料而言，1977年 Ruyter 等以紅外線光譜儀研究，六種自聚式樹脂聚合程度，得到了聚合程度只有 52-75%<sup>8</sup>；1982年 Asmussen 等以紅外線光譜儀分析自聚式複合樹脂的聚合程度，發現聚合程度僅達 57-77%<sup>9</sup>；1984年 Ferracane 等亦對自聚式無填料複合樹脂聚合程度作研究，經傅立葉紅外線光譜儀分析(Fourier Transform Infrared Spectrometer: FTIR)得到 55-72%的聚合程<sup>10</sup>。

2000年 Huang 等針對自聚式、熱聚式、光聚式的樹脂泡水七天的釋出單體作一比較，顯示自聚式樹脂溶出量最高，熱聚式其次，而光聚式最低<sup>30</sup>。

對於單體釋出量的檢測方法有傅立葉紅外線光譜法<sup>10</sup>、氣相色層分析法(Gas chromatography)<sup>16</sup>、高效能液相層析法(High performance liquid chromatography)<sup>15</sup>與碳十四核磁共振法(Carbon-14 Nuclear Magnetic Resonance: NMR)<sup>31</sup>，傅立葉紅外線光譜法偏向於定性分析，碳十四核磁共振法的設備昂貴，高效能液相層析技術較氣體色層分析廣為人使用。

除了溶出單體，研究更指出聚合好的樹脂於口腔環境中，有水解及酵素分解的反應<sup>14</sup>，如TEGDMA會與pseudocholesterase (PCE)分解產生methacrylic acid (MA) 以及triethylene glycol (TEG)；Bis-GMA 會與cholesterol esterase (CE) 分解產生methacrylic acid (MA)、bis-hydroxy-

propoxyphenyl propane (bis-HPPP)以及ethoxylated bisphenol A (E-bisPA)

15。

口腔中的環境複雜，牙科複合樹脂在口腔中除了處於潮濕的狀態外，還有多種酵素及微生物，因此釋出單體發生氧化或水解的機會更大，也就更容易對細胞有不同程度影響。

溶出單體與分解後產物，與人體口腔有直接接觸之虞，且直接進入人體循環體系，對於健康造成的更大的引響，1999對於丙烯酸的動物實驗中，讓懷孕母鼠每天6小時吸入0~300ppm丙烯酸6~20天，發現會造成出生老鼠體重不足，也會造成慢性胃炎，引起過敏反應及改變代謝路徑<sup>32</sup>，此外唾液與樹脂的反應機制、溶出樹脂單體經酵素反應後之產物物種及產量，對於人體健康影響甚巨<sup>15</sup>。

## 第四節 物化性及毒性

### (一)TEGDMA<sup>33</sup>

Triethylene glycol dimethacrylate (TEGDMA)俗稱3G，在複合樹脂中可稀釋Bis-GMA、UEDMA的黏度，常溫下為輕微的紅褐色，分子量為286.33g/mol、沸點為162° C(760torr)、閃火點為167° C(閉杯)、密度為1.072 g/cm<sup>3</sup>、分子式為C<sub>14</sub>H<sub>22</sub>O<sub>6</sub>、結構式如附圖2-1；在動物實驗部份，LD50：10837 mg/Kg(大鼠，吞食)，對肺部及呼吸系統有損害，此外大鼠在500 UMOL/L的暴露下，對於肺部細胞有致突變性。

### (二)UDMA<sup>33</sup>

Urethane dimethacrylate (UDMA)，為複合樹脂主要材料之一，以不同比例的UDMA與TEGDMA混合，產生不同強度的複合樹脂，分子量為470 g/mol，常溫下為黏稠液體，蒸氣壓 < 1mmHg、沸點200° C、密度1.11 g/mL at 25 °C分子式為C<sub>25</sub>H<sub>38</sub>O<sub>6</sub>N<sub>2</sub>、結構式如附圖2-1。

### (三)Bis-GMA<sup>33</sup>

2,2-bis[4(2-hydroxy-3-methacryloyloxy-propyloxy) -phenyl] propane (Bis-GMA)與UDMA的功能相似，在常溫下幾乎成為固狀，分子量為512.59 g/mol、密度1.161 g/mL at 25 °C，分子式為C<sub>29</sub>H<sub>36</sub>O<sub>8</sub>、結構式如附圖2-1。

### (四)分解產物與毒性

在牙科發現釋出的MA會造成口腔黏膜的刺激(irritation)、發炎

(inflammation)及過敏反應(allergic response)<sup>32</sup>，此外MA經細胞內溶小體(microsome)中的脫酸酯酶(carboxylesterase)水解作用，會生成甲醇，甲醇經氧化作用的結果可生成福馬林，可造成患者的過敏症(hypersensitivity)。

TEGDMA, UDMA, Bis-GMA這些由丙烯酸所衍生的單體會發生水解反應，產生丙烯酸<sup>34</sup>，造成慢性胃炎及改變代謝途徑，且以不同的丙烯酸甲酯聚合物與口腔纖維母細胞培養，發現對細胞具有毒性<sup>35</sup>。

2000年Cimpan等以牙科樹脂材料進行研究，結果發現隨著材料劑量的增加，人類淋巴球細胞株U-937發生細胞凋亡與細胞壞死的比例隨之增加<sup>36</sup>，在1995年Ratanasathien等針對釋出單體作毒性比較，其中Bis-GMA的毒性最高，UDMA次之，TEGDMA最低<sup>37</sup>，雖然TEGDMA的毒性最低，但在1988年Fujisawa等研究中指出，TEGDMA會誘發微粒體的脂質層進行過氧化反應<sup>38</sup>，毒性更高的UDMA, Bis-GMA對人體的毒性危害可想而知。

## 第五節 傳統萃取唾液中溶出物方法

傳統方法是利用有機溶劑將浸泡好之樹脂微量溶出物萃取出來，經離心、濃縮後，再以注射針取出唾液上清液。如 Larsen 等 1991 年的研究就是將唾液樣本先離心後再取 100  $\mu\text{L}$  的唾液樣本上清液加上 50  $\mu\text{L}$  的乙醇進行液-液相萃取，經離心後以注射針取出上清液，之後再以液相層析儀來進行分析<sup>39</sup>；Atkinson 等 2002 年的研究是將經離心之後 1 mL 的唾液樣本上清液加入 1 mL 的正己烷及 1 mL 乙酸乙酯進行液-液相萃取，離心後以注射針取出上清液，再以氣相層析儀來進行分析<sup>40</sup>。但是液-液萃取法是一種複雜且多步驟的前處理方式，容易造成樣品流失或受到污染，此外，方法中使用有機溶劑，則會造成分析者的暴露，以及溶劑污染、廢棄處理等問題。

## 第六節 固相微萃取(Solid-Phase Microextraction)<sup>41~45</sup>

相較於傳統液-液相萃取的方法，固相微萃取法不僅免溶劑使用並且結合了取樣、萃取、濃縮及樣本導入等四個步驟於一個方法中，可大幅減少分析時間、降低分析物基質干擾、降低人為誤差、裝置簡單、能快速有效的處理樣本等優點。其最大的特色在於免溶劑使用，不但省去許多繁雜的前處理步驟，更能減少有機溶劑的使用及避免污染產生。

固相微萃取依不同的取樣方式又可分為直接固相微萃取法(Direct immersed SPME)和頂空固相微萃取法(Headspace SPME)兩種，直接固相微萃取法是將萃取纖維直接浸入樣本基質中，待纖維塗布物質、樣本間達成固液相平衡後即完成萃取，有較佳的吸附效果；而頂空固相微萃取法是以萃取纖維吸附揮發至頂空之分析物，待纖維塗布物質、樣本、樣本頂空空間達成固、液、氣三相平衡後即完成萃取，其可避免樣本基質干擾以及保護纖維。

### (一) 直接固相微萃取<sup>42、45</sup>

固相微萃取主要是利用分析物質在樣本基質與纖維上塗布之固定靜相進行分配反應，當分配達到平衡時，吸附在固定靜相上的量可以下列方程式(1)來表示：

$$n = \frac{K_{fs} V_f C_0 V_s}{K_{fs} V_f + V_s} \quad (1)$$

$n$ ：吸附在固定靜相上分析物之質量  
 $V_f$ ：固定靜相之體積  
 $V_s$ ：樣品體積  
 $K_{fs}$ ：分析物在固定靜相與樣品間之分配係數  
 $C_o$ ：樣品中分析物之原始濃度

由於固定靜相的體積相對於樣本體積來說是相當小的( $V_s \gg K_{fs} V_f$ )，因此方程式(1)可以簡化為方程式(2)：

$$n = K_{fs} V_f C_o \quad (2)$$

由方程式(2)可得知，SPME纖維固定靜相上所吸附的量與樣本體積沒有關係，只與固定靜相的體積、分析物在固定靜相與樣品間之分配係數、以及樣品中分析物之原始濃度相關。

然而此萃取技術達平衡的時間受限於披覆固定靜相與分析物擴散速率來決定，當萃取液態樣本時，披覆固定靜相與樣本間存在一薄的水層膜造成分析物與披覆固定靜相之擴散速率減緩，取得平衡的時間相對的拉長。

## (二) 頂空固相微萃取<sup>42、45</sup>

面對分析物或基質較為複雜污穢的樣本而言，為避免污染SPME纖維影響其使用壽命，遂由直接固相微萃取法延伸出另一種萃取法，即頂空固相微萃取法。

頂空固相微萃取法即先將欲分析之物質先揮發到樣本上方的頂部空間，再將吸附纖維伸入到樣本頂空進行吸附，此方法針對分配係數較高或基質複雜之生物檢體由於氣體擴散係數大，所以能縮短達平衡的時



間，同時不會有汙染纖維的問題<sup>44</sup>，但對於揮發性低的分析物，即分配係數較低，較適合直接萃取。

### (三) 固相微萃取裝置

SPME 裝置是由兩個部份所組成，其一為纖維固定器(SPME holder)，另一為塗佈有吸附介質的固相微萃取纖維(SPME fiber)，纖維必須經由纖維固定器推出與樣本接觸。此外，由於 SPME 纖維上塗布之吸附介質相當脆弱易脫落，所以纖維外部以不鏽鋼針管保護之，於使用前才將纖維推出。詳細分解圖見附圖 2-2<sup>47</sup>。

### (四) 固相微萃取操作程序

進行樣品萃取時，首先將設定好長度之不鏽鋼針頭穿過樣品瓶墊片，再將推桿推至底後固定，使纖維由不鏽鋼管中伸出並固定於樣品瓶中。當分析物與纖維分配反應達平衡時，便可將纖維縮回，並抽離樣品瓶，即完成萃取樣品的步驟；分析時，只需將不鏽鋼管插入HPLC –SPME Chamber中圖2-3，再將纖維以相同的方式推出進行溶劑脫附即可<sup>49</sup>。詳細步驟如附圖2-4<sup>49</sup>。

### (五) 影響SPME-HPLC直接萃取效率的因素<sup>42、44、45、48</sup>

固相微萃取技術已發展多年，已有許多文獻說明了影響固相微萃取吸附效率的因素，統整文獻上曾提及的因素，一般而言影響SPME-HPLC直接萃取效率的因素有(1) SPME纖維的種類 (2) 萃取時間 (3) 脫附溶劑

(4) 脫附時間 (5) 萃取溫度 (6) 攪拌之影響 (7) pH值 (8)動態脫附及靜態脫附，綜合以上的因子詳細敘述如下：

(1) SPME纖維對萃取效率的影響<sup>46</sup>

在進行直接萃取較佳分析方法條件討論之前，必須先針對分析物的特性，選擇一適合的吸附介質。目前已商業化的吸附纖維共有七種如附表 2-1<sup>46</sup>，不同的纖維塗布著不同的固定靜相，固定靜相的極性、厚度、表面積、耐溫溫度皆會影響萃取效率。

其中 Polyacrylate (PA), Carbowax-divinylbenzene(CW/DVB), Carbowax-templated resin (CW/TPR ) 纖維屬於極性纖維，主要用於萃取極性分析物；Polydimethylsiloxane (PDMS)纖維屬於非極性纖維，主要是用於萃取非極性分析物；其他的三種纖維都是由兩種以上不同性質的聚合物所塗布而成；Carboxen-polydimethylsiloxane(CAR-PDMS), Polydimethylsiloxane-divinylbenzene(PDMS/DVB), Divinylbenzene-Carboxen-PDMS(DVB/CAR/PDMS)這三種纖維皆可用來同時吸附不同性質的分析物。

從 SPME 眾多的研究之中，針對分析物的特性選取 FIBER 類型的重點，有以下六點：

1. 極性分析物選擇極性纖維，非極性分析物選擇非極性纖維。
2. 多種分析物，且特性不同時，選擇雙極性纖維。
3. 極性對於小分子量(<150)分析物影響不大，對於大分子量分析物影響

較大。

4. 萃取小分子量分析物，CAR/PDMS 是萃取效率最好的纖維。
  5. 有塗布 Carboxen 的纖維，萃取大分子量和有極性的分析物的效率較差。
  6. CW/DVB 和 Polyacrylate 纖維最適合萃取大分子量和有極性的分析物。
- 所以在選擇纖維時應針對分析物的極性、分子量、揮發性等特性，選擇一較佳萃取纖維，而本研究中所分析的四種化學物質中，TEGDMA 較具揮發性且分子量低，故挑選 50  $\mu\text{m}$ CW/TPR 為測試纖維，而 UDMA, Bis-GMA 較不具揮發性且分子量大，針對三種分析物極性、分子量差異大的特性，挑選 60  $\mu\text{m}$ PDMS/DVB, 50/30  $\mu\text{m}$ DVB/CAR/PDMS 為測試纖維，此外挑選與分析物分子結構式相似的 85  $\mu\text{m}$ Polyacrylic 為測試纖維，附表 2-2 為四種測試纖維的使用溫度以及操作時間<sup>46</sup>。

## (2) 萃取時間<sup>42, 45</sup>

萃取時間主要是和所選擇吸附纖維的種類以及分析物性質有關，吸附纖維的分配係數越大，吸附量越多，其吸附平衡時間越長；而膜越厚，吸附量越多，同樣的吸附平衡時間也越長。

而在進行吸附時，吸附量並不是隨著時間的增長而無限量的增加；其吸附量增加的最大量，是依據分析物在固相微萃取纖維的靜相與樣本之間質量的傳遞，傳遞達平衡，即表示達吸附平衡，即使吸附時間再增

長，吸附量並不會再增加。

### (3) 脫附劑<sup>48</sup>

SPME-HPLC的纖維脫附是以脫附劑來進行的，所以脫附劑的選擇對於脫附效率影響甚巨，一般脫附劑選擇LC移動相，或其他可溶解樣品的溶劑，以不影響分析及損害纖維為原則。

### (4) 脫附時間<sup>42、45</sup>

當固相微萃取纖維完成吸附萃取後，繼之的就是以溶劑脫附的方式將分析物從靜相上脫附下來。當脫附時之脫附時間太短會使得吸附在靜相上之分析物無法完全脫出殘留在纖維上，會對定量上產生誤差以及造成纖維下一次使用時連續污染現象；若脫附時間太長則會對纖維造成損害而影響其使用壽命。而不同的纖維材質對脫附時間也有不一樣的要求，故慎選脫附時間不僅可確保分析之準確性，更能延長萃取纖維的使用壽命。

### (5) 萃取溫度<sup>41、44、45</sup>

固相微萃取纖維吸附分析物質會受到萃取時溫度的影響，可從兩方面來進行討論。在動力學上當增加吸附溫度時會使樣本擴散速率增加，進而對分析物的吸附量也會增加，同時達平衡所需的時間亦會縮短，若以相同的吸附時間來比較，增加萃取溫度，纖維所吸附的分析物也會呈現增加趨勢。以熱力學的角度來看，由於吸附是屬於放熱反應，分配係

數K會隨著溫度上升而降低，故樣本吸附量會下降。

因此在整個吸附的過程中這兩個因素會相互影響，一般而言在吸附未達平衡前，當溫度較高時會增加纖維的吸附量，而達平衡後熱力學繼而影響整個吸附，增加吸附溫度使分配係數K下降，反而使纖維上已吸附之分析物再度被脫附，故會使吸附量下降，因此分析時選擇一適當的萃取溫度是非常重要的<sup>44、45</sup>。

#### (6) 攪拌之影響<sup>44、45</sup>

一般而言，萃取時當樣本處於靜止狀態時，與達吸附平衡時間有相關者為分配係數K以及固定靜相的體積；若樣品處於攪動的狀態時，由於質傳性質不同，對於平衡時間、偵測極限及萃取回收率的相對標準偏差造成影響，故理論上對唾液樣品進行攪拌，可縮短達平衡的時間。而造成攪動的方式有magnetic stirring、vortex mixing、fiber moving、sonication等，而以magnetic stirring較常應用在固相微萃取上<sup>44</sup>。

#### (7) pH值<sup>45</sup>

分析樣本之 pH 值對萃取效率的影響取決於分析物質本身的種類。從文獻中發現，pH 值的改變對一般的分析物並不會有所影響，如鹵化醚類、硝基苯類或芳香族碳氫化合物等，pH值的改變對萃取效率並無明顯影響，唯有對酚類化合物時，若將 pH 值調整至較低時會使酚類解離而提升萃取量<sup>42、49</sup>。

## (8) 動態脫附及靜態脫附<sup>48</sup>

一般 SPME-HPLC 脫附分為動態及靜態脫附，動態脫附即所謂的移動相直接脫附，將吸附好的纖維置入脫附chamber中後，直接以移動相進行脫附且直接進入分析管柱進行分析，也就是脫附與分析同時進行，優點在於可省去脫附時間；而靜態脫附是先將脫附chamber注入選定好的脫附劑，再將吸附完成後之纖維置入其中進行脫附，待脫附完成後，取出纖維後才進行分析，與動態脫附比較起來有較佳的脫附效果，考慮脫附效率及纖維的使用壽命，研究選擇靜態脫附。

### (六) 分配係數

選定較好的SPME參數即可得一較高分配係數，也就是較佳的吸附效率，吸附在固定靜相上的量可以下列方程式(1)來表示：

$$n = \frac{K_{fs} V_f C_0 V_s}{K_{fs} V_f + V_s} \quad (1)$$

$n$ ：吸附在固定靜相上分析物之質量

$V_f$ ：固定靜相之體積

$V_s$ ：樣品體積

$K_{fs}$ ：分析物在固定靜相與樣品間之分配係數

$C_0$ ：樣品中分析物之原始濃度

由於固定靜相的體積相對於樣本體積來說是相當小的( $V_s \gg K_{fs} V_f$ )，因此方程式(1)可以簡化為方程式(2)：

$$n = K_{fs} V_f C_0 \quad (2)$$

$$K_{fs} = \frac{n}{C_0 V_f} \quad (3)$$

由方程式(3)可知分配係數可經由固定靜相吸附量、固定靜相體積、及樣

本濃度求得。

#### (七) 固相微萃取法於生物檢體的應用

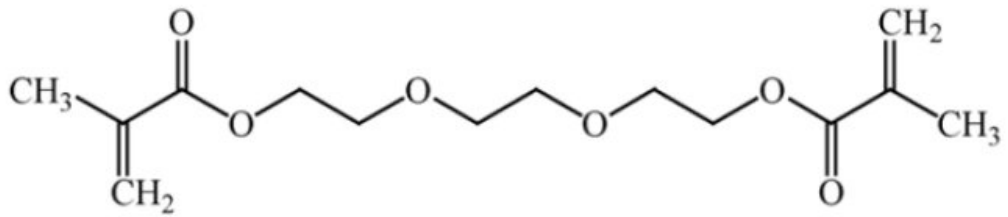
固相微萃取技術除了環境分析上的應用外，應用於基質複雜的生物檢體時由固相微萃取所衍生出的頂空固相微萃取法由於固定靜相僅於樣本頂部空間來進行萃取，避免了樣本基質污染纖維同時亦能保護並延長纖維使用壽命。

目前固相微萃取法於生物檢體的技術最常應用於藥物分析以及刑事科學上的應用，如從尿液檢體中檢驗 MDMA、安非他命藥物濫用的情形<sup>50</sup>；從血液樣本中檢測酒精中毒以及麻醉劑的使用<sup>51</sup>；從血漿及唾液樣本中檢測類固醇及安眠藥<sup>52</sup>；以及牛乳中戴奧辛的汙染等，由以上的應用例子可知 SPME 對於生物檢體的檢測方法是多元且可行的，牙科材料的危害評估相關研究略顯不足，以 SPME 的特性應用於唾液檢體檢測，是可行的，2004年Ortengren等針對HQ(Hydroquinone monomethyl ether)、bisphenol-A(4,4-Isopropylidenediphenol)、TEGDMA、EGDMA(Ethylene glycoldimethacrylate)、MMA(Methyl acrylate)、MA(Methacrylic)六種低分子物質開發SPME-GC-MS方法，而主要高分子量材質UDMA、Bis-GMA無法同時分析，以HPLC結合SPME進行分析是較適合的<sup>53</sup>。

