

Udvikling af analysemetode til bestemmelse af peroxider, tilstede eller frigjort tandblegeprodukter

Margit M. Fernqvist, Niels Kroer & Svend J. Binnerup

Danmarks Miljøundersøgelser
Aarhus Universitet
Afdeling for Miljøkemi og Mikrobiologi

Miljøstyrelsen vil, når lejligheden gives, offentliggøre rapporter og indlæg vedrørende forsknings- og udviklingsprojekter inden for miljøsektoren, finansieret af Miljøstyrelsens undersøgelsesbevilling.

Det skal bemærkes, at en sådan offentliggørelse ikke nødvendigvis betyder, at det pågældende indlæg giver udtryk for Miljøstyrelsens synspunkter.

Offentliggørelsen betyder imidlertid, at Miljøstyrelsen finder, at indholdet udgør et væsentligt indlæg i debatten omkring den danske miljøpolitik.

Indhold

FORORD	5
SAMMENFATNING OG KONKLUSIONER	7
<i>Udvikling af katalase bioassay til peroxid-bestemmelse</i>	7
<i>Behov for forbedret metode til bestemmelse af aktivstoffer i tandblegeprodukter</i>	7
<i>Etablering af protokol for bestemmelse af peroxider ved brug af et enzymatisk bioassay</i>	7
<i>Hovedkonklusioner</i>	8
<i>Projektresultater – Protokol til bestemmelse af frit og bundet brintperoxid i tandblegemidler</i>	8
SUMMARY AND CONCLUSIONS	11
<i>Development of a catalase bioassay for hydrogen peroxid measurement</i>	11
1 INDLEDNING	13
2 ANALYSE AF PEROXIDER	15
2.1 KEMISK ANALYSE AF PEROXID I TANDBLEGNINGSPRODUKTER	15
2.2 ANALYSE AF PEROXID VED BRUG AF KATALASE BIOASSAY	15
3 UDVIKLING OG TEST AF KATALASE BIOASSAY TIL BESTEMMELSE AF PEROXIDER	17
3.1 TEKNISK DESIGN AF MÅLEKAMMER, ELEKTRODE OG DATAOPSAMLING	17
3.1.1 <i>Forsøgsopstilling</i>	18
3.1.2 <i>Test af elektrodens stabilitet</i>	18
3.1.3 <i>Test af reaktionskammerets tæthed</i>	18
3.2 FASTLÆGGELSE AF OPTIMALE BETINGELSER FOR KATALASE BIOASSAY	19
3.2.1 <i>Test af metodens optimale måleområde og nedre detektionsgrænse</i>	19
3.2.2 <i>Test af katalasens stabilitet</i>	21
3.3 AFPRØVNING AF KATALASE BIOASSAYET PÅ PEROXIDER I REN FORM	25
3.3.1 <i>Brint- og ureaperoxid</i>	25
3.3.2 <i>Calciumperoxid</i>	26
3.3.3 <i>Natriumperborater og natriumpercarbonat</i>	28
3.3.4 <i>Oversigt over genfindingsprocenter samt præcision på de forskellige peroxider målt i katalase bioassayet</i>	29
4 AFPRØVNING PÅ PRODUKTER	31
5 RESULTATVURDERING OG KONKLUSION	35
6 REFERENCER	37

- Bilag 1: Tekniske specifikationer for ilt-elektroden
- Bilag 2: Anvendt måleudstyr
- Bilag 3: Kurver, produkter
- Bilag 4: Data fra titreringer og katalase bioassay
- Bilag 5: Udkast til Japansk Industri Standard for Tandblegemidler

Forord

Projektet "Udvikling af analysemetode til bestemmelse af peroxider, tilstede eller frigjort i tandplejeprodukter" er udført i perioden 1. december 2006 til 31. december 2007.

Nærværende rapport beskriver resultaterne af projektet.

Formålet med projektet har været at udvikle en ny analysemetode til bestemmelse af peroxid-indholdet i tandblegeprodukter.

Projektet er udført af Danmarks Miljøundersøgelser, Aarhus Universitet, Afdeling for Miljøkemi og Mikrobiologi. Projektansvarlige for Danmarks Miljøundersøgelser har været Svend J. Binnerup og Niels Kroer. I projektgruppen har desuden indgået Suresh C. Rastogi og Margit M. Fernqvist.

Ansvarlig for laboratorieanalyserne har været Margit M. Fernqvist.

Til projektet har været knyttet en følgegruppe bestående af:

- Dorrit Skals, MST (formand)
- Elisabeth Paludan, MST
- Flemming Hovgaard Jørgensen, MST
- Magnus Løfstedt, MST

Sammenfatning og konklusioner

Udvikling af katalase bioassay til peroxid-bestemmelse

I dette projekt er udviklet et katalase bioassay til bestemmelse af peroxid indholdet i tandblegeprodukter. Katalase bioassayet omdanner peroxid til ilt som måles ved hjælp af en elektrode.

Katalase bioassayet er afprøvet på rene peroxider (brintperoxid, ureaperoxid, calciumperoxid, natriumperborat og natriumpercarbonat), der alle indgår som aktive stoffer i tandblegeprodukter, samt på en række forskellige tandblegeprodukter på det danske marked.

Det nyudviklede katalase bioassay er desuden sammenlignet med kemiske analysemetoder, og det vurderes at katalase bioassayet med fordel kan anvendes til analyse af peroxid-indholdet i tandblegeprodukter.