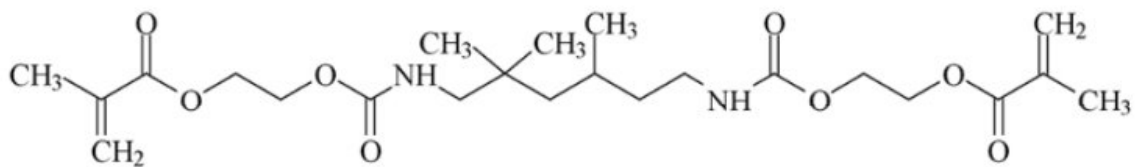
## 第貳章 圖表附錄



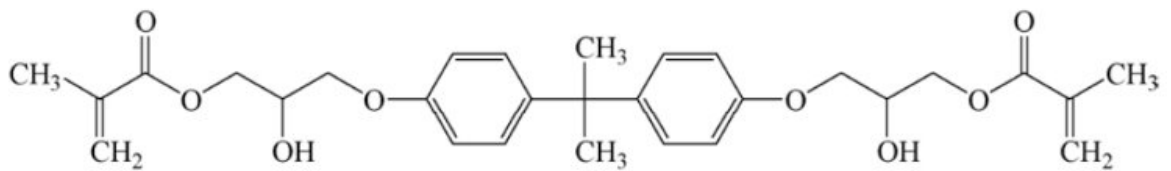




TEGDMA



UDMA



Bis-GMA

圖2-1 TEGDMA, UDMA, Bis-GMA結構圖

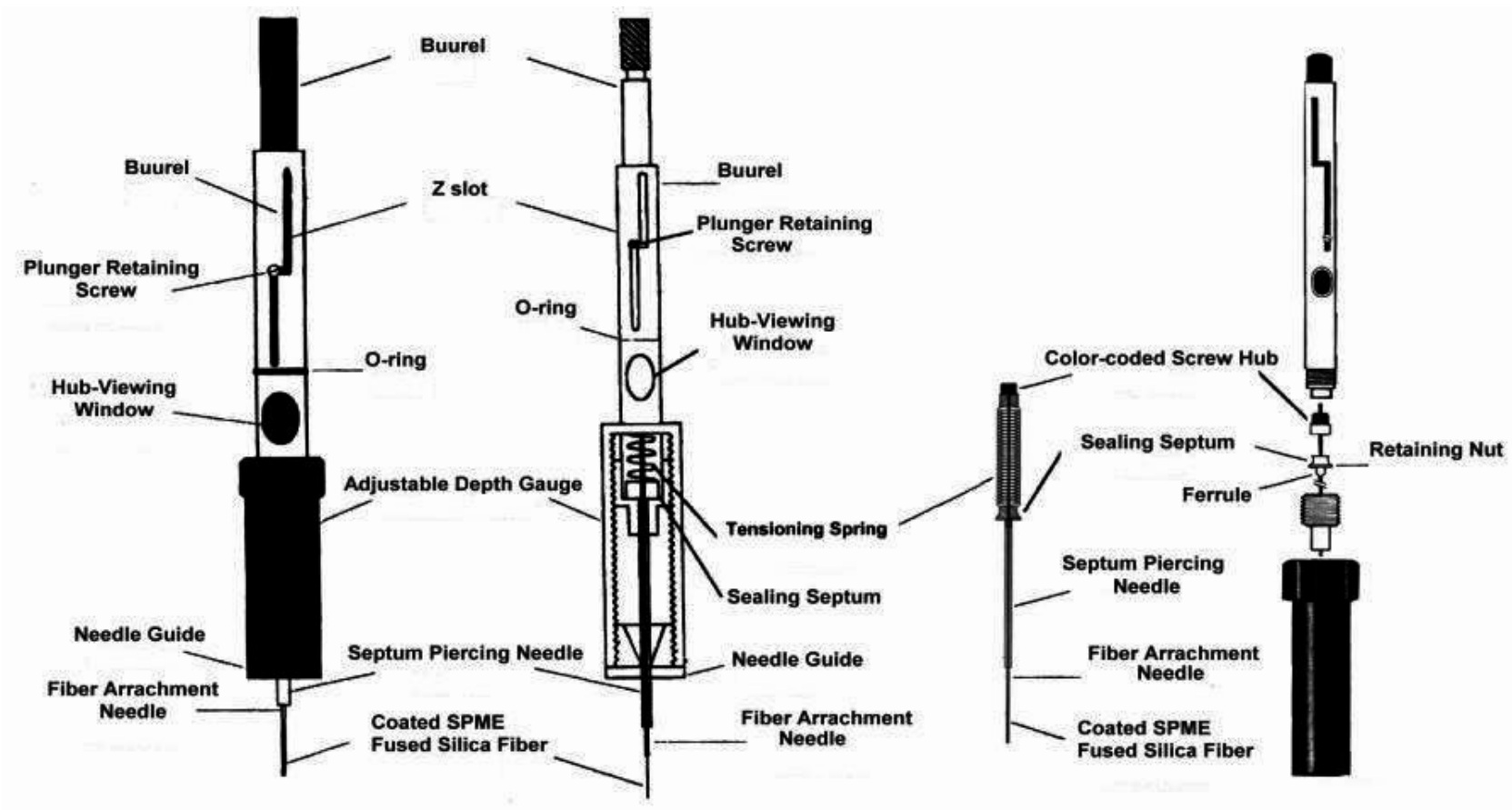


圖 2-2 固相微萃取裝置分解圖(SUPELCO 2000)<sup>47</sup>

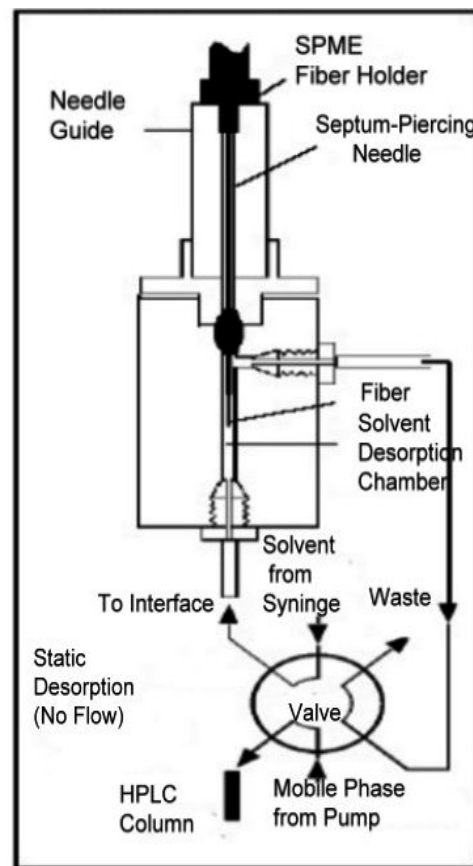
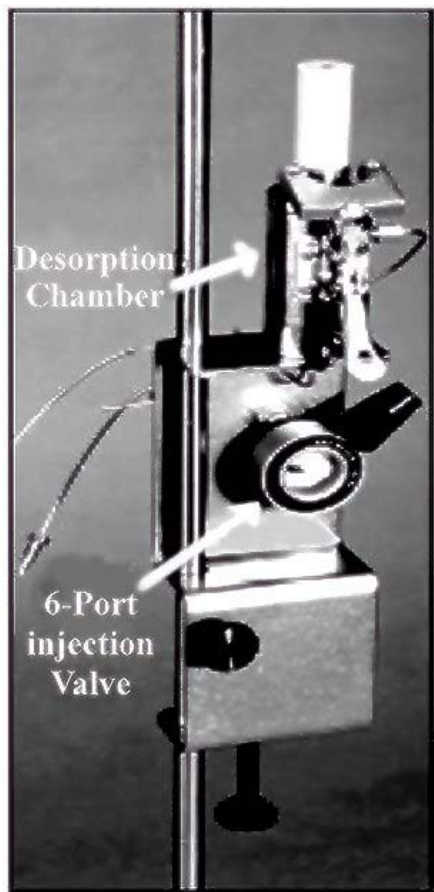


圖 2-3 SPME-HPLC Chamber 圖解<sup>49</sup>

針頭刺穿墊片    伸出纖維進行    收回纖維並    針頭插入    伸出纖維進入    收回纖維並  
 萃取    抽離注射針頭    HPLC Interface    Chamber 進行脫附    抽離針頭

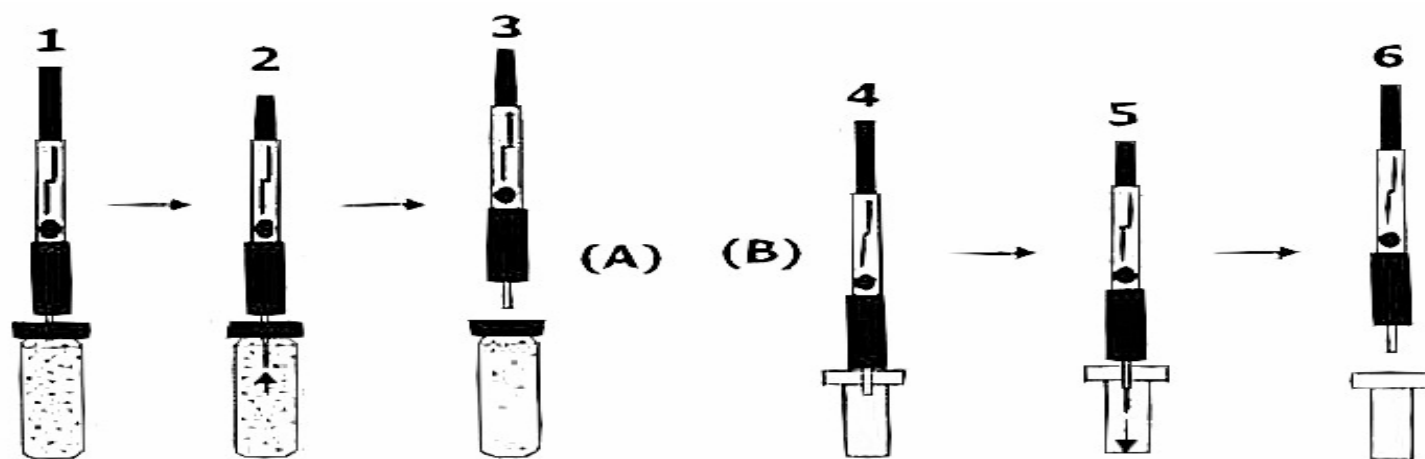


圖 A 為吸附過程

圖 B 為脫附過程

圖 2-4 固相微萃取操作圖解<sup>49</sup>

Commercially available SPME fibers

Stationary phase and film thickness	Abbreviation	General application ( analyte type )
Polydimethylsiloxane (100 $\mu\text{m}$ )	PDMS	Non-polar, volatile
Polydimethylsiloxane (30 $\mu\text{m}$ )	PDMS	Non-polar, volatile and semi-volatile
Polydimethylsiloxane (7 $\mu\text{m}$ )	PDMS	Non-polar, semi-and non-volatile
Polydimethylsiloxane-divinylbenzene(65 $\mu\text{m}$ )	PDMS-DVB	Polar
Polyacrylate (85 $\mu\text{m}$ )	PA	Polar, general use
Carboxen-polydimethylsiloxane (75、85 $\mu\text{m}$ )	CAR-PDMS	Volatile, gaseous, trace analysis
Carbowax-divinylbenzene (65、75 $\mu\text{m}$ )	CW-DVB	Polar, volatile (low temperature limit)
Carbowax-templated resin (50 $\mu\text{m}$ )	CW-TPR	Polar, HPLC
Divinylbenzene-carboxen-PDMS (50/30 $\mu\text{m}$ )	DVB-CAR-PDMS	Broad range of polarities from $\text{C}_3$ to $\text{C}_{20}$

表 2-1 市售固相微萃取纖維(Supelco,SPME application Guide.1999)<sup>46</sup>

Stationary Phase	Film Thickness	pH	Maximum Temp	Recommended Operating Temp	Conditioning Temp	Time (Hrs.)
PDMS	100µm	2-10	280 °C	200-280 °C	250 °C	0.5
PDMS/DVB	65 µm	2-11	270 °C	200-270 °C	250 °C	0.5
PA	85 µm	2-11	320 °C	220-310 °C	300 °C	2
CW/TPR	50 µm	2-11	260 °C	200-250 °C	220 °C	0.5
DVB/CAR/PDMS	50/30 µm	2-11	270 °C	230-270 °C	270 °C	1

Source : Supelco, SPME application Guide. 1999

表 2-2 各種測試纖維的耐受溫度<sup>46</sup>

## 第叁章 材料設備與方法

### 第一節 儀器設備與試藥

#### (一) 試藥

1. 乙醇(Ethanol): Anhydrous 99.5%, NASA, Lot : 014937( Fair Lawn, New Jersey, USA.)
2. 乙腈(Acetonitrile): HPLC solvent, J.T. Baker, Lot: A36808 ( Phillipsburg, New Jersey, USA.)
3. TEGDMA (Triethylenglykol-dimethacrylat): 95%, ALDRICH, Lot: 09004BC-184(Aldrich Chemie Gmbh, Riedstr. 2, D-89555. Steinheim, Germany)
4. UDMA (Urethane dimethacrylate): Shinnakamura Kagaku. (Wakayama, Japan)
5. Bis-GMA (2, 2-bis [4(2-hydroxy-3-methacryloyloxy-propyloxy)-phenyl] propane): Shinnakamura Kagaku. (Wakayama, Japan)
6. 硫酸(Sulfuric acid) : ACS Grade, 96.4 %, Tedia, Lot : 703029 (Tedia Co., Fairfield, OH 45014 USA)
7. 氫氧化鈉(Sodium hydroxide) : ACS Grade, 50.4 %, Fisher, Lot : 920682-24(Fisher Scientific, Fair Lawn, New Jersey 07410 USA)
8. 複合樹脂 Tetric Ceram 顏色 B3 廠商: Ivoclar Vivadent AG ( FL-9494 Schaan, Liechtenstein)

9. 複合樹脂 Palfique Estelite 顏色 A2 廠商: Tokuyama dental  
(38-9, Taitou 1-chome, Taitou-ku, Tokyo, Japan)
10. 複合樹脂 Compoglass flow 顏色 A3 廠商: Ivoclar Vivadent  
AG (FL-9494 Schaan, Liechtenstein)
11. 複合樹脂 Dyract 顏色 A3 廠商: Dentsply Dmbh  
(78467 Konstanz, Germany)
12. 複合樹脂 Spectrum 顏色 A3 廠商: Dentsply Dmbh (78467  
Konstanz, Germany)

(二) 設備

1. 高效液相層析儀(HPLC)機型: Perkin Elmer Series 200  
(Norwalk, Connecticut, USA)
2. 偵測器機型: Perkin Elmer 785A UV/VIS Detector  
(Norwalk, Connecticut, USA)
3. 層析管柱: 25 cm x 4.6 mm, 5  $\mu$ m SUPELCO C-18  
(Supelco Co., Bellefonte, PA 16823 USA)
4. SPME-HPLC Interface: 250  $\mu$ L chamber interface  
(Supelco Co., Bellefonte, PA 16823 USA)
5. pH Meter: pH/mv/Temp meter, SP-701; (Suntex Instruments  
Co., Taiwan R.O.C)
6. 微量注射器 syringe: 10  $\mu$ L、50  $\mu$ L、500  $\mu$ L、1000  $\mu$ L, glass;  
(Hamilton Co., Reno, Nevada 89502 USA)
7. 固相微萃取採樣器 SPME holder: Supelco 57330-U; (Supelco



Co., Bellefonte, PA 16823 USA)

8. 固相微萃取纖維 SPME fiber : 85  $\mu\text{m}$  PA, Supelco 5-7306 ;  
(Supelco Co., Bellefonte, PA 16823 USA)
9. 固相微萃取纖維 SPME fiber : 50  $\mu\text{m}$  CW/TPR, Supelco  
57315 ; (Supelco Co., Bellefonte, PA 16823 USA)
10. 固相微萃取纖維 SPME fiber : 50/30  $\mu\text{m}$  DVB/CAR/PDMS,  
Supelco 57348-U ; (Supelco Co., Bellefonte, PA 16823 USA)
11. 固相微萃取纖維 SPME fiber : 60  $\mu\text{m}$  PDMS/DVB, Supelco  
57317 ; (Supelco Co., Bellefonte, PA 16823 USA)
12. 加熱攪拌器 : Barnstead/Thermolyne, SP46925 ; (Dubuque,  
Iowa, 52001 USA)
13. 攪拌子 : magnetic stirring-bar, 8 mm  $\times$  3 mm ; Spinbar (made  
in USA)
14. 取樣瓶 Vial : Amber Vial, Screw Top 4mL with Hole Cap  
PTFE/Silicone Septa ; (Supelco Co., Bellefonte, PA  
16823 USA)
15. 玻璃滴管 : Pasteur pipette, glass ; (Kimble Glass Inc., USA)
16. Pipette : Transferpipette 100~1000  $\mu\text{l}$  ; (Brand GMBH Co.,  
Germany)
17. Micro-Pipette : Fixed Volume Micropipette 1000  $\mu\text{l}$  ; (Socorex  
ISBA S.A., Switzerland)

18. 定量瓶 volumetric flask : 10、25、50、100 mL, glass ; (Brand GMBH Co., Germany)
19. 定量天平 Electronic Balance : AY220 220 g~0.1 mg (Shimadzu Co., Japan)
20. 0.45  $\mu$  m HPLC- NYLON 濾紙 : Lida Manufacturing Corp. (9115 Avenue Kenosha, WI)
21. 2.5mL 塑膠注射針筒 ; 台灣特浦股份有限公司 高雄縣大寮鄉華中路 40 號
22. 樹脂可見光聚合機 : Visible Light Curing Unit ; Visilux 2(3M), model 5520AA (St. Paul, MN 55144-1000 West Germany)
23. LC-MS 機型 : LCQ DECA XP<sup>plus</sup> , 廠商 : Thermo Finnigan (Milan, Italy)



## 第二節 儀器參數條件

### (一) HPLC 條件：

HPLC 機型 : Perkin Elmer Series 200

移動相 : Acetonitrile 65% : D.I Water 35%

流速 : 1 mL/min

層析管柱 : 25 cm x 4.6 mm , 5  $\mu$ m SUPELCO C-18

SPME-LC Interface : 250  $\mu$ L chamber interface

偵測器機型 : Perkin Elmer 785A UV/VIS Detector

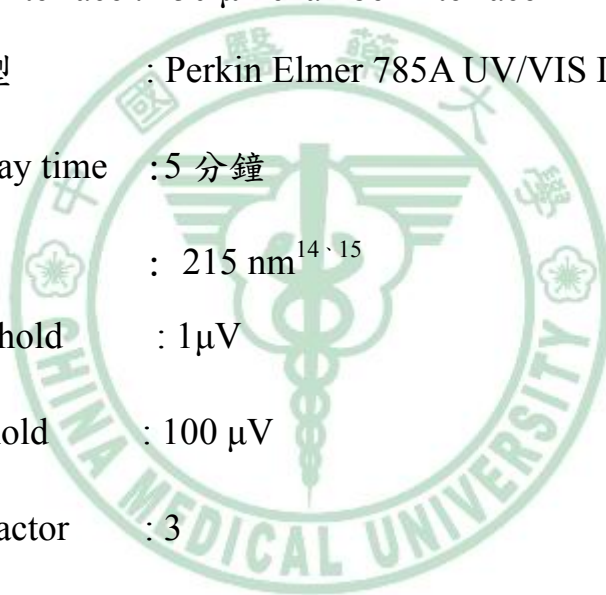
Solvent delay time : 5 分鐘

吸收波長 : 215 nm<sup>14,15</sup>

Noise threshold : 1  $\mu$ V

Area threshold : 100  $\mu$ V

Bunching factor : 3



(二) LC-MS 條件：

移動相 : 40%(D.I. 水+0.1% 甲酸):60%乙腈

流速 : 0.2 mL/min

層析管柱 : 150 mm x 0.2 mm , 4 $\mu$ m Meta Chem  
Technologies.Inc C-18

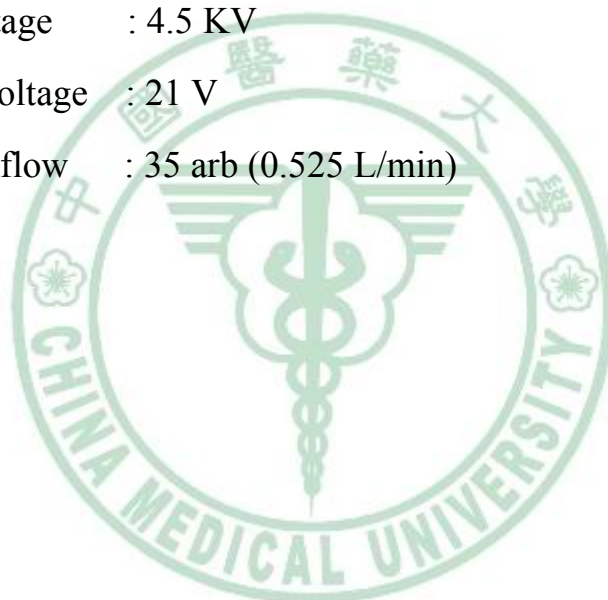
LC-MS mode : positive mode

Capillary temp : 350° C

Source voltage : 4.5 KV

Capillary voltage : 21 V

Sheath gas flow : 35 arb (0.525 L/min)



### 第三節 研究架構

本研究係在實驗室中開發以直接固相微萃取結合高效液相層析儀的方法針對牙科填補之複合式樹脂，進行其唾液培養之溶出物的定量分析，研究架構如附圖 3-1、3-2 所示。

#### (一) HPLC 分析方法的建立

建立 HPLC 分析方法，參考 HPLC-UV 為分析方法的文獻<sup>13、14、15</sup> 找出適當的分析條件，於乙醇中配置標準溶液，以直接注入法建立檢量線；於唾液中配置標準溶液，取 0.5mL 唾液溶液與 0.5mL 乙醇 1:1 混合，24°C、5000rpm 下離心 10 分鐘，取上清液 10 $\mu$ l 注射分析，建立唾液溶劑萃取檢量線。

#### (二) 直接固相微萃取方法建立

SPME-HPLC 直接固相微萃取法受到下列因素的影響，(1) SPME 纖維的種類 (2) 萃取時間 (3) 脫附溶劑 (4) 脫附時間 (5) 萃取溫度 (6) 攪拌之影響 (7) pH 值<sup>48、49</sup>，研究係針對上述參數逐一進行探討，實驗操作步驟見附圖 3-3。

##### (1) 固相微萃取纖維的選擇

於唾液中配製濃度分別為 10  $\mu$ g/mL 的 TEGDMA，10  $\mu$ g/mL 的 UDMA，10 $\mu$ g/mL 的 Bis-GMA 之標準溶液，混合均勻後裝至 4 mL vial 中，依據分析物的分子量及極性等特性來選擇適當的分析纖

維。研究所選定的纖維有 85  $\mu\text{m}$  PA 纖維、50 $\mu\text{m}$  CW/TPR 纖維、60  $\mu\text{m}$  PDMS/DVB 纖維以及 50 $\mu\text{m}$ DVB/CAR/PDMS 等四種性質不同的纖維來進行試驗，樣本於室溫下，以直接法吸附 20 分鐘，以移動相(65%乙腈、35%D. I. 水)脫附 20 分鐘，進行萃取有效性探討，選擇最佳者作為研究之微萃取纖維。

## (2) 萃取時間探討

於唾液中配製濃度分別為 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 TEGDMA，10 $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 UDMA，10 $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 Bis-GMA 之標準溶液，混合均勻後裝至 4 mL vial 中，樣本於室溫下，以 PDMS/DVB 纖維分別直接吸附 5、10、15、20、25 分鐘，脫附 20 分鐘來進行萃取時間探討，選擇最佳者作為研究之最適萃取時間。

## (3) 脫附溶劑探討

於唾液中配製濃度分別為 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 TEGDMA，10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 UDMA，10 $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 Bis-GMA 之標準溶液，混合均勻後裝至 4 mL vial 中。於室溫下，以 PDMS/DVB 纖維直接吸附 20 分鐘，分別以移動相(65%Acetonitrile 35%D.I.Water)、100%Acetonitrile、100%乙醇脫附 20 分鐘作脫附溶劑比較，選擇最佳者作為研究之最適脫附溶劑。

## (4) 脫附時間探討

將萃取完成之纖維以移動相靜態脫附 5、10、15、20 分鐘，進行脫附時間探討；於未經 pH 值調整之唾液中配製 10 $\mu$ g/mL 的 TE-GDMA，10  $\mu$ g/mL 的 UDMA，10 $\mu$ g/mL 的 Bis-GMA 之標準溶液，混合均勻後裝至 4mL vial 中，於室溫下，以 PDMS/DVB 纖維直接吸附 20 分鐘來進行探討，選擇最佳者作為研究之最適脫附時間。

#### (5) 萃取溫度探討

加熱分別調為室溫(約 27 $^{\circ}$ C)、40 $^{\circ}$ C、60 $^{\circ}$ C、80 $^{\circ}$ C 來測試不同樣本溫度下對萃取效率的影響；於未經 pH 值調整之唾液中配製 10 $\mu$ g/mL 的 TEGDMA，10 $\mu$ g/mL 的 UDMA，10 $\mu$ g/mL 的 Bis-GMA 之標準溶液，混合均勻後裝至 4mL vial 中，調整不同的加熱溫度，以 PDMS/DVB 纖維直接吸附 20 分鐘，以移動相靜態脫附 15 分鐘來進行吸附溫度影響探討，選擇最佳者作為研究之最適樣本加熱溫度。

#### (6) 攪拌速度對萃取的影響

在瓶中加入一攪拌磁石，並將攪拌器轉速調整為不攪拌、200 rpm(0.18g)、500 rpm(1.11g)、800 rpm(2.86g)，藉由改變不同的攪拌速度來探討相同吸附時間下攪拌與否對纖維上吸附量的影響；於未經 pH 值調整之唾液中配製 10 $\mu$ g/mL 的 TEGDMA，10  $\mu$ g/mL 的 UDMA，10 $\mu$ g/mL 的 Bis-GMA 標準溶液，混合均勻後裝至 4mL vial

中，樣本於 40 °C 下，調整不同轉速，以 PDMS/DVB 纖維直接吸附 20 分鐘，以移動相靜態脫附 15 分鐘來進行攪拌速度對萃取的影響探討，選擇最佳者作為研究之最適攪拌速度。

#### (7) 樣本 pH 值探討

用 citrate-phosphate buffer 將未經 pH 值調整之唾液調整至 pH=3、5、9 以及 pH=11，未經調整之唾液 pH 值約為 7.65；於不同 pH 值之唾液中配製 10 $\mu$ g/mL 的 TEGDMA，10  $\mu$ g/mL 的 UDMA，10 $\mu$ g/mL 的 Bis-GMA 標準溶液，混合均勻後裝至 4mL vial 中，加入攪拌磁石。樣本於 40 °C 下，轉速調整為 200rpm，以 PDMS/DVB 纖維直接吸附 20 分鐘，以移動相靜態脫附 15 分鐘來進行 pH 值對吸附效率影響探討，選擇最佳者作為研究之最適樣本 pH 值。

#### (三) 分配係數

於唾液中配製濃度高低的標準溶液，分別為 1.5、7.5 $\mu$ g/ml 的 TEGDMA；2.5、12.5 $\mu$ g/mL 的 UDMA；2.5、12.5 $\mu$ g/mL 的 Bis-GMA 標準溶液，混合均勻後裝至 4mL vial 中，加入攪拌磁石。樣本於 40 °C 下，轉速調整為 200rpm，以 PDMS/DVB 纖維直接吸附 20 分鐘，以移動相靜態脫附 15 分鐘，得到纖維吸附量後，來探討高低濃度的分配係數。

#### (四) 分析品質管制



### (1) 檢量線建立

標準溶液的配製是在未經 pH 值調整之唾液中配製 TEGDMA、UDMA、Bis-GMA 標準溶液，混合均勻後裝至 4 mL vial 中，加入攪拌磁石，樣本於 40 °C 下，轉速調整為 200 rpm，以 PDMS/DVB 纖維直接吸附 20 分鐘，以移動相靜態脫附 15 分鐘。製作異日三條檢量線。

檢量線的配製應至少配製五種不同的濃度，其所配製之標準溶液，線性相關係數( $r$ ) $>0.995$ ，各濃度之相對預測偏差(RPD)應小於 10%。檢量線配製濃度範圍如下 TEGDMA: 0.3~30  $\mu\text{g/mL}$ ; UDMA: 0.5~50  $\mu\text{g/mL}$ ; Bis-GMA: 0.5~50  $\mu\text{g/mL}$ 。

### (2) 方法偵測極限

以檢量線最低點濃度，分別為 TEGDMA: 0.3  $\mu\text{g/mL}$ ; UDMA: 0.5  $\mu\text{g/mL}$ ; Bis-GMA: 0.5  $\mu\text{g/mL}$ ，重複分析 7 次，所得 7 次儀器訊號代入迴歸方程式即得相當之濃度，取其 3 倍標準偏差(standard deviation; SD)，即為各物質之分析方法偵測極限。

### (3) 分析之精密度與準確度

取檢量線範圍內低濃度及中間偏高濃度各一點，分別為 TEGDMA: 1.5、7.5  $\mu\text{g/mL}$ ; UDMA: 2.5、12.5  $\mu\text{g/mL}$ ; Bis-GMA: 2.5、12.5  $\mu\text{g/mL}$ ，於樣本分析的同時，進行標準品分析，以確認分

析之精密度與準確度。

#### (五)樹脂樣本

##### (1) 聚合時間影響溶出量探討

針對 5 種商品中(如表 3-1)，具代表性的商品 Tetric Ceram 進行聚合時間探討。在光聚合機照射 20、40、60、80、120 秒下聚合  $6.5\pm 0.5\text{ mm} \times 1\text{ mm}$  大小樹脂份，聚合後於室溫下放置 24 小時自然風乾，再分別浸入裝滿乙醇的 4 mL vial 中，於室溫下培養 7 天後進行分析，探討聚合時間與溶出量的關係。

##### (2) 溫度影響溶出量探討

針對 5 種商品中，具代表性的商品 Tetric Ceram 進行溫度探討。在光聚合機照射 80 秒下分別聚合  $6.5\pm 0.5\text{ mm} \times 1\text{ mm}$  大小樹脂，聚合後於室溫下放置 24 小時自然風乾，再分別浸入裝滿乙醇的 4 mL vial 中，分別於  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、室溫( $27\text{ }^{\circ}\text{C}$ )、 $40\text{ }^{\circ}\text{C}$  下培養 7 天後進行分析，探討溫度對溶出量影響。

##### (3) pH 值影響釋放量探討

針對 5 種商品中，具代表性的商品 Tetric Ceram 進行 pH 值探討。在光聚合機照射 80 秒下聚合  $6.5\pm 0.5\text{ mm} \times 1\text{ mm}$  大小樹脂，聚合後於室溫下放置 24 小時自然風乾，再浸入裝滿經調整 pH 值為 3、5、7.65(不調整)、9、11 乙醇的 4 mL vial 中培養 7 天後進行分

析，探討 pH 值對溶出量影響。

#### (4) 市售商品天數探討

將市售 5 種光聚式複合式樹脂(如表 3-1)，在光聚合機照射 120 秒下分別聚合  $6.5 \pm 0.5 \text{ mm} \times 1 \text{ mm}$  大小樹脂，聚合後於室溫下放置 24 時自然風乾，再分別浸入裝滿乙醇及唾液的 4 mL vial 中，於室溫下浸泡 0.5、1、3、5、7、10 天後進行分析，探討浸泡天數的關係，且比較唾液與乙醇之間的差異及傳統分法與 SPME 的關係。

#### (5) 浸泡液質譜定性

將配置好的標準溶液與浸泡好的溶液以 LC-MS-MS 作質譜確認，以定性釋出物。



### 第叁章 圖表附錄



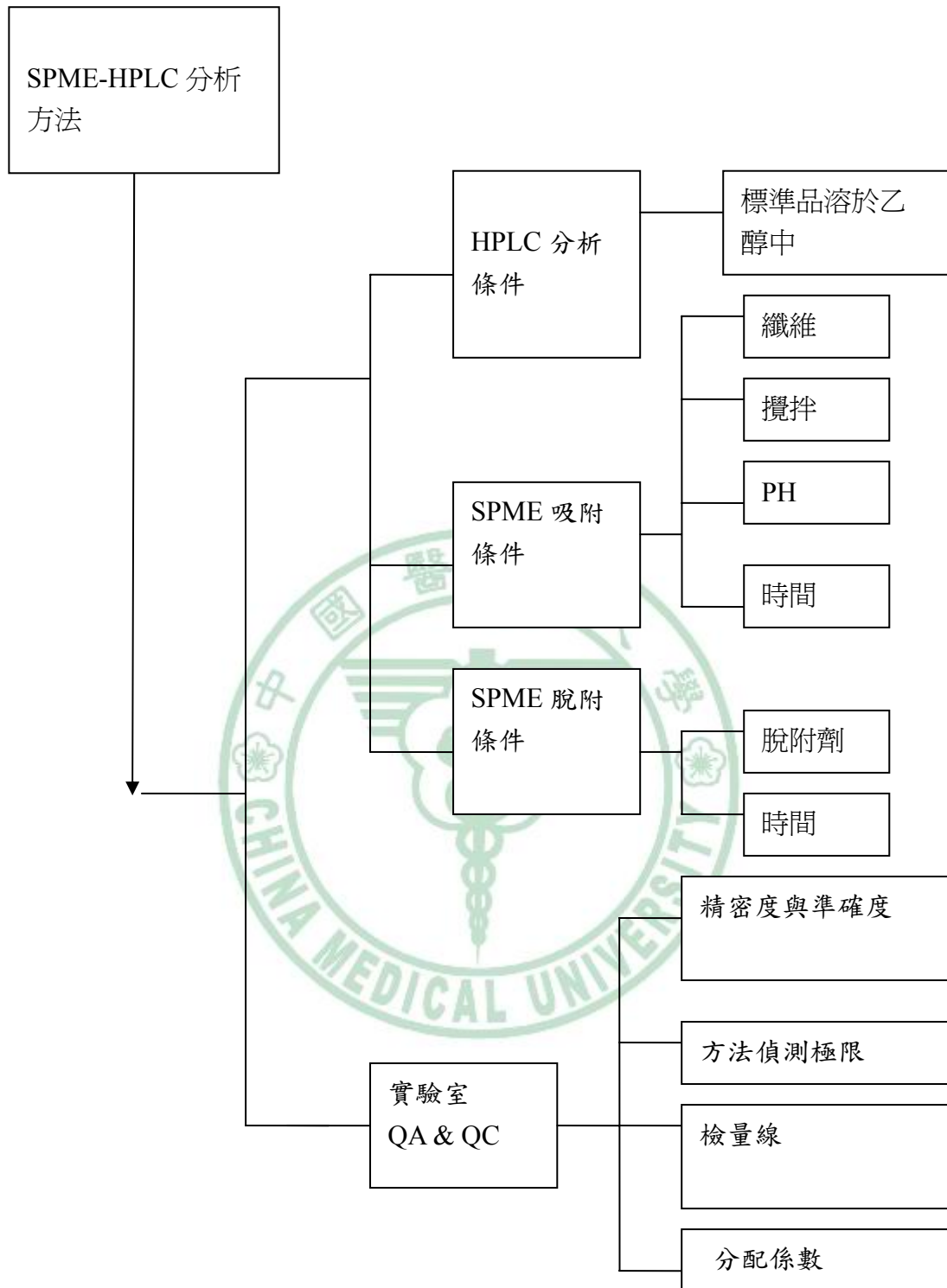


圖 3-1 唾液樣本 SPME-HPLC 分析方法建立

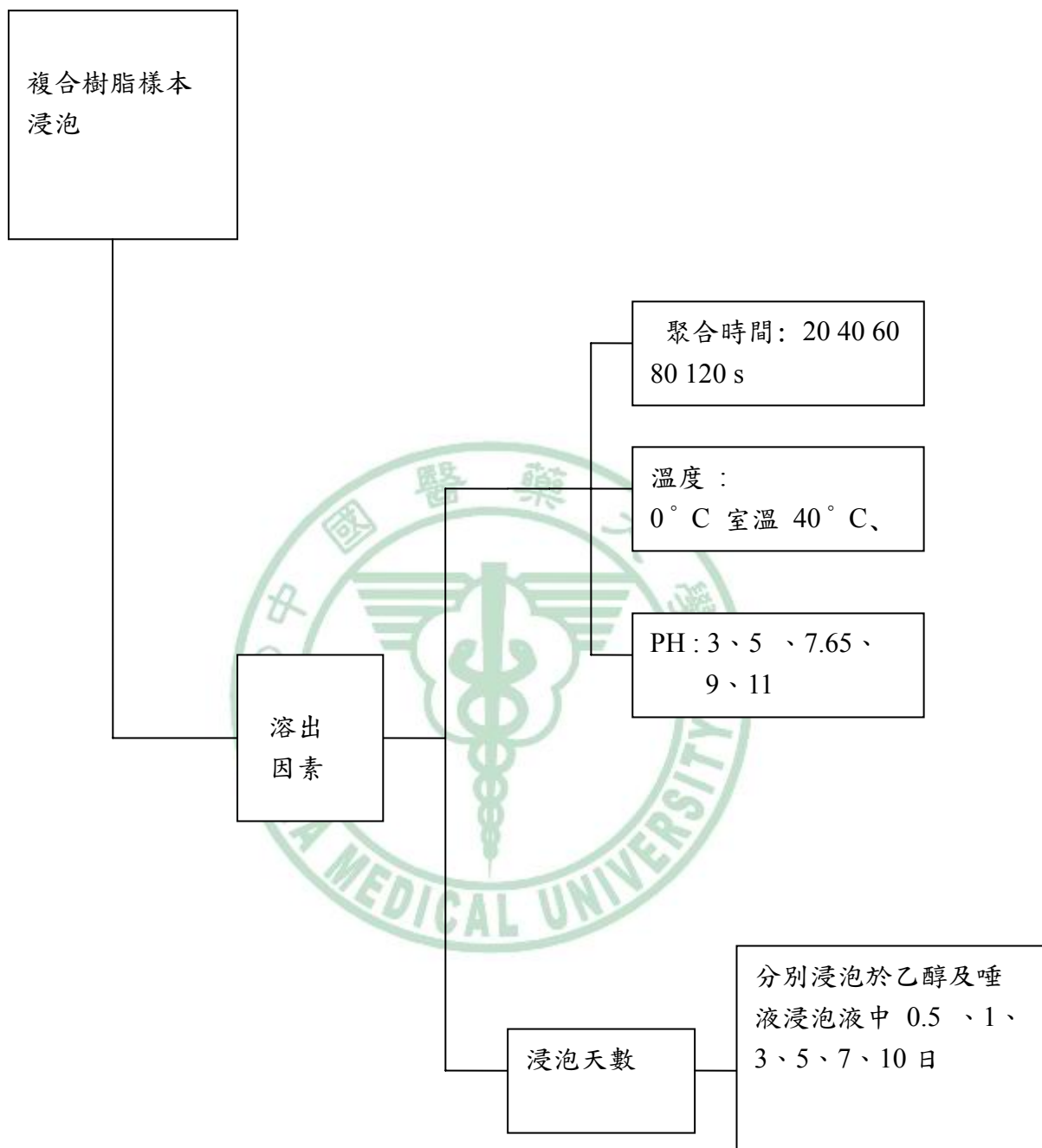


圖 3-2 真實樣本培養架構

Fiber condition



將配製好濃度之標準品放至 4 mL vial 中，瓶內置入磁石



將樣本置於加熱攪拌器上，攪拌 2 小時



將 SPME 穿刺過墊片，推出纖維，進行吸附



待吸附達平衡後，收回纖維



將 SPME 置於 Interface 上，推出纖維於 Chamber 中進行脫附



數據分析

圖 3-3SPME 實驗操作流程

商品名	TEGDMA	UDMA	Bis-GMA
Tetric Ceram	○	○	○
Palfique Estelite	○	×	○
Compoglass flow	○	○	×
Dyract	×	○	×
Spectrum	○	×	○

表 3-1 市售複合式樹脂商品



## 第肆章 結果與討論

### 第一節 HPLC 分析

於乙醇中配製 TEGDMA、UDMA、Bis-GMA 標準溶液，乙腈 65 % D.I.水 35 % 固定比例下，流速 1 ml/min 下，分析物分別於 5.29 分、7.17 分、8.92 分時出現波峰(圖 4-1a)，完成整個分析時間約 15 分鐘。

直接注入法 TEGDMA 檢量線濃度範圍為 2.5~200 $\mu$ g/mL；UDMA 檢量線濃度範圍為 6.5~260  $\mu$ g/mL；Bis-GMA 檢量線濃度範圍為 3.2~320 $\mu$ g/mL 異日線性相關係數 r 皆大於 0.995，RPD 值皆在 13 % 以下。

溶劑萃取唾液 TEGDMA 檢量線濃度範圍為 3.125~250 $\mu$ g/mL；UDMA 檢量線濃度範圍為 3.325~270  $\mu$ g/mL；Bis-GMA 檢量線濃度範圍為 7.5~300 $\mu$ g/mL 異日線性相關係數 r 皆大於 0.995，RPD 值皆在 12 % 以下。

## 第二節 固相微萃取方法建立

### (一) 固相微萃取纖維的選擇

在相同的濃度、相同的分析條件下分別以 85  $\mu\text{mPA}$ 、50  $\mu\text{mCW/TPR}$ 、60  $\mu\text{mPDMS/DVB}$ 、50/30  $\mu\text{mDVB/CAR/PDMS}$  等四種纖維來進行吸附測試，由研究結果顯示(圖 4-2-1a)，60  $\mu\text{mPDMS/DVB}$  能同時吸附 4 種分析物，雖面積值小於 50/30  $\mu\text{mDVB/CAR/PDMS}$  纖維，考慮分析時之穩定性，以相對標準偏差(Relative Standard Deviation; RSD)來判定，60  $\mu\text{mPDMS/DVB}$  較為穩定(圖 4-2-1b)，故選定以 60  $\mu\text{mPDMS/DVB}$  為此次研究中 SPME 吸附介質。

### (二) 萃取時間

以 60  $\mu\text{mPDMS/DVB}$  纖維直接浸入吸附 5、10、15、20、25 分鐘，其餘條件參數相同下來進行萃取時間探討。

由結果顯示(圖 4-2-2a、4-2-2b)吸附 20 分鐘時，纖維吸附值大約已呈現飽和狀態，吸附 25 分鐘面積值不再增加且有下降趨勢，選定以吸附 20 分鐘為最適吸附時間。(數據詳見表 4-2-2)