Projektet er udført af Danmarks Miljøundersøgelser, Aarhus Universitet, Afdeling for Miljøkemi og Mikrobiologi.

Behov for forbedret metode til bestemmelse af aktivstoffer i tandblegeprodukter

Det er i dag muligt at købe tandblegningsmidler i detailhandlen, og dette medfører et øget behov for at kunne føre kontrol med denne produkttype. Næsten alle tandblegemidler indeholder peroxid som aktivt stof, enten som frit brintperoxid eller bundet til andre stoffer. I nogle produkter findes flere forskellige peroxid-forbindelser, og dette giver problemer for de traditionelle analysemetoder, der typisk kun kan analysere et stof ad gangen. Ydermere er der ofte problemer med at analysere peroxid bundet til andre stoffer, da mange faktorer kan påvirke frigivelsen af peroxid.

Formålet med dette projekt har været at udvikle og validere en ny analysemetode til bestemmelse af det samlede indhold af peroxider i tandblegemidler – uanset om peroxiden optræder frit, bundet, alene eller sammen med andre peroxid-forbindelser.

Etablering af protokol for bestemmelse af peroxider ved brug af et enzymatisk bioassay

Det udviklede katalase bioassay bygger på enzymatisk omdannelse af brintperoxid til vand og ilt under løbende måling af iltudviklingen i et analysekammer. I vandig opløsning spaltes brintperoxid spontant, men meget langsomt, til ilt og vand. Ved tilstedeværelse af enzymet katalase øges reaktionshastigheden betydeligt.

Der er som led i projektet blevet designet og fremstillet et iltmåle- og regulatorsystem, der overordnet set består af et lukket kammer og en galvanisk iltelektrode, der kontinuert kan måle den frigjorte ilt.

Der er foretaget en metode-udvikling på 6 forskellige rene kemikalier for at fastlægge de optimale betingelser for analysen, og desuden er metodens måleområde og kapacitet undersøgt. På denne baggrund er fastlagt en protokol, der efterfølgende er anvendt til analyse af 7 forskellige tandblegeprodukter.

Hovedkonklusioner

- Det udviklede katalase bioassay kan effektivt og præcist bruges til bestemmelse af det samlede peroxid indhold i tandblegeprodukter.
- Den nedre detektionsgrænse for peroxider målt med katalase bioassayet er 0,0006 % ureaperoxid svarende til 0,0002 % brintperoxid.
- Katalase bioassayet er anvendeligt til måling af brintperoxid, ureaperoxid, calciumperoxid, natriumperborat og natriumpercarbonat.
- Data fra katalase bioassayet er i god overensstemmelse med traditionelle redox-titreringer.
- I modsætning til traditionelle redox-titreringer påvirkes katalase bioassayet ikke af eventuelle reducerende eller oxiderende kemikalier i produkterne.
- Bestemmelse af peroxid i tandblegemidler ved hjælp af katalase bioassayet er nemt og hurtigt at udføre.
- Katalase assayet er robust, simpelt, hurtigt, og har god reproducerbarhed og nøjagtighed (variationskoefficient < 2 %).
- Katalase assayet kan med fordel anvendes på tandblegeprodukter med brintperoxid som aktivstof, hvad enten peroxid findes som frit brintperoxid eller bundet i releasere.
- Produkter med indhold af flere forskellige aktivstoffer kan testes.
- Det udviklede katalase bioassay vil sandsynligvis også kunne benyttes på andre produkt-typer med et indhold af brintperoxid i fri eller bundet form.

Projektresultater – Protokol til bestemmelse af frit og bundet brintperoxid i tandblegemidler

På baggrund af en række test-kørsler med katalase bioassayet er der beskrevet en protokol som gennemgås i det efterfølgende:

Til metoden er der i samarbejde med Loligo-systems (Tjele) konstrueret et tætsluttende målekammer (ca. 100 ml) med påmonteret iltelektrode og injektionskanaler til indføring af prøvemateriale. Kammeret fyldes med tempereret, kvælstof-udgasset fosfatbuffer (pH=7) og lukkes med et akryllåg. Igennem indføringskanalerne tilføres enzymet katalase (5000 units opløst i 40 µl 50 mM phosphat-buffer) og en prøvemængde som maksimalt kan resultere i en iltudvikling svarende til 80 % af bufferens iltmætning. Iltmåling sker kontinuerligt og ved stabilisering af signalet aflæses iltudviklingen som herefter omregnes til peroxid-indhold i prøven. Under de beskrevne betingelser kan

aflæsningen foretages efter 5 min. Assayet køres ved konstant temperatur, i protokollen angivet til 22 °C, og under omrøring i målekammeret.

Summary and conclusions

Tooth whitening products are sold as retail trade in Europe. Therefore there is a demand for tests that enables authorities to control these products for the content of hydrogen peroxide. Almost all products contain either free or bound hydrogen peroxide that is released during the bleaching procedure. Some products contain a mixture of more hydrogen peroxide releasers that complicates the use of traditional chemical analytical methods. The aim of this project was to develop and validate a new analytical approach that enables an easy and precise determination of whitening agents in tooth bleaching products.