### (三) 脫附劑

以 60  $\mu\text{mPDMS/DVB}$  纖維直接浸入吸附 20 分鐘，分別以移動相(65% acetonitrile 35% D.I.Water)、100% acetonitrile、100% 乙醇脫

附，其餘條件參數相同下來進行脫附溶劑探討。

由結果顯示(圖 4-2-3a)面積值以 100% acetonitrile 最大，100% 乙醇次之，而 65% acetonitrile 35% D.I. Water 最小。在考慮分析時之穩定性，以相對標準偏差(Relative Standard Deviation；RSD)來判定(圖 4-2-3b)，100%乙醇 RSD 值大於 10%以上，而 65% acetonitrile 35% D.I. Water 移動相的 RSD 值均小於 10%(圖 4-2-3b)，雙重考量下最後選定 65% acetonitrile 35% D.I. Water 移動相為較佳脫附劑。(數據詳見表 4-2-3)

#### (四) 脫附時間探討

以 60  $\mu$ mPDMS/DVB 纖維直接浸入吸附 20 分鐘，以移動相(65% acetonitrile 35% D.I. Water) 分別脫附 5、10、15、20 分鐘，其餘條件參數相同下來進行脫附時間探討。

由結果顯示(圖 4-2-4a、4-2-4b)在脫附達 15 分鐘時，面積值已有趨緩現象，20 分鐘時有明顯下降趨勢，考慮分析時之穩定性(圖 4-2-4c)脫附 15 分鐘的 RSD 值均小於 10%，雙重考量下最後選定以脫附時間 15 分鐘為較佳脫附時間。(數據詳見表 4-2-4)

#### (五) 萃取溫度探討

萃取溫度分別為室溫(約 27  $^{\circ}$ C)、40  $^{\circ}$ C、60  $^{\circ}$ C、80  $^{\circ}$ C 其餘條件參數相同下來測試不同萃取溫度下對萃取效率的影響。

由研究結果顯示(圖 4-2-5a)，有加熱分析物之面積值明顯大於不加熱，但隨著溫度上升而明顯減少( $40\text{ }^{\circ}\text{C} > 60\text{ }^{\circ}\text{C} > 80\text{ }^{\circ}\text{C}$ )，且  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$  的 RSD 值均小於 10%(圖 4-2-5b)。在此兩種因素考量下，遂決定以  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$  為研究最適萃取溫度。(數據詳見表 4-2-5)

#### (六) 攪拌速度對萃取的影響

將攪拌器轉速調整為不攪拌、200 rpm(0.18 g)、500(1.11 g) rpm、800(2.86 g) rpm 來進行攪拌速率對吸附量的探討。

由結果顯示(圖 4-2-6a)，有攪拌者之面積值明顯優於不攪拌。在考慮分析時之穩定性下，200rpm 的 RSD 值均小於 10%(圖 4-2-6b)，在此兩種因素考量下遂決定以 200 rpm 為最適萃取攪拌速度。(數據詳見表 4-2-6)

#### (七) 樣本 pH 值探討

未經調整之唾液 pH 值約為 7.65，以 citrate-phosphate buffer 將未經 pH 值調整之唾液調整至 pH=3、pH=5、pH=9 以及 pH=11，來測試 pH 值改變是否會對萃取造成影響。

由研究結果顯示，調整 pH 值對整個萃取並沒有正面的提升，並且在未經調整之樣本，無論是面積值(圖 4-2-7a)或 RSD 值(圖 4-2-7b)皆優於其他者，故選定不調整 pH 值為最適萃取 pH 值。(數據詳見表 4-2-7)

### 第三節 分配係數

於唾液中分別配製濃度 1.5、7.5  $\mu\text{g/ml}$  的 TEGDMA；2.5、12.5  $\mu\text{g/mL}$  的 UDMA；2.5、12.5  $\mu\text{g/mL}$  的 Bis-GMA 標準溶液，以探討的 SPME 參數，分析得到纖維吸附量後，即可得到分配係數。由研究結果顯示，重複 7 次高低濃度的分配係數皆相近且穩定，分別為；TEGDMA: 70.17、72.12；UDMA: 85.27、84.56；Bis-GMA: 151.01、152.05。(數據詳見表 4-3)



## 第四節 分析品質管制

### (一) 檢量線建立

TEGDMA 檢量線濃度範圍為 0.3~30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ；UDMA 檢量線濃度範圍為 0.5~50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ；Bis-GMA 檢量線濃度範圍為 0.5~50 $\mu\text{g}/\text{mL}$  異日線性相關係數  $r$  皆大於 0.995，RPD 值皆在 12 % 以下。(表 4-4-1)

### (二) 方法偵測極限(MDL)

以檢量線最低點濃度，分別為 TEGDMA：0.3  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ；UDMA：0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ；Bis-GMA：0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，重複分析 7 次，所得 7 次儀器訊號代入迴歸方程式即得相當之濃度，取其 3 倍標準偏差(standard deviation；SD)，即為各物質之分析方法偵測極限。(表 4-4-2)

### (三) 分析之精密度與準確度

分別取檢量限範圍內中低、高濃度值 2 點，分別為 TEGDMA：1.5、7.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ；UDMA：2.5、12.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ；Bis-GMA：2.5、12.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，於樣本分析的同時，進行標準品分析，結果顯示無論在低濃度或高濃度的樣本，其變異係數(CV %)皆小於 10 %，且準確度皆介於 100 $\pm$ 10 % 之間，表示此分析方法之再現性良好。(表 4-4-3)

## 第五節 真實樣本培養

### (一) 市售複合式樹脂

市售商品中，5種商品的溶出物皆隨天數增加而溶出量增加(圖 4-5-1a~e)，乙醇培養的樣品，大部分在第7天時，明顯大量溶出，且到第10天並無明顯增加，其中商品 Tetric Ceram 是含分析物種類最多的商品，適合做為聚合時間、溫度及 pH 探討的樹脂。

針對5種商品，以乙醇培養7日溶出量做一比較，TEGDMA 溶出最多為商品 Palfique Estelite；UDMA 釋出最多為商品 Compoglass flow；Bis-GMA 溶出最多為商品 Palfique Estelite (圖 4-5-1f)。

唾液浸泡的樣本中，所有天數皆無測到分析物。

### (二) LC-MS-MS 質譜

將配製好的標準溶液與培養好的乙醇溶液以 LC-MS-MS 作質譜確認，以定性溶出物。

標準溶液 LC-MS-MS 的質譜圖(圖 4-5-2 a、c、e)與乙醇培養液的質譜圖(圖 4-5-2 b、d、f)特殊質荷皆相同。

### (三) 聚合時間探討

以樹脂 Tetric Ceram 在光聚合機照射 20、40、60、80、120 秒，於室溫下浸泡7天後進行分析，探討聚合時間與溶出量的關係。

由結果顯示(圖 4-5-3)，隨著聚合時間的增加，溶出量隨著減

少，尤其在 60 秒前更明顯。(數據詳見表 4-5-3)

#### (四) 溫度探討

以樹脂 Tetric Ceram 在 0 °C、室溫(27 ° C)、40 °C 下浸泡 7 天後分析，進行溫度對溶出量影響的探討。

由結果顯示(圖 4-5-4)，UDMA、Bis-GMA 隨著溫度的上升溶出量大量增加，而 TEGDMA 較不受溫度的影響，只有些微的增加。(數據詳見表 4-5-4)

#### (五) pH 值探討

以樹脂 Tetric Ceram 於經調整 pH 值為 3、5、7.65、9、11 乙醇溶液中浸泡 7 天後分析，進行 pH 值對溶出量影響的探討。

由結果顯示(圖 4-5-5)，隨著 pH 的上升，TEGDMA、UDMA、Bis-GMA 溶出量減少，。(數據詳見表 4-5-5)



## 第六節 討論

### (一) 固相微萃取

纖維的材質種類和厚度對萃取效率影響最大，需根據待萃取成分的性質，綜合考慮其極性、沸點、分子量來選擇萃取纖維，不同的纖維塗布著不同的固定靜相，固定靜相的極性、厚度、表面積、耐受溫度皆會影響萃取效率，選擇的基本原則是同性相容原理：極性纖維萃取極性化合物，非極性纖維萃取非極性化合物。

分析物之萃取絕對量會隨纖維體積增加而增加，較長較厚的纖維可萃取更多的分析物，但過長纖維容易折斷，故一般纖維長度介於 1~2 公分，越厚的纖維雖可以萃取較多分析物，但相對的會使擴散速率減慢，延長平衡時間，因此高沸點的分析物通常因擴散速率較慢，因此選擇厚度較薄之纖維縮短平衡時間，兩種以上不同性質裹附纖維對不同待測物有較佳的同時吸附能力，DVB 材質適合極性物質，PDMS 材質適合非極性物質<sup>54</sup>，本實驗因分析物分子量差異大，且極性不同而選擇了 PDMS/DVB 纖維，因分析物沸點較高，選擇較薄的 60  $\mu\text{m}$ PDMS/DVB 纖維。

吸附時間是指從開始萃取到達到萃取平衡所需的時間。在萃取初始階段，分析物很容易被吸附到纖維固定相中，隨著時間的增加，吸附速度越來越慢，接近平衡狀態時，即使延長吸附時間，吸附量

不會有太大的增加，本實驗在吸附初始階段 10 分鐘已吸附大量分析物，隨著吸附時間到了 20 分鐘，吸附量呈現趨緩。

萃取溫度的差異使分析物吸附於纖維的量有所不同，以動力學的角度而言，溫度上升加速質量傳輸、提供分析物脫離樣品所需的能量；但就熱力學而言，溫度上升則亂度增加且分配細數下降，而本實驗在萃取溫度探討上，隨溫度上升而纖維上所吸附之分析物含量有明顯的增加，但大量的提高溫度( $> 40^{\circ}\text{C}$ )，吸附量不增反減。<sup>41、44、45</sup>

樣本攪拌之目的主要在於加速分析物的擴散速率，縮短萃取平衡的時間，不同的攪拌方式各有其優缺點：樣品旋轉(纖維需承受壓力)、纖維移動(僅限小體積樣品)、超音波(會加熱樣品)，由於磁力轉動攪拌設備簡單，對纖維較不會有損害，因此磁力轉動攪拌是常用的攪拌方法在攪拌測試上，本實驗在相同吸附時間下，有攪拌者(200 rpm)之面積比值明顯大於未攪拌者，因攪拌可縮短達平衡的時間，但已達平衡之後的攪拌，增加其攪拌速度，對吸附量無增加的效果。

以直接萃取模式採樣時，水樣的 pH 值改變，對分析物的分配常數會造成改變，而影響萃取效果，通常分析物為酸鹼化合物時，調整 pH 可影響分析物是以離子態或分子態存在於水相中而影響到

吸附，對於在水中不解離的芳香族碳氫化合物、鹵化醚類化合物，pH 值的改變對萃取並無影響，而本實驗 pH 值的改變對吸附效率並沒有正面的提升<sup>45</sup>。

選定較好的 SPME 參數即可得一較高且穩定的分配係數，也就是較佳的吸附效率，以探討好的 SPME 參數進行分配係數探討，不管是高低濃度，其分配係數皆穩定。

早期關於複合式樹脂釋出的研究，將樹脂培養於有機溶劑或水中，釋出濃度較高，重點放於釋出物的定量，近期研究發現唾液中的酶會與釋出物反應，樹脂於唾液環境中原釋出單體的量將大大減少，開發之 SPME 方法可分析唾液中釋出單體，分析方法其方法偵測極限分別為 TEGDMA：0.035 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ；UDMA：0.276  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ；Bis-GMA：0.064  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，可應用於研究原釋出物於唾液中反應機制探討。

目前將 SPME 方法應用於牙科材料分析上的研究尚少，2004 年 Ortengren 等針對 HQ(Hydroquinone monomethyl ether)、bisphenol-A(4,4-Isopropylidenediphenol)、TEGDMA、EGDMA (Ethylene glycoldimethacrylate)、MMA(Methylacrylate)、MA (Methacrylic)六種低分子物質開發 SPME-GC-MS 方法，而其 SPME 的參數無一完整探討，以開發 SPME 方法而言是不足的，相對本研

究將所有直接浸入 SPME 參數逐一探討，找出適合參數並探討其分配係數之穩定性，為一完整且穩定方法，此外其研究以 GC-MS 為分析儀器，只能針對低分子量化合物進行探討，而樹脂主要材料為大分子量化合物，以 SPME-HPLC 方法即可解決此問題。<sup>53</sup>。

## (二) 複合式樹脂

市售樹脂商品，其溶出物與成份有關，而樹脂浸泡於乙醇中，溶出物量隨浸泡天數增加而增加，在 7 日時幾乎達到最高值，商品 Tetric ceram 溶出 Bis-GMA > UDMA > TEGDMA；Palfique Estelite 溶出 Bis-GMA > TEGDMA；Compoglass flow 溶出 UDMA；Spectrum 溶出 TEGDMA > Bis-GMA；Dyract 溶出 UDMA，五種商品中，Bis-GMA 溶出最多的是商品 Palfique Estelite；UDMA 溶出最多的是商品 Compoglass flow；TEGDMA 溶出最多的是商品 Palfique Estelite，而毒性的比較上 Bis-GMA > UDMA > TEGDMA<sup>37</sup>，五種商品因成分組成不同，釋出單體有所不同，但以溶出率及溶出物毒性來判斷，Palfique Estelite 較其他四種商品對人體具危害。

而樹脂聚合的時間影響溶出量甚巨，最短聚合時間 20 秒與最長聚合時間 120 秒其溶出率差距 2 倍以上，隨著浸泡液溫度的增加，UDMA、Bis-GMA 溶出量隨著大量增加，但 TEGDMA 溶出量較不受溫度影響，隨著 pH 值的增加，TEGDMA、UDMA、Bis-GMA 溶

出量隨著減少，但當 pH 值大於 9 時 UDMA、Bis-GMA 溶出量幾乎為零。

唾液樣本在所有浸泡天數下皆無偵測到 TEGDMA、UDMA、Bis-GMA，而唾液中所含的酶已被證實與酵素 CE、PCE 有同樣的能力能夠分解 TEGDMA、Bis-GMA 這些被溶出的單體<sup>18</sup>，分解後的產物包括 Methacrylic(MA)、Triethyleneglycol methacrylate (TEGMA)、Bishydroxyprooxyphenylpropane、(BisHPPP)、Ethoxylated Bisphenol A (E-BPA)，而 TEGDMA、UDMA、Bis-GMA 研究指出皆會造成過敏反應及細胞基因毒性，但對於這些產物的毒性研究除了 MA 因用途較廣，有相關毒性研究指出其毒性<sup>32</sup>，其他產物皆無著墨，由結果顯示，樹脂溶出物在唾液中 12 小時之後，完全被酶所分解，評估樹脂於唾液環境中溶出對人體健康危害，應考量到產物是較適當的。

## 第肆章 圖表附錄



4-1 附圖

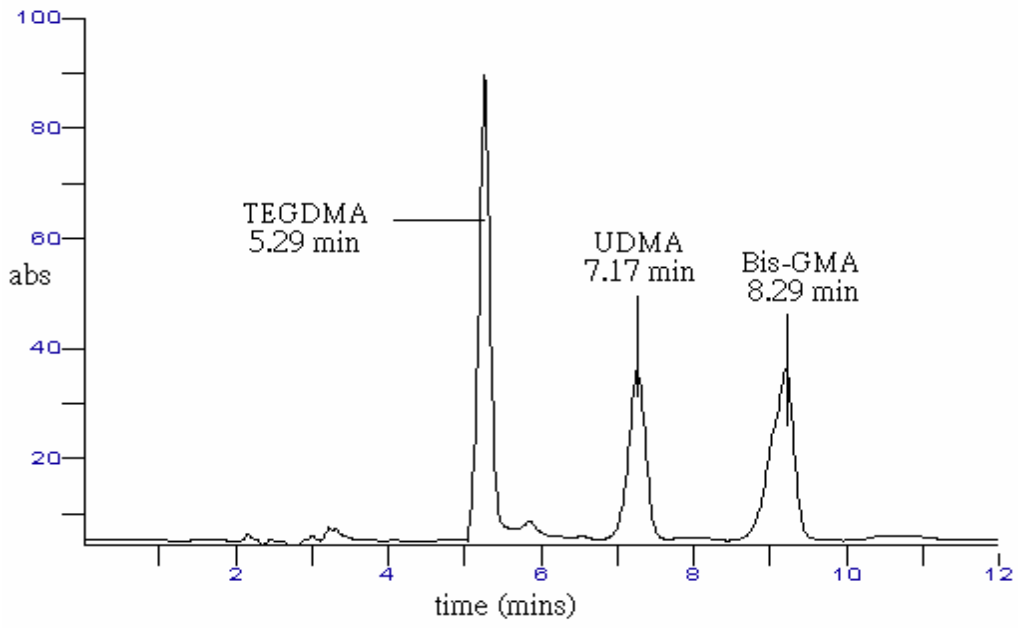


圖 4-1 HPLC 分析圖



### 4-2-1 附圖

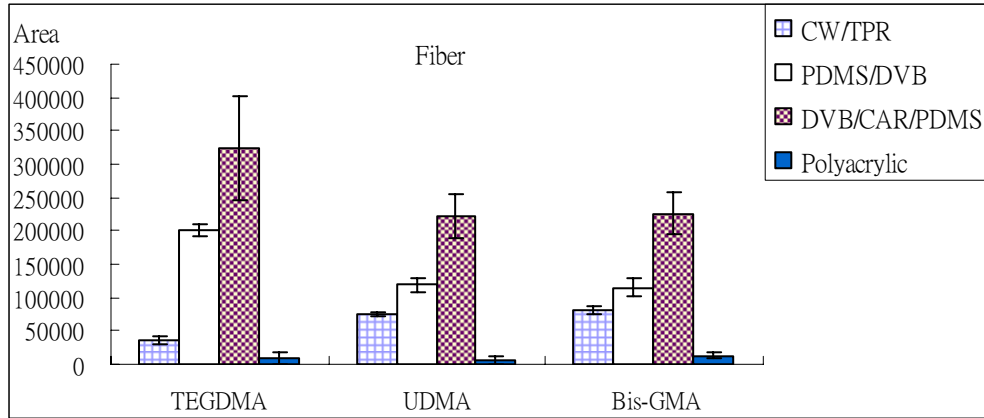


圖 4-2-1a 纖維的探討

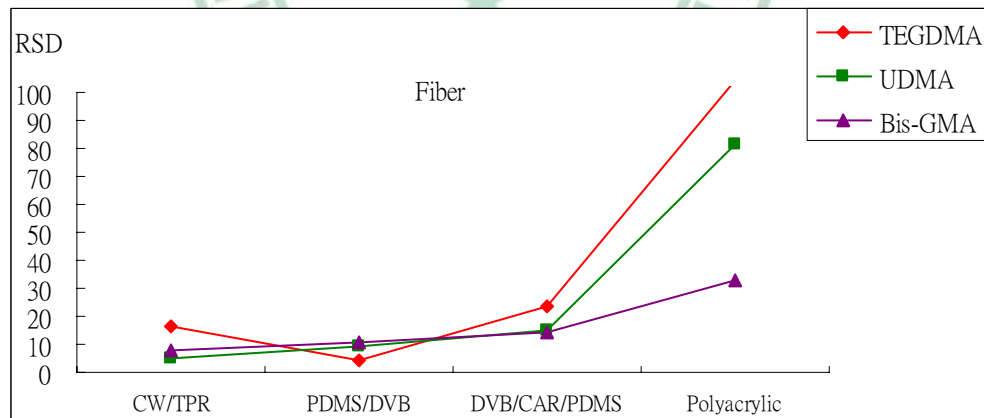


圖 4-2-1b 不同纖維的 RSD 圖



### 4-2-2 附圖

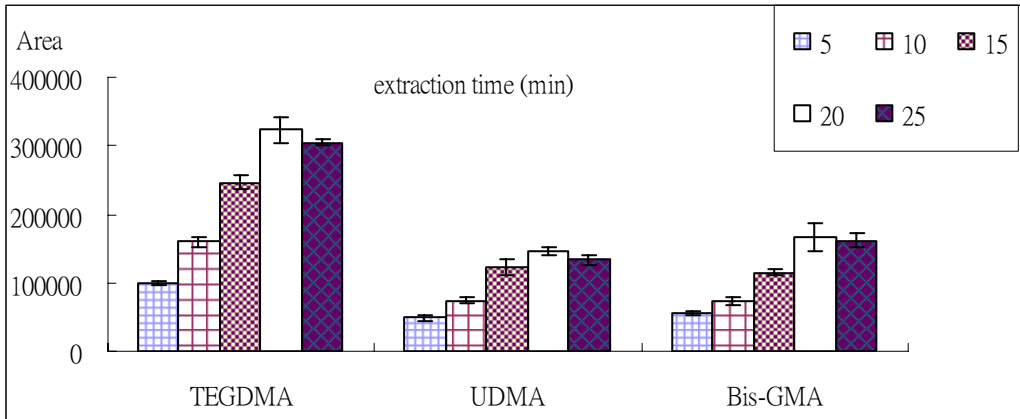


圖 4-2-2a 吸附時間對吸附量的影響

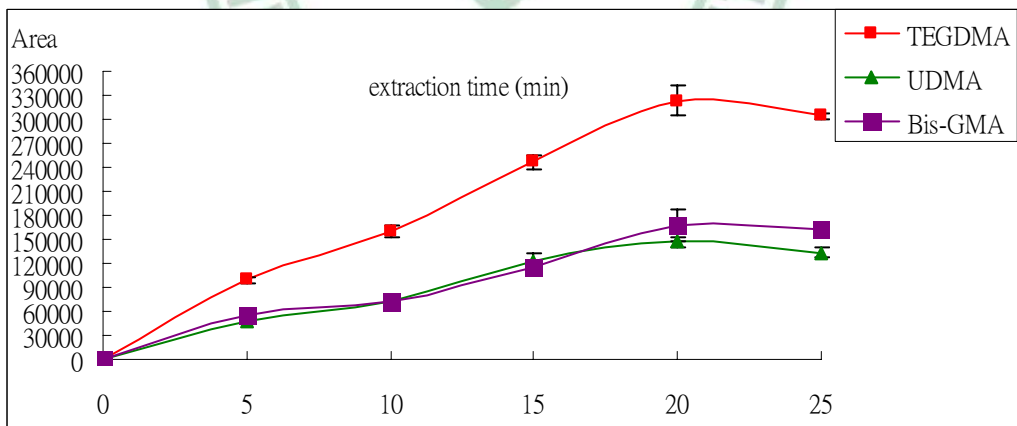


圖 4-2-2b 吸附時間曲線圖

### 4-2-3 附圖

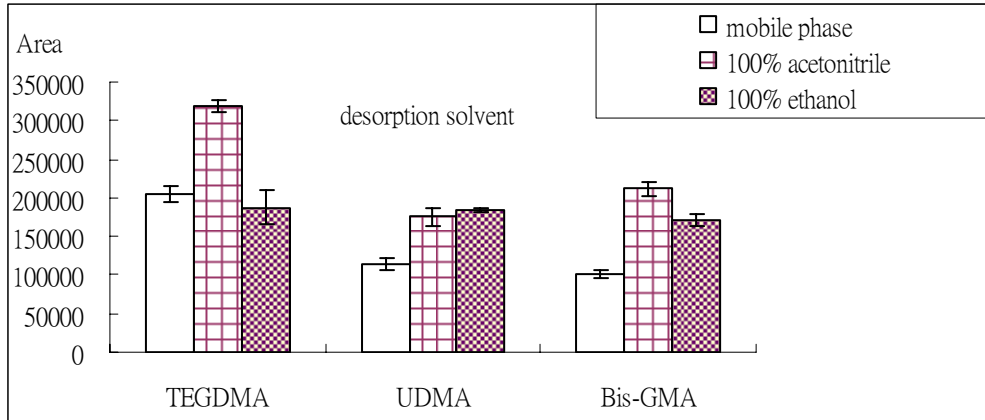


圖 4-2-3a 脫附劑探討

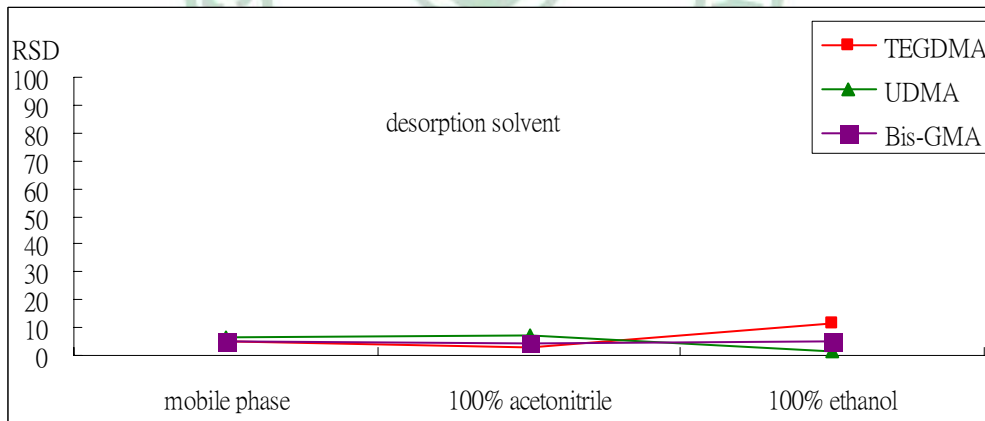


圖 4-2-3b 不同脫附劑下之 RSD 值

### 4-2-4 附圖

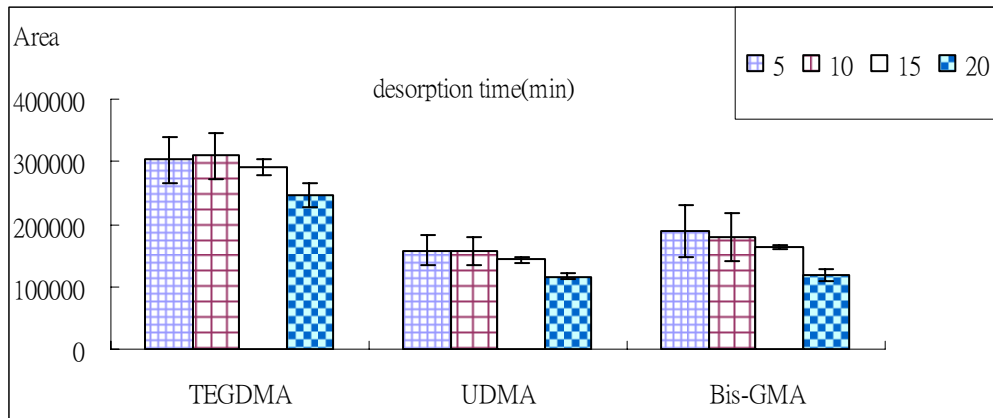


圖 4-2-4a 脫附時間探討

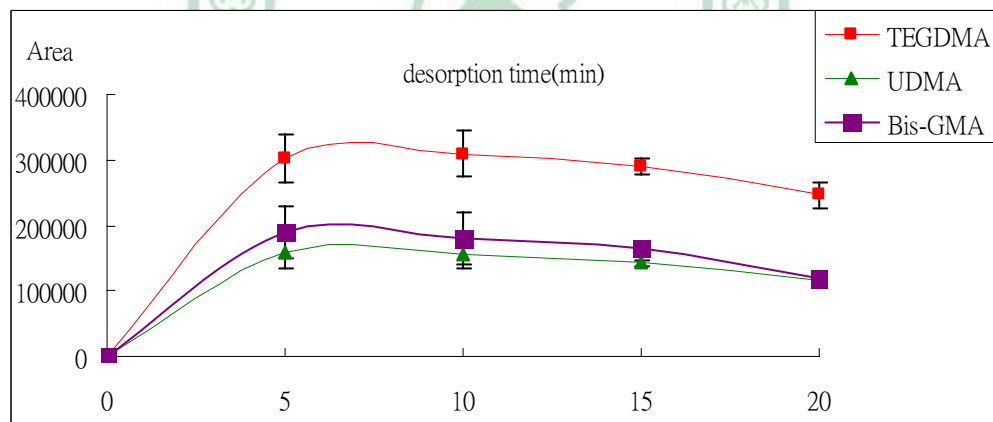


圖 4-2-4b 脫附時間曲線圖

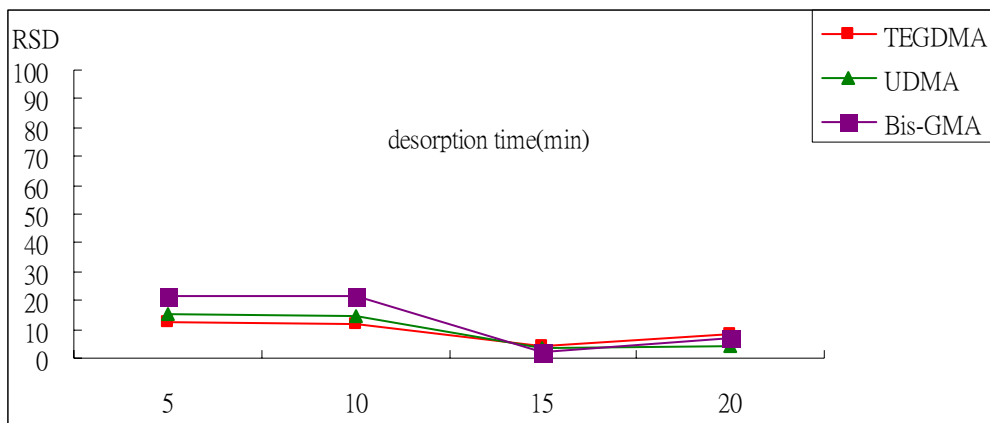


圖 4-2-4c 不同脫附時間下之 RSD 值



### 4-2-5 附圖

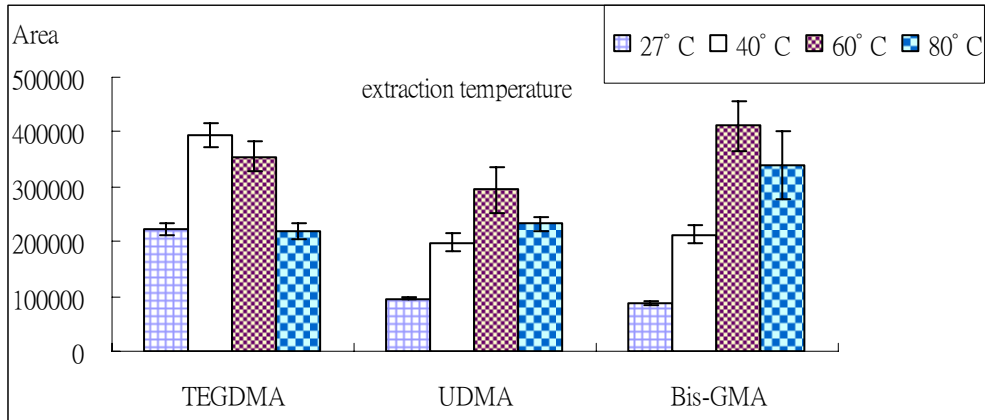


圖 4-2-5a 萃取溫度探討

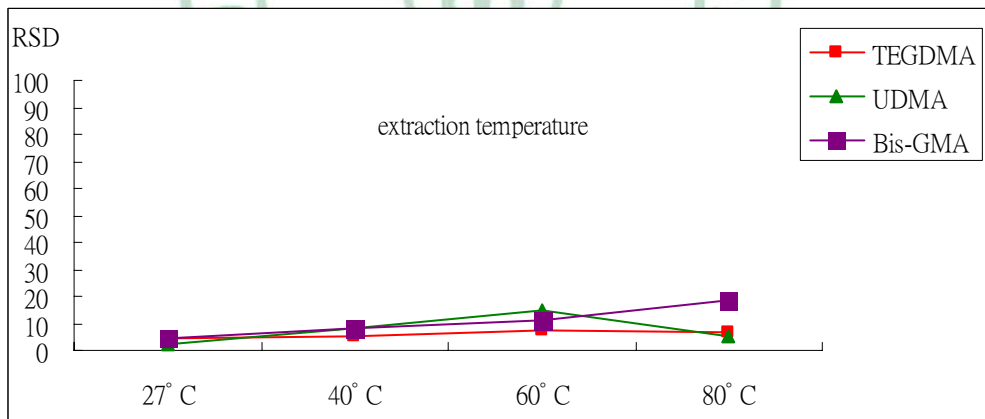


圖 4-2-5b 不同萃取溫度下之 RSD 值

### 4-2-6 附圖

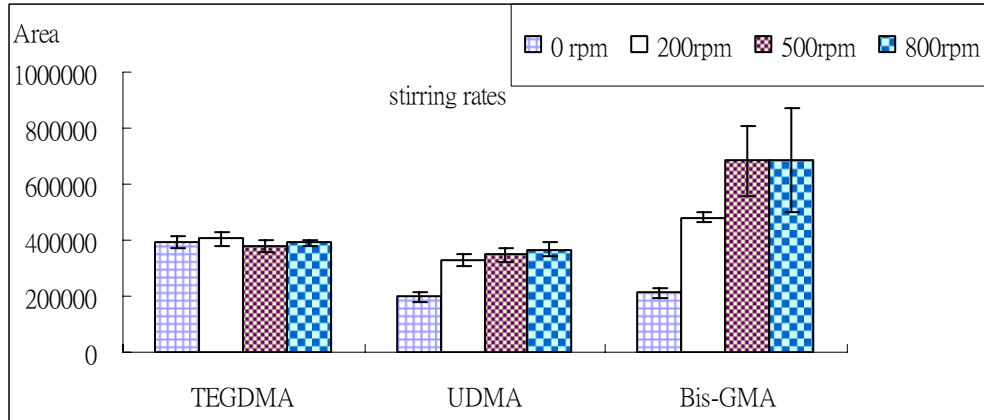


圖 4-2-6a 攪拌速度探討

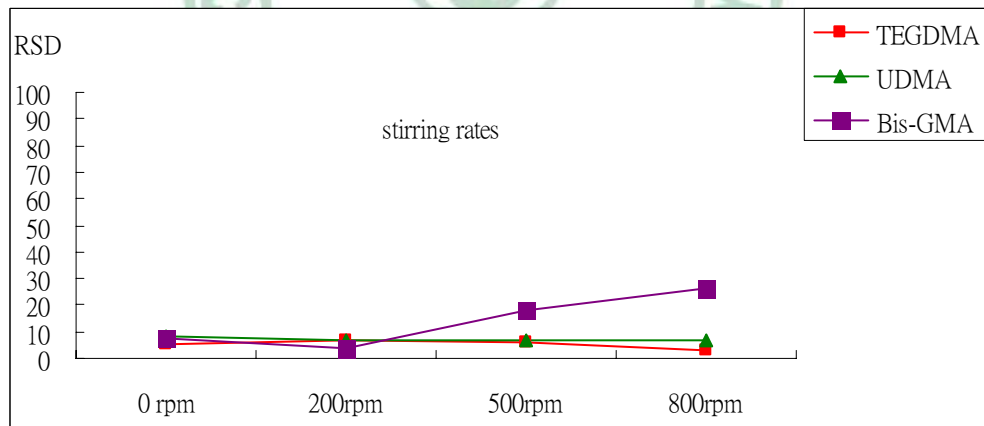


圖 4-2-6b 不同攪拌速度下之 RSD 值

4-2-7 附圖

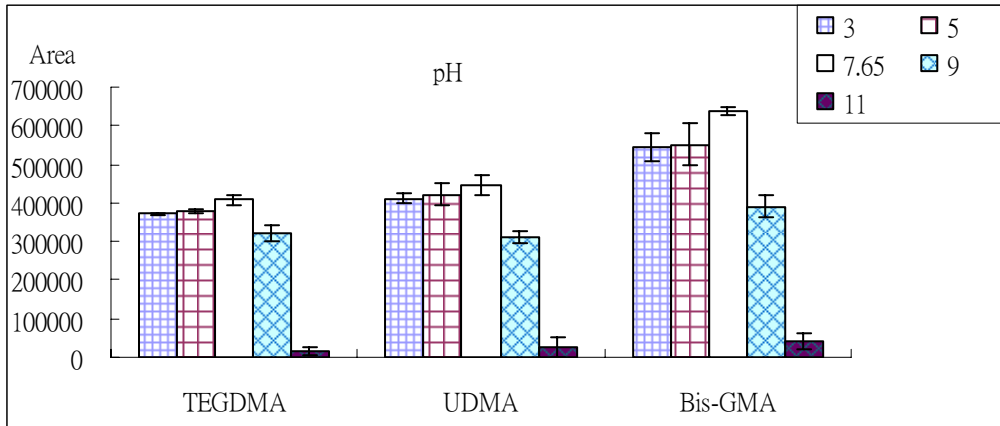


圖 4-2-7a pH 值探討

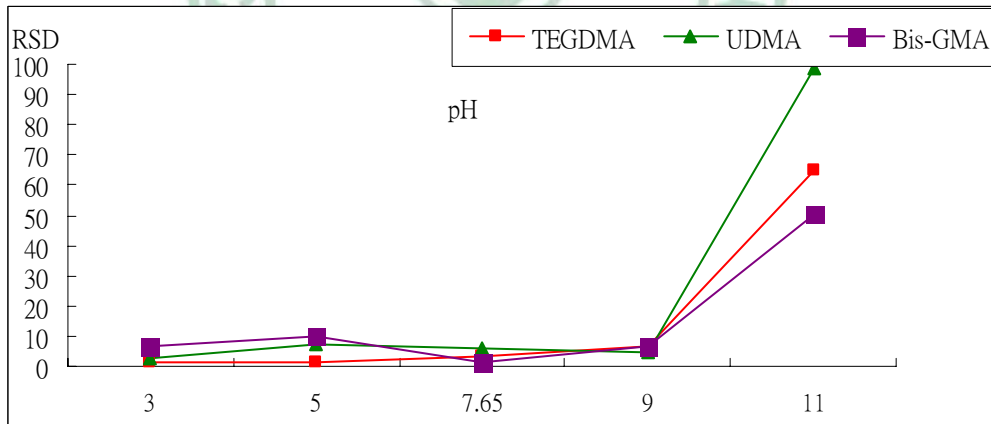


圖 4-2-7b 不同 pH 值下之 RSD 值

### 4-5-1 附圖

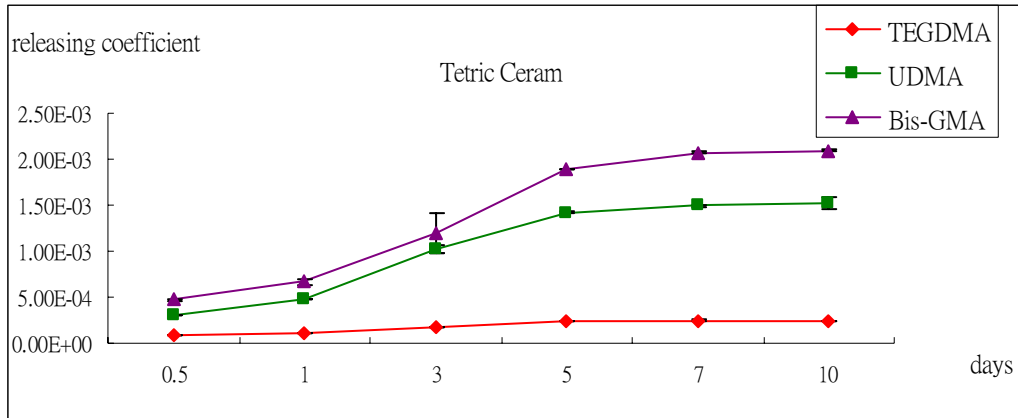


圖 4-5-1a 商品 Tetric Ceram