Development of a catalase bioassay for hydrogen peroxid measurement

A catalase bioassay was developed that was used to measure the content of peroxide in tooth whitening products. Hydrogen peroxide either present in a free state or bound in different types of releasing compounds was degraded enzymatically to water and oxygen that was measured by an electrode. Catalase (5000 units in 40ul phosphate buffer), the active enzymatic component in the assay, was added to a reaction chamber (100 ml) containing N₂ purged (O₂ depleted) phosphate buffer (pH = 7.0; 22°C). The chamber was closed with a lid on which an oxygen electrode was mounted. After the sample was injected (through small injection ports) the development in oxygen concentration was followed on a computer and when stabilised at a constant level recorded for subsequent calculation of total hydrogen peroxide content in the whitening product being analysed. The amount of hydrogen peroxide must not result in more than 80% of oxygen saturation in the reaction chamber to avoid bias from appearance of gas-bubbles. Comparison of the results from using the catalase bioassay with chemical analytical methods based on e.g. potassium permanganate titration confirmed that the bioassay was a useful alternative for analysing the hydrogen peroxide content in tooth whitening products.

The new catalase bioassay protocol was tested on hydrogen peroxide as well as urea peroxide, calcium peroxide, sodium perborate and sodium percarbonate. These hydrogen peroxide releasing compounds are all used in tooth whitening products including also products available on the Danish market. Furthermore the assay was used to determine the content of hydrogen or urea peroxide in 6 different tooth whitening products. The assay had coefficient of variation less than 2% and thus demonstrated a good reproducibility also compared to the chemical analytical methods traditionally used for determination of hydrogen peroxide in various forms.

1 Indledning

Peroxider i forskellige kemiske bindinger indgår i dag i næsten alle produkter til blegning af tænder, enten alene eller i kombination. Tandblegeprodukterne kan indeholde frit brintperoxid, eller peroxider bundet til andre stoffer ('releasere') som under behandlingen afgives som frit H_2O_2 (1). Ureaperoxid, perborater, og percarbonater er eksempler på sådanne H_2O_2 -releasere som findes i tandblegeprodukter. Peroxiderne findes opløst i forskellige matricer alt efter om tandblegeprodukterne skal påføres som en gel eller pensles henholdsvis sprayes på tandoverfladerne.

I forbindelse med regulering af salg af tandblegemidler i detailhandlen, er der et behov for at etablere analytiske rutiner til kontrol af produkterne for indhold af peroxider. Der findes i dag forskellige kemiske metoder til måling af peroxider. Dette sker ved redox titrering f.eks. med jod eller permanganat salte (2,3). Da alle stoffer, der kan oxideres, vil blive titreret ved redox titrering med jod eller permanganat, kan denne metode kun anvendes til bestemmelse af H_2O_2 i tandblegningsprodukter, hvis der ikke findes andre stoffer i produkterne som kan oxideres. Interferensen fra sådanne stoffer kan muligvis undgås ved måling af fri H_2O_2 ved brug af spektrofotometriske metoder (4). Koncentrationen af frit H_2O_2 kan også måles ved brug af biosensorer. Biosensorer indeholdende det H_2O_2 nedbrydende enzym katalase har været anvendt til bestemmelse af H_2O_2 i desinfektionsmidler (antiseptics) og kosmetiske produkter inklusive tandblegningsmidler (5-7).

Tandblegeprodukter indeholdende H_2O_2 -releasere (f.eks. ureaperoxid) afgiver H_2O_2 langsomt. Derfor kan det totale indhold af bundet H_2O_2 i disse produkter kun bestemmes enten ved teoretisk beregning, måling af H_2O_2 -releaseren direkte, eller ved måling af totalt frigjort H_2O_2 . I denne rapport gives en kort oversigt over de forskellige peroxider som er rapporteret tilstede i tandblegemidler. De testede produkter er alle indkøbt enten i butik eller ved bestilling via internet. Disse indeholdt alle enten frit brintperoxid eller ureaperoxid. De øvrige peroxider, som er blevet omtalt og testet i ren form, indgår i produkter som ordineres af tandlæge. I rapporten beskrives en ny protokol til måling af peroxider i tandblegemidler, hvad enten de er tilsat i form af frit H_2O_2 eller en eller flere releasere eventuelt anvendt i kombination. Protokollen anvender et katalase bioassay som løbende omdanner den frie brintperoxid til ilt og vand, mens iltudviklingen anvendes til beregning af den samlede mængde peroxid i produktet. Protokollen er udviklet som en del af det afrapporterede projekt. Metodens præcision og anvendelighed er sammenlignet med kemiske metoder til bestemmelse af peroxiderne.

2 Analyse af peroxider

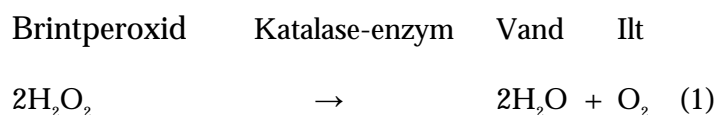
2.1 Kemisk analyse af peroxid i tandblegningsprodukter

Tandblegemidler kan enten indeholde aktivstoffet brintperoxid i fri form eller bundet i en eller flere såkaldte "releasere". Flere tandblegeprodukter indeholder "releasere" ureaperoxid eller calciumperoxid, som indstiller en kemisk ligevægt med frit brintperoxid (det aktive stof). De hidtil anvendte metoder til bestemmelse af brintperoxid er hovedsageligt baseret på kemiske redox-titreringer eller kolorimetrisk metode. I et foreløbigt udkast til etablering af en Japansk Industri Standard for tandblegeprodukter (Bilag 5) indgår f. eks. en kaliumpermanganat titreringsmetode til brintperoxidbestemmelse, mens ureaperoxid bestemmes med natriumthiosulfat-titrering. Nogle produkter indeholder blandinger af forskellige former af peroxider, som potentielt kræver hver sin kemiske analyse.

2.2 Analyse af peroxid ved brug af katalase bioassay

Den nyudviklede metode til bestemmelse af peroxid-indholdet i tandblegeprodukter bygger på enzymatisk omdannelse af brintperoxid (CAS nr. 7722-84-1) til vand og ilt under løbende måling af iltudviklingen. I vandig opløsning spaltes brintperoxid spontant, men kun meget langsomt, til ilt og vand. Ved tilstedeværelse af katalase øges reaktionshastigheden imidlertid betydeligt.

Reaktionen er som følger:

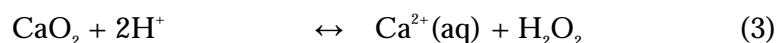


I det tilfælde hvor katalase bioassayet anvendes til at bestemme peroxid-indholdet i produkter, hvor peroxid findes i en bundet form, vil der eksistere en ligevægt imellem den bundne og frie brintperoxid. I det tilfælde hvor f.eks. ureaperoxid (CAS nr. 124-43-6) indgår, ser ligevægten imellem ureaperoxid og frit brintperoxid således ud:

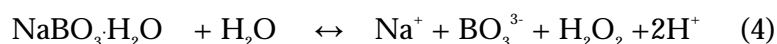


Den frigjorte brintperoxid vil herefter løbende omdannes af katalasen til vand og ilt efter formel (1) ovenfor, der gør at ligevægten forskydes mod højre. For de øvrige releasere, som er testet i denne rapport, findes nedenfor en gennemgang af de kemiske ligevægte som resulterer i en frigivelse af brintperoxid.

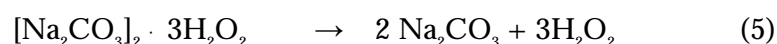
Calciumperoxids (CAS nr. 1305-79-9) opløselighed er stærkt pH-afhængig, ligesom ligevægten der indstilles i henhold til nedenstående reaktion afhænger af pH:



Natriumperborate-monohydrat (CAS nr. 10332-33-9) er en dimer, der er bundet sammen af ægte peroxygen-bindinger. I vandig opløsning ved pH 7, dannes brintperoxid og natriumborat, og der indstilles følgende ligevægt:



Natriumpercarbonat (CAS nr. 15630-89-4) har en stor vandopløselighed og frigiver i vand carbonat og brintperoxid efter følgende reaktion



I produkter indeholdende en til flere "releasere", vil assayet fremme omdannelsen af den bundne fraktion af peroxider til frit brintperoxid. Derved opnås en bestemmelse af den totale mængde brintperoxid i produktet. Katalase (CAS Nr. 9001-05-2) kan købes i oprenset form fra bl.a. Sigma-Aldrich. Enzymet findes naturligt intracellulært i alle aerobt respirerende organismer, hvor dets funktion er at nedbryde reaktive ilt-radikaler, der dannes som et biprodukt i åndingsprocessen.

Indholdet af peroxider i tandblegeprodukter opgives normalt i vægt-procent. Det vil sige, at et tandblegemiddel som f.eks. indeholder ureaperoxid udgør selve brintperoxiden kun ca. 35 % af molekylets vægt. Dermed vil blegeeffekten af et produkt indeholdende f.eks. 18 % ureaperoxid omtrent svare til et produkt indeholdende 6 % brintperoxid. Tilsvarende forskelle i blegeeffekt vil gøre sig gældende også for de øvrige releasere.

3 Udvikling og test af katalase bioassay til bestemmelse af peroxider

Der er som et led i projektet blevet konstrueret et målekammer som har gennemgået en serie tests for tæthed og målestabilitet. Dernæst er der blevet gennemført en metodeindkøring, hvor

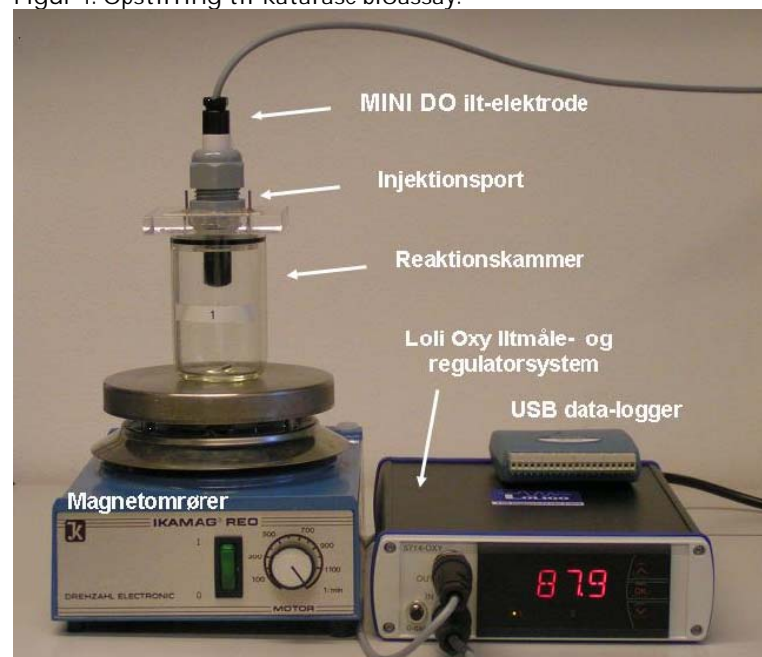
- 1) den optimale mængde aktiv stof (peroxid) er fastlagt
- 2) den optimale mængde enzym er fastlagt
- 3) den hensigtsmæssige reaktionstid er kortlagt
- 4) den optimale pH er identificeret

På baggrund af denne forsøgsserie foreslås en protokol til måling af peroxid i tandblegeprodukter. Protokollen er efterfølgende blevet afprøvet på forskellige tandblegeprodukter indkøbt i detailhandlen.