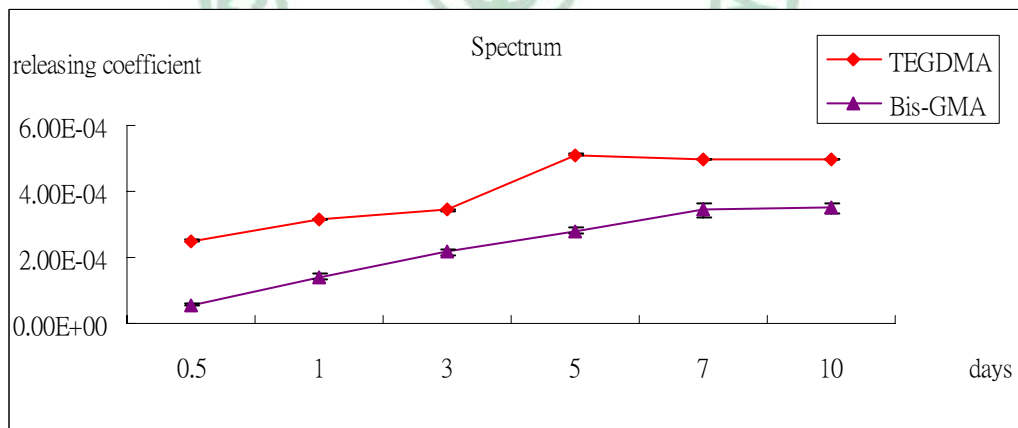


圖 4-5-1b 商品 Spectrum



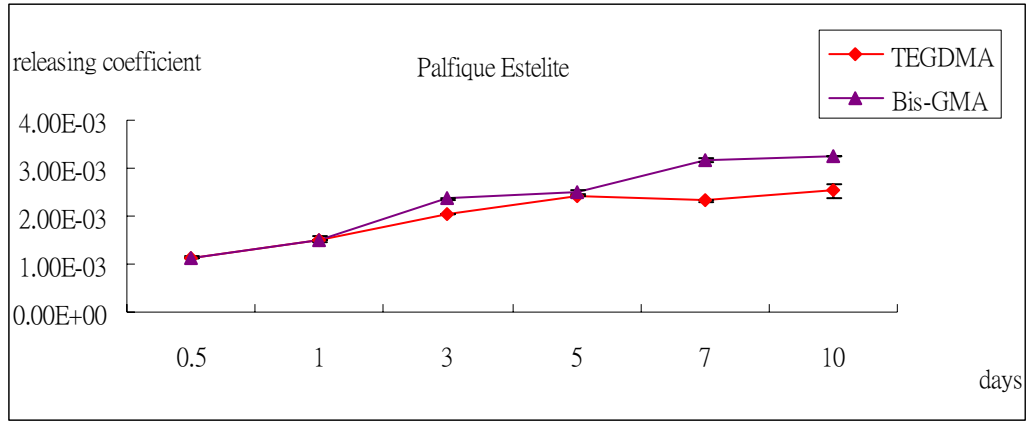


圖 4-5-1c 商品 Palfique Estelite

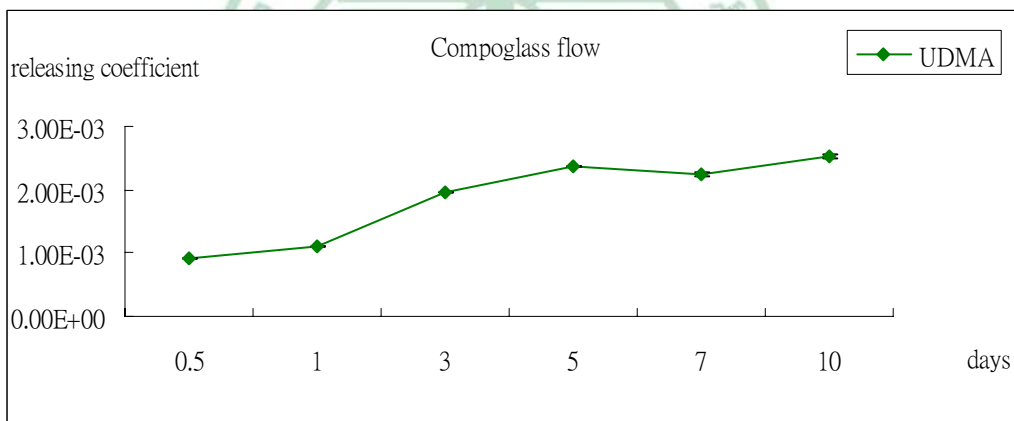


圖 4-5-1d 商品 Compoglass flow

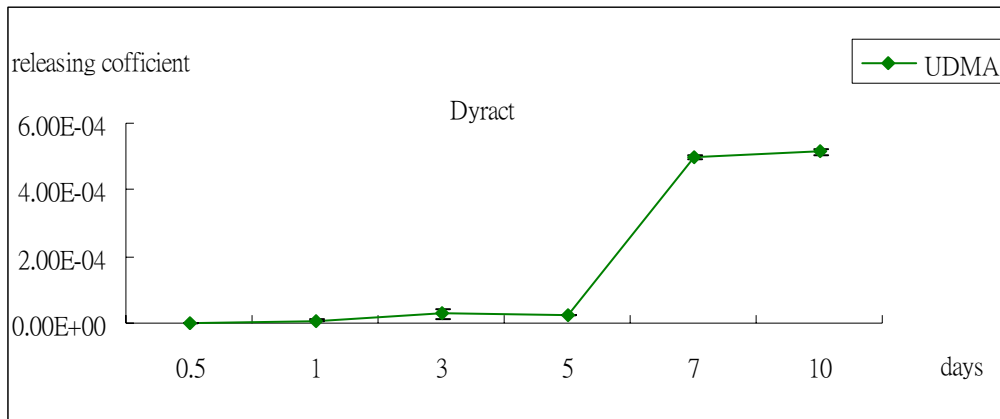


圖 4-5-1e 商品 Dyract

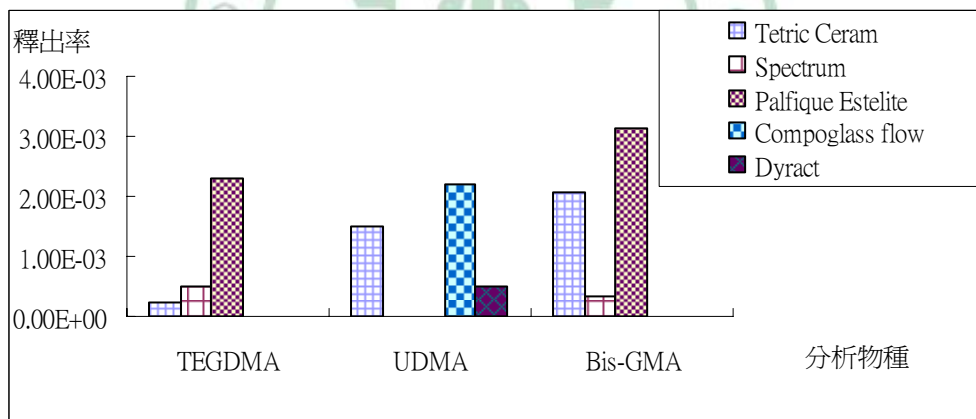


圖 4-5-1 f 商品 7 日溶出量比較

## 4-5-2 附圖

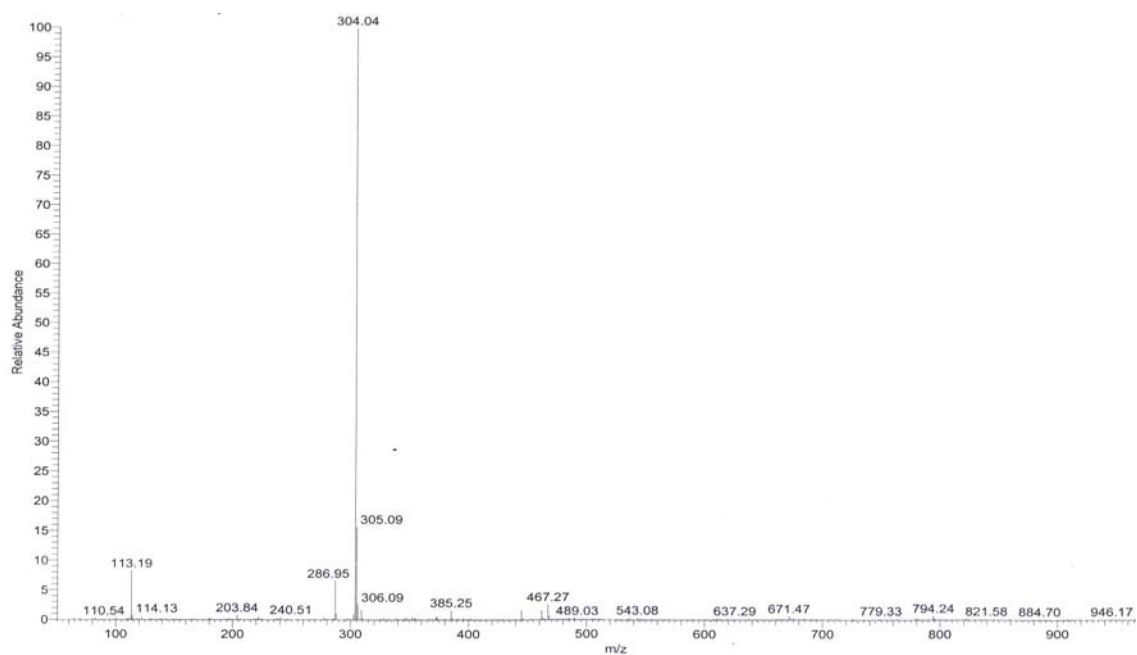


圖 4-5-2a 標準溶液 TEGDMA LC-MS-MS 質譜圖

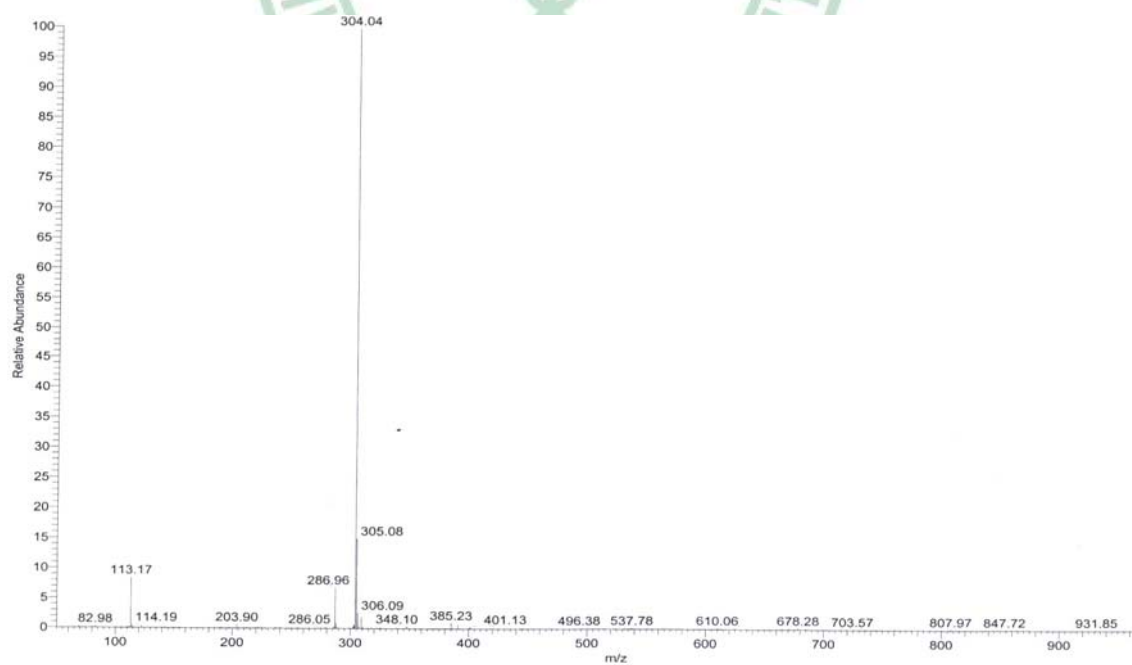


圖 4-5-2b 樹脂浸泡液 TEGDMA LC-MS-MS 質譜圖

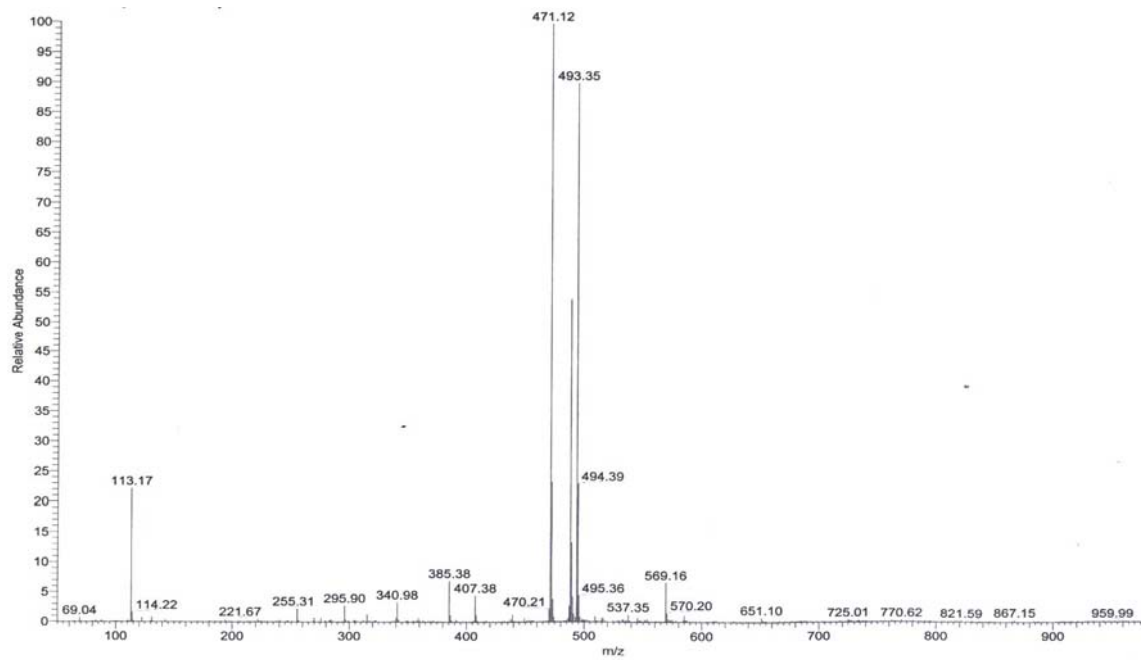


圖 4-5-2c 標準溶液 UDMA LC-MS-MS 質譜圖

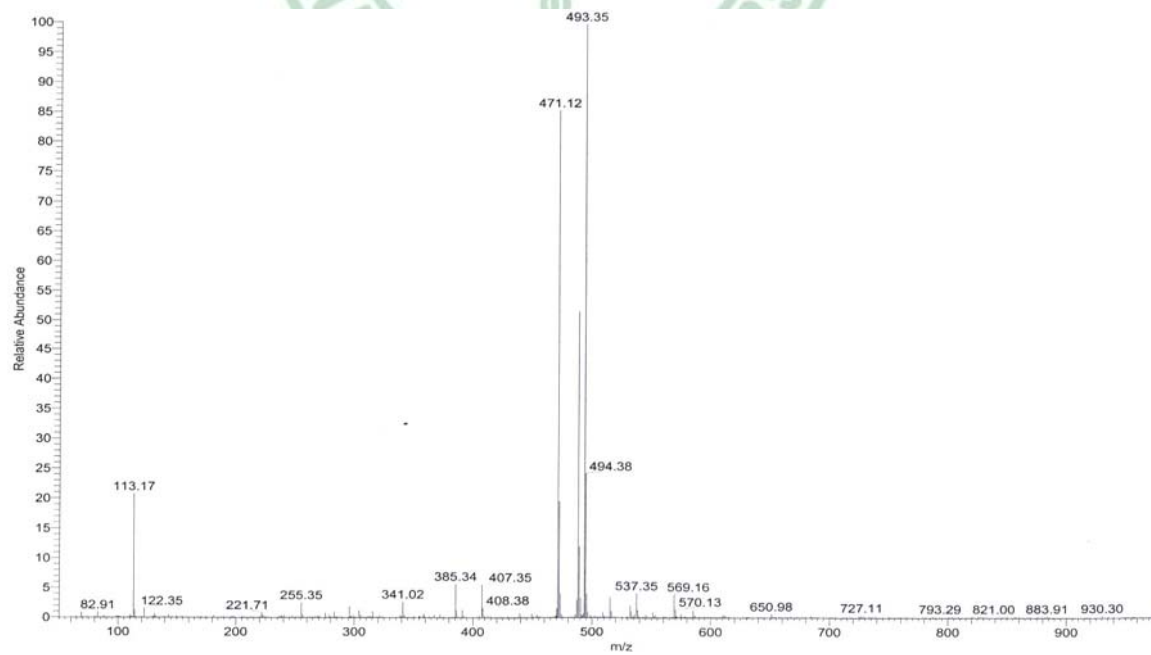


圖 4-5-2d 樹脂浸泡液 UDMA LC-MS-MS 質譜圖

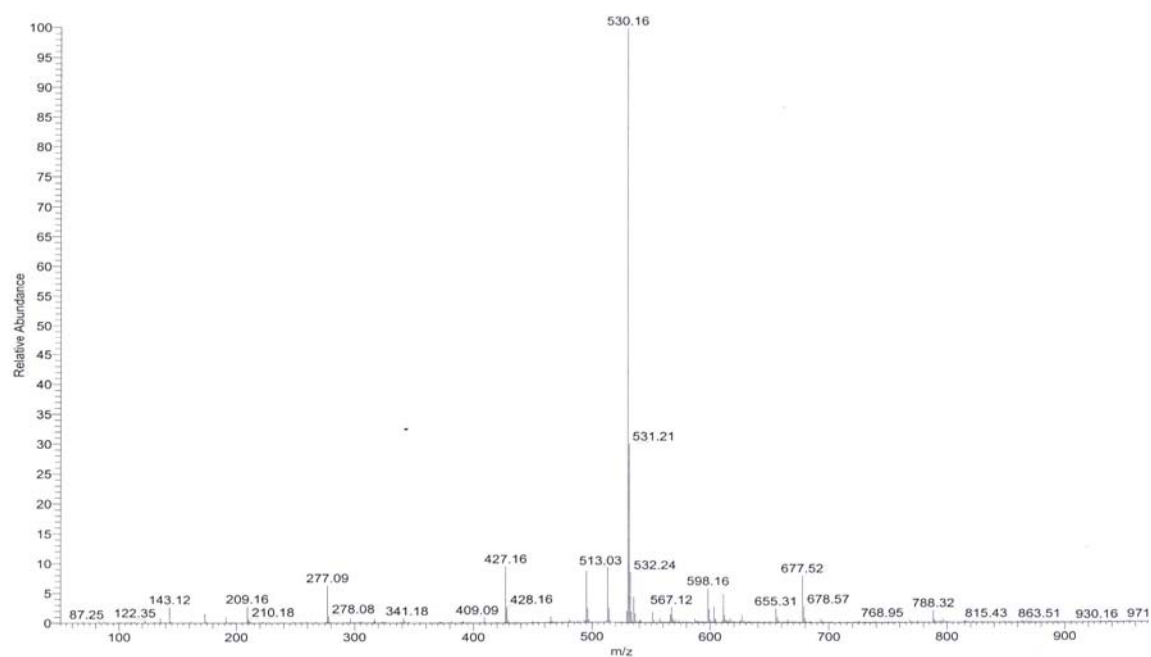


圖 4-5-2e 標準溶液 Bis-GMA LC-MS-MS 質譜圖

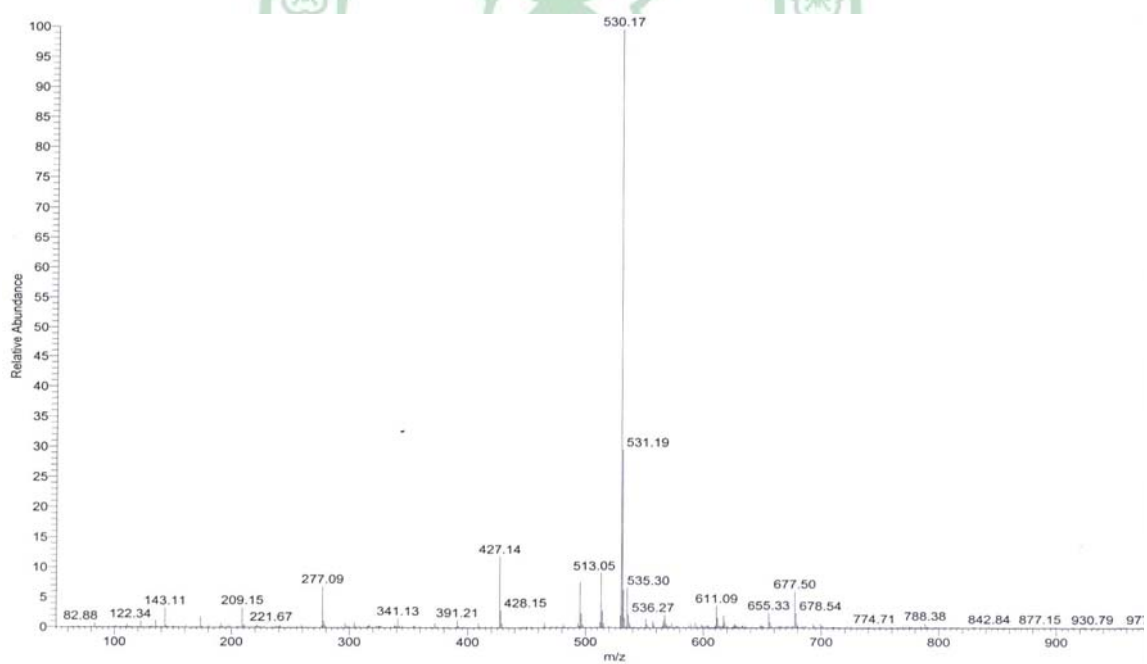


圖 4-5-2f 樹脂浸泡液 Bis-GMA LC-MS-MS 質譜圖

### 4-5-3 附圖

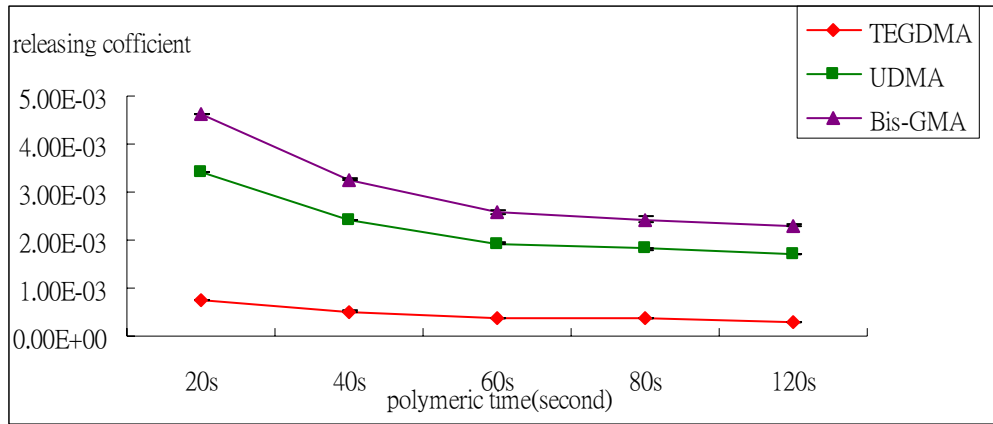


圖 4-5-3 聚合時間影響溶出量探討



#### 4-5-4 附圖

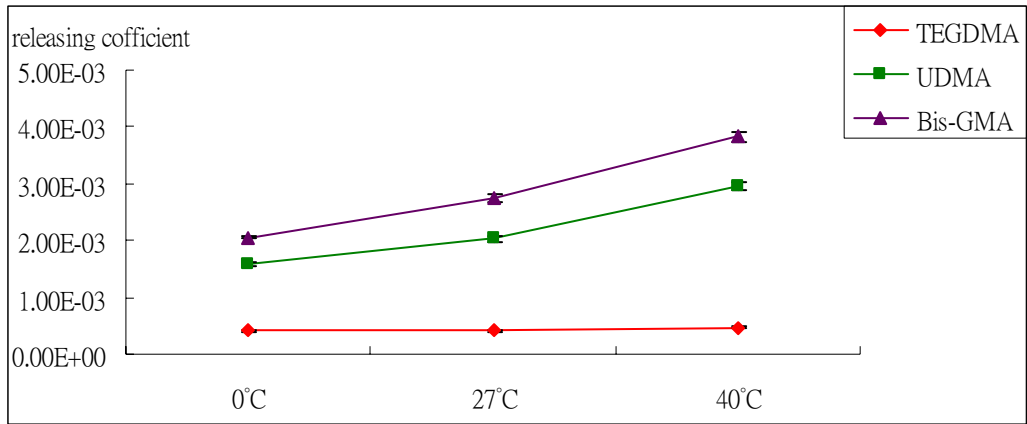


圖 4-5-4 溫度影響溶出量探討



### 4-5-5 附圖

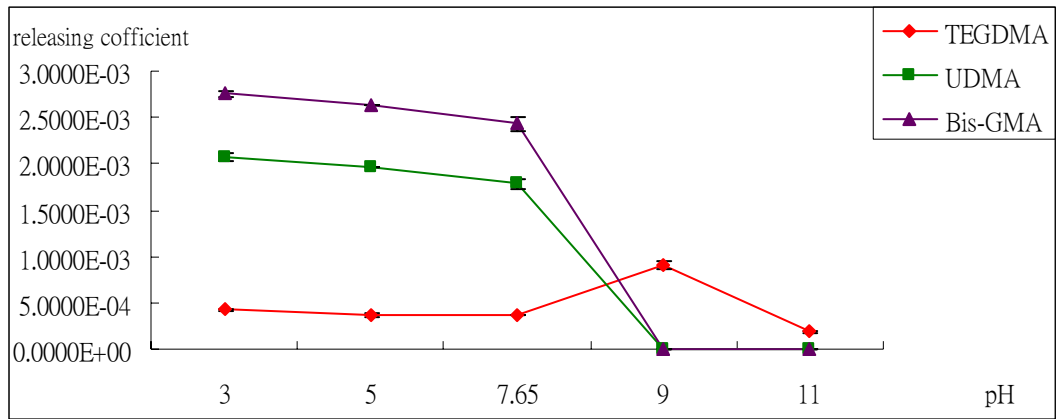


圖 4-5-5 pH 影響溶出量探討





表 4-2-2 SPME 吸附時間探討

TEGDMA	5 min	10 min	15 min	20 min	25 min
Mean(n=3)	99475	160078	246524	323524	303957
SD	3955	7200	9442	18941	4222
RSD %	3.98	4.5	3.83	5.85	1.39