3.1 Teknisk design af målekammer, elektrode og dataopsamling

Der er benyttet et iltmåle- og regulatorsystem designet og fremstillet i samarbejde med Loligo Systems, Tjele, Danmark. Systemet består af et reaktionskammer af glas med kendt volumen (103-107,5 ml) og akryllåg med port (18 mm diameter) til en iltelektrode samt 2 små porte (0,92 mm diameter) til injektion af prøvemateriale. I målekammeret findes en glascoatet magnet som ved omrøring (1000 rpm) sikrer en ensartet opblanding af alle komponenterne under reaktionen og iltmålingen.

Figur 1: Opstilling til katalase bioassay.



Iltmålingerne foretages med en galvanisk iltelektrode (MINI-DO, Oxyguard, Birkerød) monteret i glaskammerets låg. Elektroden har en maksimal måleusikkerhed i følge specifikationerne på +/- 1 % af den målte værdi. Data opsamles hvert sekund ved hjælp af datalogger (fra Measurement Computing, MA, USA) og overføres til Windows-baseret software (TracerDAQ) til online måling af iltudviklingen.

Elektrodens specifikationer er vedlagt i Bilag 1 og ordre-oversigt fra Loligo Systems findes i Bilag 2.

3.1.1 Forsøgsopstilling

Ved målingens start fyldes glaskammeret med kvælstof gennemboblet autoklaveret fosfatbuffer (pH = 7), hvorefter akryllåget med ilt-elektroden monteres. Fjernelse af ilten i bufferen ved kvælstof-gennembobling sikrer, at iltudviklingen kan følges uden risiko for bobledannelse p.gr.a. overmætning i kammeret. Bufferen steriliseres ved autoklavering ligesom udstyret steriliseres ved afspritning for at forhindre at biologisk iltforbrug under kørslen påvirker måleresultatet. Enzymet katalase (Sigma-Aldrich, katalognummer C100) tilsættes nu i kendt mængde. I alle forsøgene er det tilsat ca. 5000 units katalase til forsøgskammeret (1 unit nedbryder 1 $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ pr. min. ved 25 °C). Umiddelbart inden målingen påbegyndes, tilsættes en kendt mængde peroxid eller tandblegemiddel. Da iltens opløselighed i væske er temperaturafhængig er alle målinger foretaget ved samme temperatur (22 °C) i et airconditioneret rum. Til forsøgene er der anvendt 4 replikate forsøgskamre. Ved de endelige udregninger er der korrigeret for de små variationer i kammervolumen.

3.1.2 Test af elektrodens stabilitet

Forud for et måleforløb foretages der en 2-punkts-kalibrering af elektroden med 0 % iltmætning (opløsning af natriumsulfit) og 100 % luftmætning (buffer gennemboblet med luft) som de to yderpunkter. En sammenligning mellem elektrodens udslag målt i volt (V) ved uafhængige kalibreringer foretaget over 20 dage demonstrerer en stor elektrode-stabilitet, idet afvigelsen er mindre end 1 % af gennemsnitsværdien (Tabel 1).

Tabel 1. Stabilitet af ilt-elektroden testet ved at måle output (Volt) ved 0 og 100 % iltmætning (n = 20).

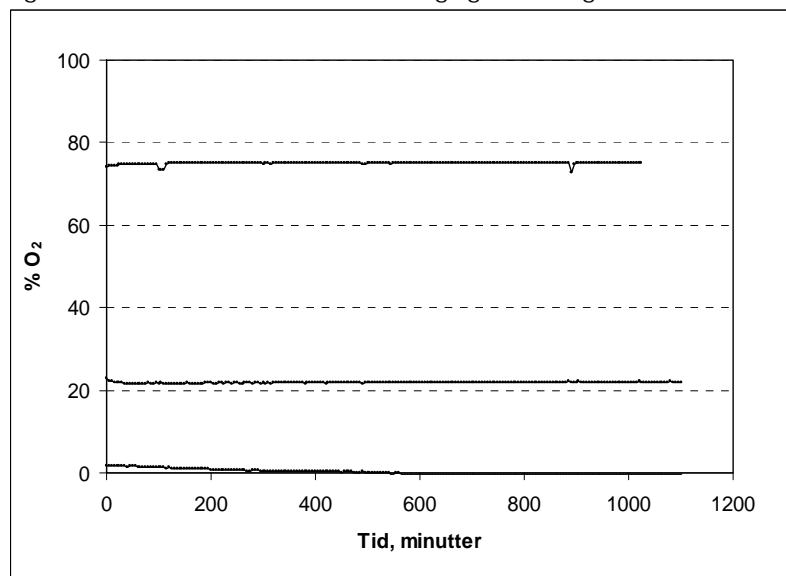
Iltmætning, %	Elektrode output	
	Gennemsnit (V)	Variationskoefficient (%)
0	0,9913	0,3026
100	4,9511	0,4726

3.1.3 Test af reaktionskammerets tæthed

For at forhindre tab af ilt under målingen, og modsvarende forhindre luft i at trænge ind i reaktionskammeret, er det vigtigt at reaktionskammer og elektrode udgør en tætsluttende enhed.

For at demonstrere tætheden af systemet er en række forsøg gennemført, hvor kammeret er samlet med hhv. 75, 22 og 1,5 % luftmættet vand og iltniveauet herefter fulgt i 18-20 timer (Figur 2).

Figur 2: Reaktionskammerets tæthed og egetforbrug af ilt.



I forsøgene med den lave koncentration (1,5 %) begynder iltniveauet efter ca. 2 timers reaktionstid at falde ret hurtigt, og alt ilt er forbrugt i løbet af 10 timer. Dette skyldes sandsynligvis et mikrobielt forbrug af ilt, da målingen i dette tilfælde ikke blev gennemført under sterile forhold. I de efterfølgende måleserier (22 og 75 %) og i alle efterfølgende målinger er væsken forinden steriliseret og kamrene aftørret med sprit for at minimere denne usikkerhedsfaktor. Ved de høje ilt-koncentrationer opretholdes et helt stabilt niveau igennem hele måletiden, hvilket viser, at kamrene er tætte, og at systemet i øvrigt ikke har noget væsentligt egetforbrug af ilt under målingen.

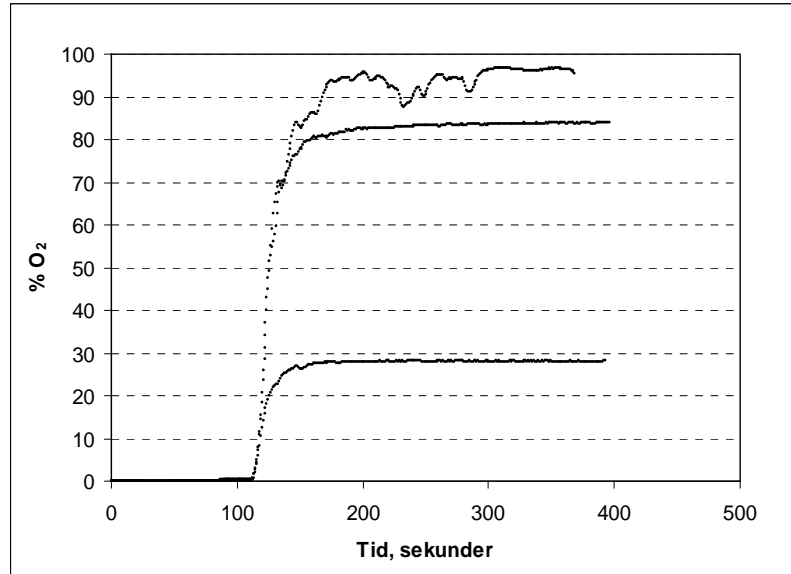
3.2 Fastlæggelse af optimale betingelser for katalase bioassay

Indkøring af metoden er sket ved anvendelse af enten brintperoxid og ureaperoxid i kendte mængder og i ren form. Disse to stoffer er i dag de hyppigst anvendte peroxider i tandblegemidler. Herudover er metoden afprøvet på yderligere 4 rene stoffer, der også anvendes i tandblegemidler. Det drejer sig om natriumperborat-monohydrat, natriumperborat-tetrahydrat og natriumpercarbonat, der i reaktionsmønster minder om brintperoxid og ureaperoxid, samt calciumperoxid der er lidt anderledes, idet dets reaktion med vand er meget pH-afhængig.

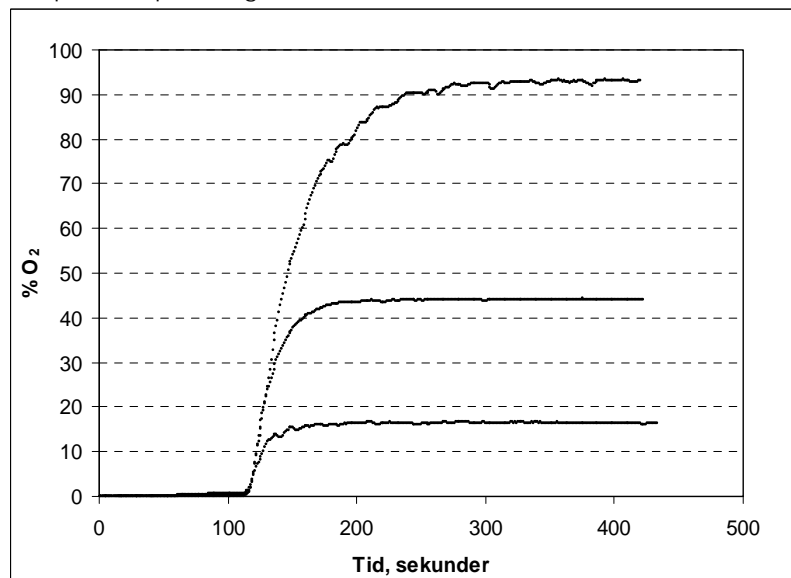
3.2.1 Test af metodens optimale måleområde og nedre detektionsgrænse.

Der er lavet en forsøgsserie med varierende koncentrationer af både brintperoxid (50, 150 og 170 µl af en 1 % opløsning tilsat reaktionskammeret) og ureaperoxid (100, 250 og 500 µl af en 1 % opløsning), for at fastslå metodens optimale måleområde (Figur 3 og 4).

Figur 3: Iltudvikling i reaktionskammeret ved tilsætning af henholdsvis 50, 150 og 170 μl af en 1 % brintperoxidopløsning.