UDMA	5 min	10 min	15 min	20 min	25 min
Mean(n=3)	48318	73571	122213	146717	133656
SD	4124	4929	10959	5602	7295
RSD %	8.54	6.70	8.97	3.82	5.46

Bis-GMA	5 min	10 min	15 min	20 min	25 min
Mean(n=3)	55638	72817	114118	166653	161526
SD	1640	5277	4192	19642	9412
RSD %	2.95	7.25	3.67	11.79	5.83

表 4-2-3 SPME 脫附劑探討

TEGDMA	移動相	100%乙腈	100%乙醇
Mean(n=3)	205385	318983	186930
SD	10433	8850	21890
RSD %	5.08	2.77	11.71

UDMA	移動相	100%乙腈	100%乙醇
Mean(n=3)	113804	175283	184703
SD	6977	12142	3110
RSD %	6.13	6.93	1.68

Bis-GMA	移動相	100%乙腈	100%乙醇
Mean(n=3)	101370	211575	171428
SD	5328	9070	8127
RSD %	5.26	4.29	4.74

表 4-2-4 SPME 脫附時間探討

TEGDMA	5 min	10 min	15 min	20 min
Mean(n=3)	302791	309000	290745	246443
SD	37159	35494	11714	19932
RSD %	12.27	11.49	4.03	8.09

UDMA	5 min	10 min	15 min	20 min
Mean(n=3)	157434	156415	142622	116176
SD	24354	22800	4818	4523
RSD %	15.47	14.58	3.38	3.89

Bis-GMA	5 min	10 min	15 min	20 min
Mean(n=3)	189148	179904	164015	118118
SD	40950	38826	3839	8417
RSD %	21.65	21.58	2.34	7.13

表 4-2-5 SPME 萃取溫度探討

TEGDMA	室溫	40 °C	60 °C	80 °C
Mean(n=3)	223862	392585	354773	220148
SD	10733	21736	27187	14827
RSD %	4.79	5.54	7.66	6.74

UDMA	室溫	40 °C	60 °C	80 °C
Mean(n=3)	96012	197917	293797	232941
SD	2051	15895	43582	12816
RSD %	2.14	8.03	14.83	5.5

Bis-GMA	室溫	40 °C	60 °C	80 °C
Mean(n=3)	85971	212033	410898	339617
SD	3789	16704	45694	61921
RSD %	4.41	7.88	11.12	18.23

表 4-2-6 SPME 攪拌與否探討

TEGDMA	0 rpm	200 rpm	500 rpm	800 rpm
Mean(n=3)	392585	405155	379214	390087
SD	21736	26262	26198	12419
RSD %	5.54	6.48	6.12	3.18

UDMA	0 rpm	200 rpm	500 rpm	800 rpm
Mean(n=3)	197917	326357	347107	367083
SD	15895	21875	24785	25352
RSD %	8.03	6.70	7.14	6.91

Bis-GMA	0 rpm	200 rpm	500 rpm	800 rpm
Mean(n=3)	212033	479050	683296	686788
SD	16704	17949	124762	183289
RSD %	7.88	3.75	18.26	26.69

表 4-2-7 SPME pH 值探討

TEGDMA	pH=3	pH=5	pH=7.65	pH=9	pH=11
Mean(n=3)	370981	380269	409351	322054	15071
SD	3741	6024	12898	22073	9748
RSD %	1.01	1.58	3.15	6.85	64.68

UDMA	pH=3	pH=5	pH=7.65	pH=9	pH=11
Mean(n=3)	412066	422483	444910	311157	25108
SD	10950	29591	26294	14256	24720
RSD %	2.66	7.00	5.91	4.58	98.45

Bis-GMA	pH=3	pH=5	pH=7.65	pH=9	pH=11
Mean(n=3)	545428	551334	637811	390864	42274
SD	37234	53189	10456	26930	21404
RSD %	6.83	9.65	1.64	6.89	50.63

表 4-3 分配係數

4-3a TEGDMA 低濃度分配係數

編號	配製濃度 ( $\mu\text{g/mL}$ )	纖維吸附量 (ng)	Fiber 體積 ( $\mu\text{l}$ )	分配係數
1	1.5	0.26	0.415	73.91
2	1.5	0.28	0.415	72.38
3	1.5	0.27	0.415	72.93
4	1.5	0.26	0.415	68.15
5	1.5	0.29	0.415	73.41
6	1.5	0.28	0.415	64.64
7	1.5	0.27	0.415	65.76
N= 7	MEAN= 70.17	SD= 3.9		

4-3b TEGDMA 高濃度分配係數

編號	配製濃度 ( $\mu\text{g/mL}$ )	纖維吸附量 (ng)	Fiber 體積 ( $\mu\text{l}$ )	分配係數
1	7.5	227.84	0.415	73.20
2	7.5	214.10	0.415	68.79
3	7.5	229.15	0.415	73.62
4	7.5	227.06	0.415	72.95
5	7.5	227.34	0.415	73.04
6	7.5	216.57	0.415	69.58
7	7.5	229.34	0.415	73.68
N= 7	MEAN= 72.12	SD= 2.04		

4-3c UDMA 低濃度分配係數

編號	配製濃度 ( $\mu\text{g/mL}$ )	纖維吸附量 (ng)	Fiber 體積 ( $\mu\text{l}$ )	分配係數
1	2.5	88.47	0.415	85.27
2	2.5	87.46	0.415	84.30
3	2.5	87.16	0.415	84.01
4	2.5	81.69	0.415	78.73
5	2.5	89.45	0.415	86.21
6	2.5	91.38	0.415	88.08
7	2.5	93.69	0.415	90.30
N= 7	MEAN= 85.27	SD= 3.64		

4-3d UDMA 高濃度分配係數

編號	配製濃度 ( $\mu\text{g/mL}$ )	纖維吸附量 (ng)	Fiber 體積 ( $\mu\text{l}$ )	分配係數
1	12.5	442.35	0.415	85.27
2	12.5	409.15	0.415	78.87
3	12.5	449.30	0.415	86.61
4	12.5	443.27	0.415	85.45
5	12.5	441.70	0.415	85.15
6	12.5	439.15	0.415	84.65
7	12.5	445.79	0.415	85.94
N= 7	MEAN= 84.56	SD= 2.59		



#### 4-3e Bis-GMA 低濃度分配係數

編號	配製濃度 ( $\mu\text{g/mL}$ )	纖維吸附量 (ng)	Fiber 體積 ( $\mu\text{l}$ )	分配係數
1	2.5	146.98	0.415	141.67
2	2.5	164.37	0.415	158.43
3	2.5	161.03	0.415	155.21
4	2.5	180.48	0.415	173.96
5	2.5	137.43	0.415	132.47
6	2.5	150.04	0.415	144.62
7	2.5	156.36	0.415	150.71
N= 7	MEAN= 151.01	SD= 13.36		

#### 4-3f Bis-GMA 高濃度分配係數

編號	配製濃度 ( $\mu\text{g/mL}$ )	纖維吸附量 (ng)	Fiber 體積 ( $\mu\text{l}$ )	分配係數
1	12.5	812.53	0.415	156.63
2	12.5	792.17	0.415	152.71
3	12.5	799.31	0.415	154.08
4	12.5	775.97	0.415	149.58
5	12.5	809.08	0.415	155.97
6	12.5	804.42	0.415	155.07
7	12.5	727.85	0.415	140.31
N= 7	MEAN= 152.05	SD= 5.69		

表 4-4-1 檢量線製作

4-4-1a TEGDMA

	濃度( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	方程式	$R^2$	RPD %
異日	0.3~30	$Y=48429X+1411.8$	1	-9.45~1.03
	0.3~30	$Y=47562X+118.1$	0.999	-11.52~4.30
	0.3~30	$Y=47671X-638.31$	0.999	-10.56~4.17

4-4-1b UDMA

	濃度( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	方程式	$R^2$	RPD %
異日	0.5~50	$Y=33421X+1584.8$	0.999	-9.42~2.55
	0.5~50	$Y=35291X+3161.8$	1	-1.73~4.16
	0.5~50	$Y=34248X+3021.9$	0.999	-7.8~7.45

4-4-1c Bis-GMA

	濃度( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	方程式	$R^2$	RPD %
異日	0.5~50	$Y=68195X-429.92$	0.999	-5.12~4.85
	0.5~50	$Y=68226X-2274.3$	0.999	-5.23~10.29
	0.5~50	$Y=68358X-1497.5$	0.999	-9.35~3.42

表 4-4-2 方法偵測極限

4-4-2a TEGDMA

編號	配製濃度 (µg/mL)	分析濃度(µg/mL)
1	0.3	0.26
2	0.3	0.28
3	0.3	0.27
4	0.3	0.26
5	0.3	0.29
6	0.3	0.28
7	0.3	0.27
SD=0.012		3*SD=0.035 MDL= 0.035 µg/mL

4-4-2b UDMA

編號	配製濃度 (µg/mL)	分析濃度(µg/mL)
1	0.5	0.41
2	0.5	0.52
3	0.5	0.42
4	0.5	0.53
5	0.5	0.62
6	0.5	0.65
7	0.5	0.57
SD=0.092		3*SD=0.276 MDL=0.276 µg/mL

#### 4-4-2c Bis-GMA

編號	配製濃度 ( $\mu\text{g/mL}$ )	分析濃度( $\mu\text{g/mL}$ )
1	0.5	0.48
2	0.5	0.50
3	0.5	0.50
4	0.5	0.50
5	0.5	0.55
6	0.5	0.51
7	0.5	0.52

SD=0.021    3\*SD=0.064    MDL =0.064  $\mu\text{g/mL}$



表 4-4-3 準確度與精密度測試

4-4-3a TEGDMA 低濃度精密度與準確度

編號	配製濃度 (µg/mL)	分析濃度 (µg/mL)	回收率%
1	1.5	1.55	103.18
2	1.5	1.52	101.10
3	1.5	1.53	101.85
4	1.5	1.43	95.34
5	1.5	1.54	102.51
6	1.5	1.36	90.55
7	1.5	1.38	92.06

準確度=98.08 % SD=5.31 CV%=5.42 %

4-3-3b TEGDMA 高濃度精密度與準確度

編號	配製濃度 (µg/mL)	分析濃度 (µg/mL)	回收率%
1	7.5	7.52	100.3091
2	7.5	7.07	94.29094
3	7.5	7.57	100.8845
4	7.5	7.50	99.96633
5	7.5	7.51	100.0891
6	7.5	7.15	95.37321
7	7.5	7.57	100.9663

準確度= 98.84 % SD=2.78 CV%=2.81 %

#### 4-4-3c UDMA 低濃度精密度與準確度

編號	配製濃度 (µg/mL)	分析濃度 (µg/mL)	回收率%
1	2.5	2.61	104.23
2	2.5	2.58	103.09
3	2.5	2.57	102.75
4	2.5	2.41	96.55
5	2.5	2.63	105.34
6	2.5	2.69	107.53
7	2.5	2.75	110.14

準確度=104.23 % SD= 4.27 CV %=4.10 %

#### 4-4-3d UDMA 高濃度精密度與準確度

編號	配製濃度 (µg/mL)	分析濃度 (µg/mL)	回收率%
1	12.5	12.62	100.97
2	12.5	11.68	93.45
3	12.5	12.82	102.54
4	12.5	12.65	101.18
5	12.5	12.60	100.82
6	12.5	12.53	100.24
7	12.5	12.72	101.75

準確度=100.14 % SD= 3.04 CV %= 3.03 %

#### 4-4-3e Bis-GMA 低濃度精密度與準確度

編號	配製濃度 (µg/mL)	分析濃度 (µg/mL)	回收率%
1	2.5	2.40	96.03
2	2.5	2.66	106.45
3	2.5	2.61	104.44
4	2.5	2.90	116.10
5	2.5	2.26	90.31
6	2.5	2.45	97.86
7	2.5	2.54	101.65

準確度=101.83% SD= 8.30 CV %= 8.15 %

#### 4-4-3f Bis-GMA 高濃度精密度與準確度

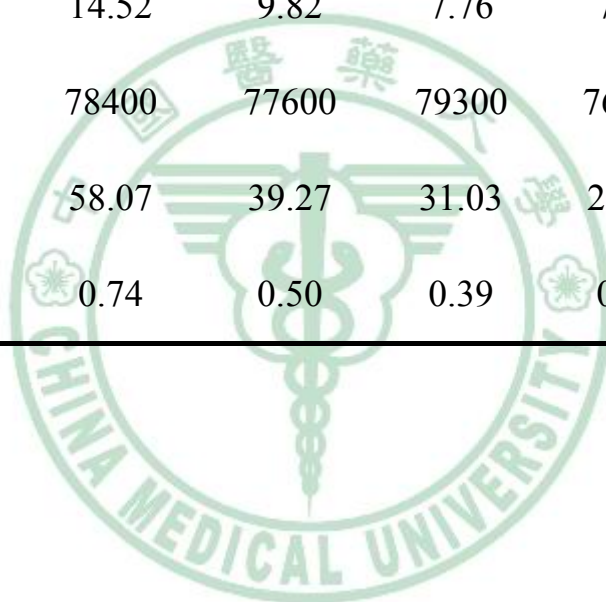
編號	配製濃度 (µg/mL)	分析濃度 (µg/mL)	回收率%
1	12.5	12.37	98.94
2	12.5	12.06	96.50
3	12.5	12.17	97.35
4	12.5	11.82	94.56
5	12.5	12.32	98.52
6	12.5	12.25	97.97
7	12.5	11.10	88.79

準確度=96.09% SD= 3.53 CV %= 3.68 %

表 4-5-3 聚合時間對溶出量影響

4-5-3a TEGDMA

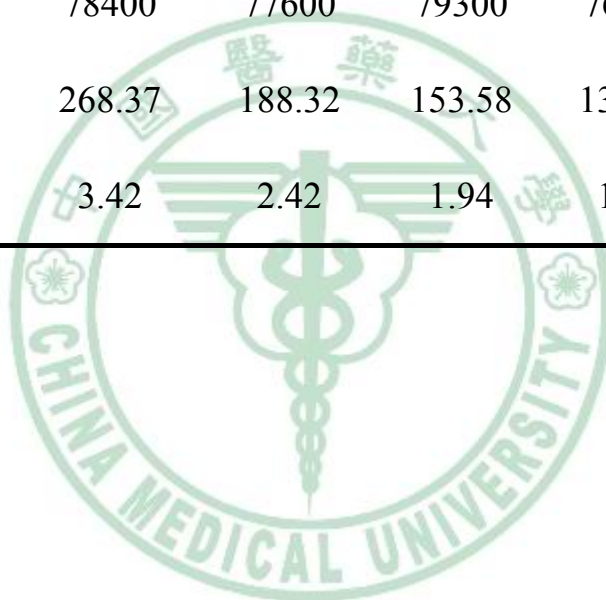
聚合時間	20s	40s	60s	80s	120s
Mean(n=2)	118670	81272	64880	60206	43507
SD	936	1828	919	492	597
RSD %	0.79	2.25	1.42	0.82	1.37
濃度 $\mu\text{g/mL}$	14.52	9.82	7.76	7.17	5.07
聚合重量(ng)	78400	77600	79300	76300	69400
溶出量(ng)	58.07	39.27	31.03	28.68	20.29
溶出率 $\times 1000$	0.74	0.50	0.39	0.37	0.29





## 4-5-3b UDMA

聚合時間	20s	40s	60s	80s	120s
Mean(n=2)	319135	224483.5	183412.5	165830	140829.5
SD	13.44	999.14	1093.89	4405.28	813.88
RSD %	0.00	0.45	0.60	2.66	0.58
濃度 $\mu\text{g/mL}$	67.09	47.08	38.40	34.68	29.39
聚合重量(ng)	78400	77600	79300	76300	69400
溶出量(ng)	268.37	188.32	153.58	138.71	117.57
溶出率 $\times 1000$	3.42	2.42	1.94	1.84	1.70



## 4-5-3c Bis-GMA

聚合時間	20s	40s	60s	80s	120s
Mean(n=2)	477147.5	332901.5	270895.5	249087.5	210272.5
SD	368.40	2123.44	4509.22	7374.42	1024.60
RSD %	0.08	0.64	1.66	2.96	0.49
濃度 $\mu\text{g/mL}$	90.82	63.34	51.53	47.38	39.98
聚合重量(ng)	78400	77600	79300	76300	69400
溶出量(ng)	363.27	253.36	206.12	189.50	159.93
溶出率 $\times 1000$	4.63	3.26	2.60	2.48	2.30

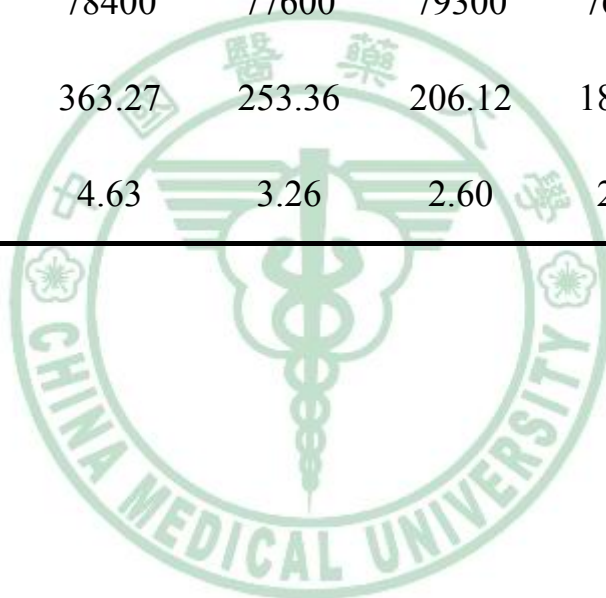
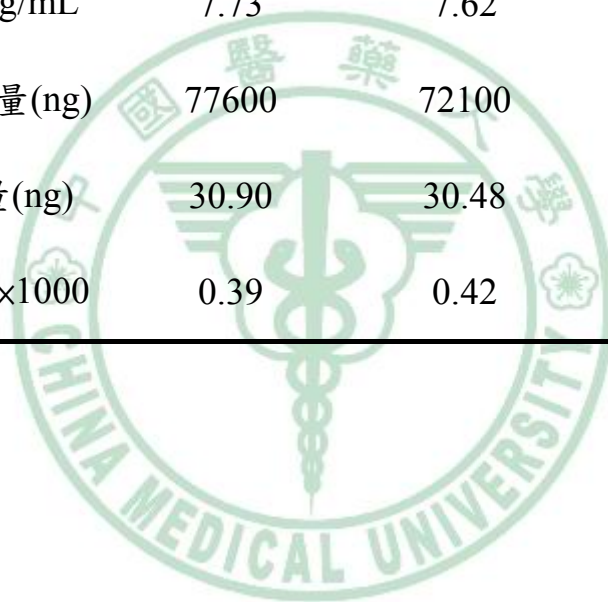