Figur 4: Iltudvikling i reaktionskammeret ved tilsætning af 100, 250 og 500 μl af en 1 % ureaperoxidopløsning.



Ved tilsætning af katalase efter 110 sek. ses en meget hurtig iltudvikling på grund af enzymets spaltning af brintperoxid (Figur 3). Ved den pågældende mængde enzym er den tilstedeværende brintperoxid omdannet til ilt og vand på mindre end 1½ minut, hvilket resulterer i en iltmætning på hhv. 28,1 %, 83,9 % og 96,4 % i glaskammeret. Det bemærkes, at tilsætning af 170 μl brintperoxid resulterer i et ustabil signal, hvilket sandsynligvis skyldes dannelse af bobler omkring elektrodens overflade som forstyrrer målingen. Bobledannelsen skyldes formentlig at ligevægten mellem opløst og frit ilt ikke kan opretholdes under den voldsomme momentane reaktion og iltudvikling. Da målemetoden forudsætter at ilten forbliver opløst i væsken, er det vigtigt at tage højde for dette – for eksempel ved at tilstræbe et forsøgsdesign, hvor den udviklede mængde ilt svarer til mindre end 80 % af iltmætningen. Alternativt kan mindre mængde enzym tilsættes, hvorved reaktionen vil forløbe langsommere.

Tilsætning af ureaperoxid resulterer i en lidt langsommere iltudvikling, formentlig fordi peroxiden her er bundet i et urea-kompleks, hvorfra den løbende frigives under den enzymatiske nedbrydning af den frie peroxid (Figur 4). Det tager således op til 5 minutter at omsætte den tilsatte ureaperoxid, afhængigt af de tilsatte mængder. Det ses også, at problemet med ustabil signal ved høj iltudvikling er mindre, sandsynligvis fordi iltudviklingen foregår over et længere tidsrum. Som det ses af Fig. 4, er der en direkte proportionalitet mellem tilsat mængde ureaperoxid og iltudvikling.

Ved sammenligning af Figur 3 og 4 ses et generelt lavere signal ved analyse af ureaperoxid (Figur 4). Dette skyldes, at brintperoxid kun udgør ca. 35 % af vægten i ureaperoxid-molekylet. Det vil sige, at der fra en ureaperoxid-opløsning kun kan frigives ca. 35 % af den iltmængde, der kan frigives fra en brintperoxid-opløsning af samme koncentration.

3.2.1.1 Vurdering af den nedre detektionsgrænse for katalase bioassayet.

Ifølge lovgivningen på kosmetikområdet (bekendtgørelse 422 af 4. maj 2006, bilag 3) er den højest tilladte koncentration af brintperoxid i mundplejemidler 0,1 % tilstede eller frigjort.

Katalase bioassayet er meget følsomt, og det er muligt at måle præcist indhold af peroxid i en prøve, når iltudviklingen holdes mellem 1 og 80 % af kammerets iltmætning.

På baggrund af de testede tandblegeprodukter (afsnit 4) vides, at der maksimalt vil kunne opløses 10 g produkt i reaktionskammeret (100 ml). Da ureaperoxid indeholder den laveste peroxid-mængde (vægtprocent), benyttes dette stof som baggrund for vurdering af nedre detektionsgrænse.

Som vist på Figur 4 vil tilsætning af 100 µl 1 % ureaperoxid til reaktionskammeret resultere i en iltudvikling svarende til 17,5 % af reaktionskammerets iltmætning. Tilsætning af 100 µl 0,1 % vil derfor resultere i ca. 1,75 % af kammerets iltmætning.

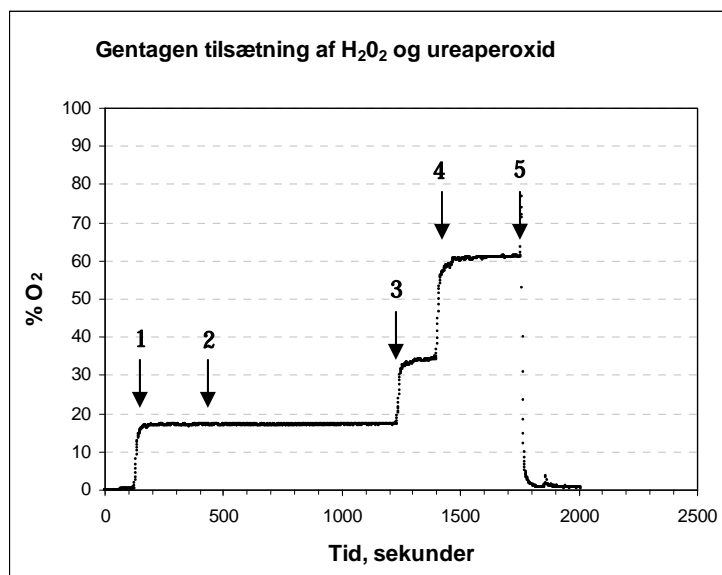
Tilsættes nu i stedet 10 g (~10.000 µl) af et tandblegeprodukt med et indhold på 0,1 % ureaperoxid vil dette resultere i 175 % af kammerets iltmætning. Et nøjagtigt resultat kan imidlertid opnås ned til en iltmætning i reaktionskammeret på 1 %, hvilket vil svare til tilsætning af 10 g af et tandblegeprodukt med et indhold på 0,00057 % ureaperoxid.