表 4-5-4 溫度對溶出量影響

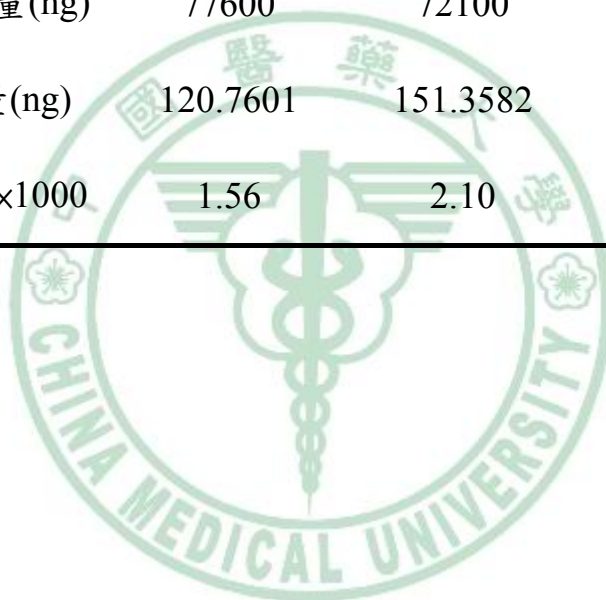
4-5-4a TEGDMA

溫度	0°C	室溫(27°C)	40°C
Mean(n=2)	64625.67	63781.67	63670.67
SD	2330.80	2010.35	2089.45
RSD %	3.61	3.15	3.28
濃度 $\mu\text{g/mL}$	7.73	7.62	7.61
聚合重量(ng)	77600	72100	67200
溶出量(ng)	30.90	30.48	30.42
溶出率 $\times 1000$	0.39	0.42	0.45



## 4-5-4b UDMA

溫度	0°C	室溫(27°C)	40°C
Mean(n=2)	144604	180781.7	230396
SD	2185.00	4621.92	5792.68
RSD %	1.51	2.56	2.51
濃度 $\mu\text{g/mL}$	30.19	37.84	48.33
聚合重量(ng)	77600	72100	67200
溶出量(ng)	120.7601	151.3582	193.3207
溶出率 $\times 1000$	1.56	2.10	2.88



## 4-5-4c Bis-GMA

溫度	0°C	室溫(27°C)	40°C
Mean(n=2)	209056.7	267433.7	328958.3
SD	880.70	6791.13	8703.42
RSD %	0.42	2.54	2.65
濃度 $\mu\text{g/mL}$	39.75	50.87	62.59
聚合重量(ng)	77600	72100	67200
溶出量(ng)	159.00	203.48	250.36
溶出率 $\times 1000$	2.05	2.82	3.73

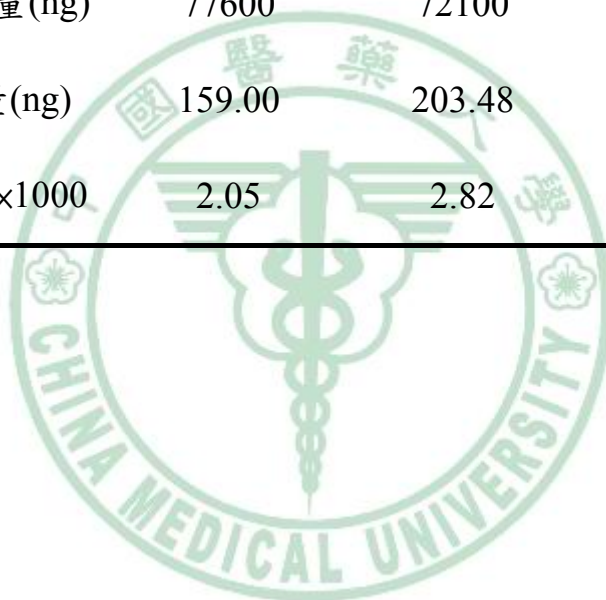
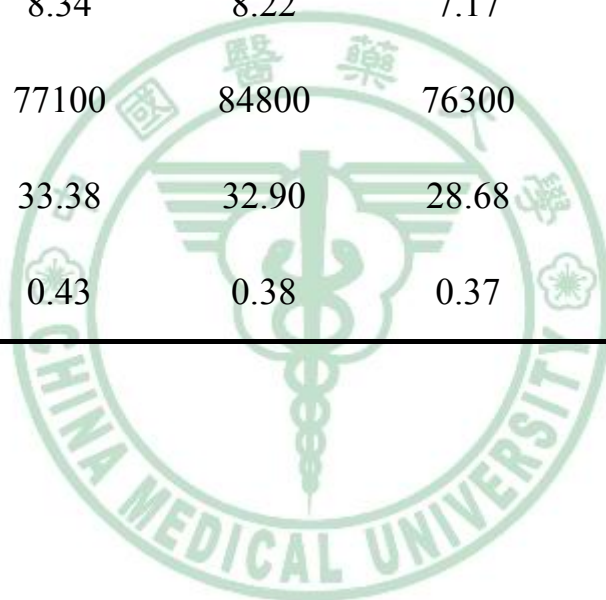


表 4-5-5 pH 值對溶出量影響

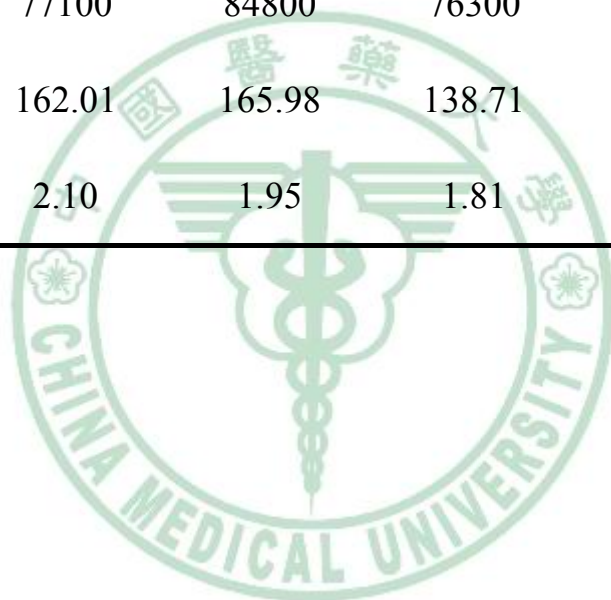
4-5-5a TEGDMA

pH 值	3	5	7.65	9	11
Mean(n=2)	69544	68588	60206	155873	34005
SD	1202.08	4682.4	492.15	6713.27	2291.03
RSD %	1.73	6.83	0.82	4.31	6.74
濃度 $\mu\text{g/mL}$	8.34	8.22	7.17	19.19	3.88
聚合重量(ng)	77100	84800	76300	81500	79600
溶出量(ng)	33.38	32.90	28.68	76.77	15.51
溶出率 $\times 1000$	0.43	0.38	0.37	0.94	0.19



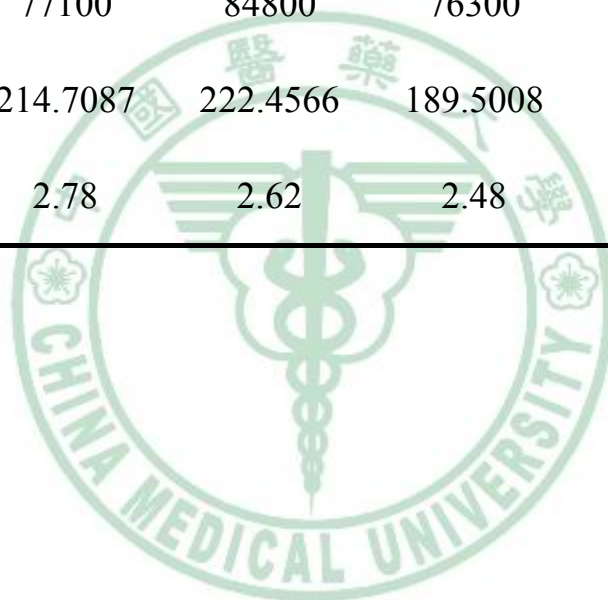
## 4-5-5b UDMA

pH 值	3	5	7.65	9	11
Mean(n=2)	193370.5	198073	165830	0	0
SD	3334.01	895.20	4405.28	0	0
RSD %	1.72	0.45	2.66	0	0
濃度 $\mu\text{g/mL}$	40.50	41.50	34.68	0	0
聚合重量(ng)	77100	84800	76300	81500	79600
溶出量(ng)	162.01	165.98	138.71	0	0
溶出率 $\times 1000$	2.10	1.95	1.81	0	0



## 4-5-5c Bis-GMA

pH 值	3	5	7.65	9	11
Mean(n=2)	282171	292339.5	249087.5	0	0
SD	3420.98	195.87	7374.42	0	0
RSD %	1.21	0.07	2.96	0	0
濃度 $\mu\text{g/mL}$	53.68	55.61	47.38	0	0
聚合重量(ng)	77100	84800	76300	81500	79600
溶出量(ng)	214.7087	222.4566	189.5008	0	0
溶出率 $\times 1000$	2.78	2.62	2.48	0	0





## 第五章 結論與建議

本次研究針對光聚複合式樹脂聚合不完全溶出，其溶出物 TEGDMA、UDMA、Bis-GMA 擬開發一個以直接固相微萃取結合液相層析儀的分析方法來評估其溶出量，同時探討聚合時間、溫度與 pH 值對樹脂溶出量的影響。總結本次研究結論及建議如下：

### (一) 結論與建議：

1. 本研究所開發之直接固相微萃取法，在單因素考量下，為將標準品添加於未經 pH 值調整唾液溶液中，裝滿 4 mL vial，瓶中加入攪拌磁石，密封後於 40°C 下、轉速 200 rpm 下，以 60  $\mu$ mPDMS/DVB 纖維直接吸附 20 分鐘，再以移動相( 65 %乙腈、35 %D. I. 水)靜態脫附 15 分鐘，配合適當之儀器參數，在此分析條件探討下，可得一最適 Direct-SPME-HPLC 分析方法，而套用以上 SPME 參數探討分配係數，高低濃度的分配係數皆穩定。
2. 檢量線範圍為 TEGDMA：0.3~30  $\mu$ g/mL；UDMA：0.5~50  $\mu$ g/mL；Bis-GMA: 0.5~50；分析方法其方法偵測極限分別為 TEGDMA：0.035  $\mu$ g/mL；UDMA：0.276  $\mu$ g/mL；Bis-GMA：0.064  $\mu$ g/mL 並且其精密度無論在低濃度或高濃度 CV 值皆在 10 %以內，且準確度皆介於 100 $\pm$ 10 %之間，分析方法之再現性良好。

3. 樹脂溶出物在口腔環境中會被分解，而唾液樣本皆無偵測到分析物，可知酵素分解速度較釋出速度快，進入人體循環系統大部份為分解後產物，應對釋出物的分解產物作一健康評估。
4. 聚合時間、溫度與 pH 值皆會影響樹脂溶出，聚合時間影響是最顯著的，增加聚合時間可降低其溶出量；隨著溫度增加 UDMA、Bis-GMA 溶出量增加；隨著 pH 減少，三種物質溶出量隨著增加。  
建議在樹脂填補完的第一周，以漱口來降低口腔溫度，沖淡口腔酸性環境，盡量少吃過熱及偏酸的食物，以減少溶出量。

## (二) 未來發展

1. 已知唾液酶會與樹脂溶出物產生水解反應，但不同酶對不同物質的分解機制是未知的，由實驗得知，樹脂於唾液中的溶出物全部被酶分解，針對特定溶出物，探討其分解機制及產物量的變化，有助於更了解樹脂溶出的健康危害。
2. 以往對於樹脂溶出的培養皆在固定量的溶液中做培養，以模擬真實口腔之暴露腔來評估其溶出總量，對健康評估才是最準確的。

## 參考文獻

1. Phoenix RD. Denture base materials. *Dental Clinics of North America* 1996; 40: 113-120.
2. Jagger DC, Harrison A and Mazoug K. Effect of the addition of poly (methyl methacrylate) beads on some properties of acrylic resin. *International Journal of Prosthodont* 2000; 13: 378-382.
3. Peutzfeldt A. Resin composite in dentistry: the monomer system. *European Journal of Oral Sciences* 1997; 97-116.
4. Mjor IA, Moorehead JE, and Dahl JE. Selection of restorative materials in permanent teeth in general dental practice. *Acta Odontol Scand* 1999; 57: 257-262.
5. Ferracane JL. Elution of leachable components from composites. *Journal of Oral Rehabilitation* 1994; 21: 441-446.
6. Michelsen VB, Lygre H, Skalevik R and Treit AB. Identification of organic eluates from four polymer-based dental filling materials. *European Journal of Oral Sciences* 2003; 111: 263-271.
7. Asmussen E. Factors affecting the quantity of remaining double bonds in restorative resin polymers. *Scandinavian Journal of Dental Research* 1982; 90: 490-496.
8. Ruyter IE and Svendsen SA. Remaining methacrylate groups in composite restorative materials. *Acta Odontol Scand* 1978; 36: 75-82.
9. Asmussen E. Factors affecting the quantity of remaining double bonds in restorative resin polymers. *Scand J Dent Res* 1982; 90: 490-496.
10. Ferracane JL and Greener EH. Fourier transform infrared analysis of degree of polymerization in unfilled resins-methods comparison. *J Dent Res*

1984; 63: 1093-1095.

11. Geurtzen W. Substances release from dental resin composites and glass ionomer composites. *European Journal of Oral Sciences* 1998; 106: 687-692.

12. Norbert HK. Genotoxicity and Cytotoxicity of dental materials in human lymphocytes as assessed by the single cell microgel electrophoresis (comet) assay. *Journal of Dentistry* 2004; 32: 229-234.

13. Henriks-Eckerman ML, Suuronen K, Jolanki R, and Alanko K. Methacrylates in dental restorative materials. *Contact Dermatitis* 2004;50:233-237.

14. Abdul H, Wyatt RH. A study of component release from resin pit and fissure sealants in vitro. *Dent Mater* 1997; 13: 98-102

15. Santerre JP, Jaffer F and Finer Y. Interactions between resin monomers and commercial composite resins with human saliva derived esterases. *Biomater* 2002; 23: 1707-1719

16. Tanaka K, Taira M, Shintani H, Wakasa K and Yamaki M. Residual monomers (TEGDMA and Bis-GMA) of a set visible-light-cured dental composite resin when immersed in water. *Journal of Oral Rehabilitation* 1991; 18: 352-362.

17. Santerre JP, Shajii L and Tsang H. Biodegradation of commercial dental composites by cholesterol esterase. *Journal of Dental Research* 1999; 78: 1459-1468.

18. Wendt SL, Werner A, and Davidson CL. Influence of enzymes and plaque acids on in vitro wear of dental composites. *Biomaterials* 1996; 17: 1327-1332.

19. Janr CA. Stability of bisphenol A, triethylene-glycol dimethacrylate and bisphenol A dimethacrylate in whole saliva. *Dental Materials* 2002; 18:

128-135.

20. Vahidi F. The provisional restoration. *Dent Clin North Am* 1987;31: 363-381.

21. Ireland MF, Dixon DL, Breeding LC and Ramp MH. In vitro mechanical property comparison of four resins used for fabrication of provisional fixed restorations. *J Prosthet Dent* 1998; 80: 152-162.

22. Emtiaz S and Tarnow DP. Processed acrylic resin provisional restoration with lingual cast metal framework. *J Prosthet Dent* 1998; 79: 484-488.

23. Asmussen E and Peutzfeldt A. Influence of UEDMA BisGMA and TEGDMA on selected mechanical properties of experimental resin composites. *Dental Materials* 1998; 14(1):51-56.

24 . 吳育霖. 陳瑞松: 複合樹脂以相同能量密度聚合所得之物理特性研究。碩士論文 2002

25. Wang X, Powers JM and Connelly ME. Color stability of heat-activated and chemically activated fluid resin acrylics. *J Prosthodont* 1996; 5: 266-269.

26. Yannikakis SA, Zissis AJ, Polyzois GL and Caroni C. Color stability of provisional resin restorative materials. *J Prosthet Dent* 1998; 80: 533-539.

27. Wang RL, Moor BK, Goodacre CJ, Swartz ML and Andress CJ. A comparison of resins for fabricating provisional fixed restorations. *Int J Prosthodont* 1989; 2: 173-184.

28. Sulong MZ and Aziz RA. Wear of materials used in dentistry: a review of the literature. *J Prosthet Dent* 1990; 63: 342-349.

29. Huang FM and Tai KW. Cytotoxic evaluation of various types of

- denture base resins. The 23rd Asia Pacific Dental Congress 2001 DM-03.
30. Huang FM and Hu CC. Residual monomer releasing from acrylic denture base in water. *Chin Dent* 2000; 19: 17-22.
31. Ruyter IE and Oysaed H. Conversion in denture base polymers. *J Biomed Mater Res* 1982; 16: 741-754.
32. Saillenfait AM, Bonnet P, Gallissot F, Peltier A and Fabries JF. Developmental toxicities of methacrylic acid , ethyl methacrylate, n-butyl methacrylate and alyl methacrylate in rats following inhalation exposure. *Toxicological Sciences* 1999; 50: 136-145.
33. Geurtsen W. Biocompatibility of resin-modified filling materials.
34. Lefebvre CA, Schuster GS, Richardson DW and Barron DJ. The cytotoxic effects of denture base resin sealants. *Int J Prosthodont* 1992; 5: 558-562.
35. Tang AT, Li J, Ekstrand J and Liu Y. Cytotoxicity tests of in situ polymerized resins: methodological comparisons and introduction of a tissue culture insert as a testing device. *J Biomed Mater Res* 1999; 45: 214-220.
36. Cimpan MR, Cressey LI, Skaug N, Halstensen A, Lie SA, Gjertsen BT and Matre R. Patterns of cell death induced by eluates from denture base acrylic resins in U-937 human monoblastoid cells. *Eur J Oral Sci* 2000; 108: 59-69.
37. Ratanasathien S, Wataha JC, Hanks CT and Dennison JB. Cytotoxic interactive effects of dentin bonding components on mouse fibroblasts. *J Dent Res* 1995; 74: 1602-1606.
38. Terakado M, Yamazaki M, Tsujimoto Y, Kawashima T, Nagashima K and Ogawa J. Lipid peroxidation as a possible cause of benzoyl peroxide

toxicity in rabbit dental pulp-a microsomal lipid peroxidation in vitro. J Dent Res 1984; 63: 901-905

39. Birk LI and Munksgaard EG. Effect of human saliva on surface degradation of composite resins. Scand J Dent Res 1991; 99: 254-261

40. Jane CA, Francis D, Frederick E, Robert S and Gordon J. Stability of bisphenol A, triethylene-glycol dimethacrylate, and bisphenol A dimethacrylate in whole saliva. Dent Mater 2002; 18: 128-135

41. 黃敬德.謝有容：固相微萃取法。科儀新知 1997; 18(4): 59-67.

42. 黃敬德.謝有容：固相微萃取技術之原理及其應用。Chemistry(The Chinese Chem.Soc.,Taipei) 1998; 56(4): 311-318.

43. 李德仁：固相微萃取樣本前處理技術應用於揮發性或半揮發性有機物質之 GC 分析。科儀新知 1998 ;19(6): 16-25.

44. Ulrich S. Solid-phase microextraction in biomedical analysis. Journal of Chromatography A 2000; 902: 167-194.

45. Pawliszyn J. Solid Phase Microextraction: Theory and Practice. 1997

46. Supelco, SPME application Guide.1999.

47. Supelco : 2000 Chromatography Products for Analysis and Purification. Bellefonte, PA: Sigma-Aldrich Co., 2000.

48. Carlo G. Coupling solid-phase microextraction to liquid chromatography. Anal Bioanal Chem 2003; 375: 73-80.

49. Supelco. Solid phase microextratuon theory and optimization of conditions. Bellefonte, PA: Sigma-Aldrich Co., 1998.

50. Lee MR, Yeh YC, Hsiang WS and Chen CC. Application of solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry for the

determination of chlorophenols in urine. *Journal of Chromatography B* 1998; 707: 91-97.

51. Centini F, Masti A and Comparini B. Quantitative and qualitative analysis of MDMA, MDEA, MA and amphetamine in urine by head-space/solid phase micro-extraction (SPME) and GC/MS. *Forensic Science International* 1996; 83: 161-166.

52. Snow NH. Solid-phase micro-extraction of drugs from biological matrices (Review). *Journal of Chromatography A* 2000; 885: 445-455.

53. Ortengren U, Langer S, Goransson A and Lundgren T. Influence of pH and time on organic substance release from a model dental composite: a fluorescence spectrophotometry and gas chromatography/mass spectrometry analysis. *European Journal of Oral Sciences* 2004; 112: 530-537

54. Robert E, Shirey and Raymond F. A systematic approach for selecting the appropriate SPME fiber. SUPELCO, SUPELCO park, Bellefonte PA 16823.