For målinger af tandblegeprodukter er den nedre detektionsgrænse for katalase bioassayet således 0,0006 % ureaperoxid svarende til 0,0002 % brintperoxid.

3.2.2 Test af katalasens stabilitet

Enzymets stabilitet, pH-følsomhed og reaktionsevne blev kortlagt gennem en række forsøg. I et første forsøg blev peroxid og katalase gentagne gange tilsat det samme reaktionskammer (Figur 5).

Figur 5: Gentagen tilsætning af H_2O_2 og ureaperoxid til reaktionskammeret. Pil 1+2 angiver tilsætning af 5000 units katalase. Pil 3 angiver tilsætning af 100 μl 1 % ureaperoxid, mens pil 4 angiver tilsætning af 50 μl 1 % brintperoxid. Ved pil 5 afsluttes forsøget og elektroden overføres til en udgasset phosphat-buffer.

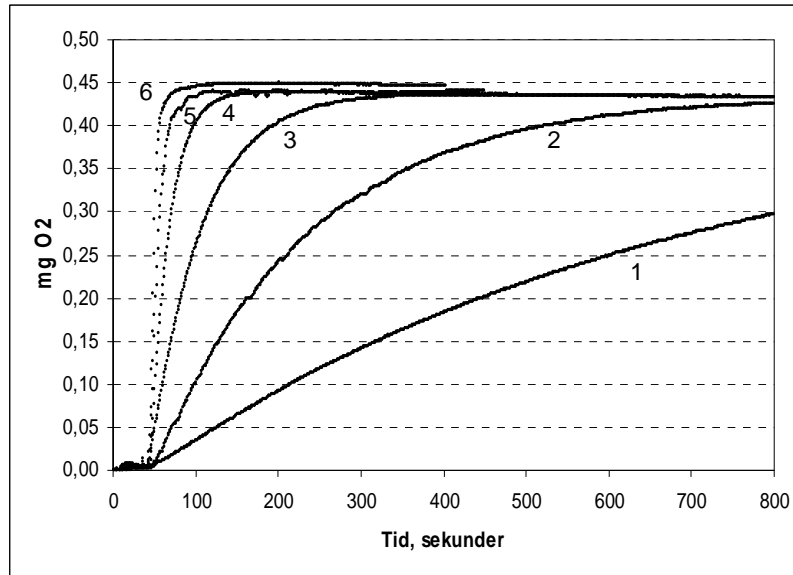


I forsøget er der fra start tilsat 100 μl 1 % ureaperoxid. Ved tilsætning af katalase (pil 1, Figur 5) forløber reaktionen forløber fuldstændig som forventet med stabilisering af signalet indenfor 1 min. Ved yderligere tilsætning af katalase (pil 2) forbliver signalet stabilt. Dette viser, at den første reaktion er forløbet til ende, og at der derfor har været tilstrækkelig mængde aktivt enzym i systemet. Ved tilsætning af 100 μl 1 % ureaperoxid (pil 3 + 4) stiger iltniveauet straks som forventet. Dette demonstrerer, at den tilsatte mængde enzym fortsat er aktivt. Efter 9 min (1750 s) ses et kraftigt udslag i signalet, idet elektroden tages op af testkammeret og overføres til den udgassede buffer-opløsning, hvorefter signalet igen stabiliserer sig på ca. 1,5 % iltmætning.

3.2.2.1 Test af varierende katalase koncentration

Tilsætning af stigende mængder katalase øger hastigheden hvormed peroxiden spaltes til ilt og vand, men har ikke betydning for bestemmelsen af peroxidmængden (Figur 6).

Figur 6: Katalase-koncentrationens betydning for reaktionshastigheden. Der er tilsat henholdsvis 50 (1); 100 (2); 500 (3); 1250 (4); 5000 (5) og 10.000 (6) units katalase.



Forsøgene vist i Figur 6 er udført i triplikat ved pH 7. Der er tilsat samme mængde (250 μ l) 1 % ureaperoxid i alle forsøg. Ved tilsætning af 10.000 katalase-units sker reaktionen omgående og al peroxid spaltes på mindre end $\frac{1}{2}$ minut. Mindskes katalase-tilsætningen falder hastigheden. Ved tilsætning af 1250 katalase-units spaltes al peroxid indenfor $1\frac{1}{2}$ minut. Selv ved meget lave katalase-koncentrationer i kammeret forløber reaktionen dog til ende inden for 60 minutter og den endelige ilt-produktion er som forventet ens i alle forsøg. Tilsvarende forløb er set for brintperoxid (data ikke vist). Ud fra disse data anbefales tilsætning af 5000 units pr. reaktion.

3.2.2.2 Katalasens holdbarhed

Katalase købes i vandig opløsning med en koncentration på omkring 1.379.400 units/ml. Som brugsopløsning anvendes en fortynding på 140.000 units/ml i 50 mM fosfat-buffer. I et forsøg på at undersøge katalasens holdbarhed, blev en brugsopløsningen delt i to, hvoraf den ene halvdel blev opbevaret i køleskab ved 4 °C, mens den anden halvdel blev anbragt ved ca. 20 °C (stuetemperatur). Efter 0, 1, 2, 3, 7, 50 døgn blev opsat standardforsøg ved pH = 7. Til kammeret blev tilsat katalase (5000 units) og 100 μ l brintperoxid (1 %) svarende til en teoretisk iltudvikling på 0,5377 mg.

Tabel 2: Katalasens holdbarhed i opløsning ved 4 °C og 20 °C

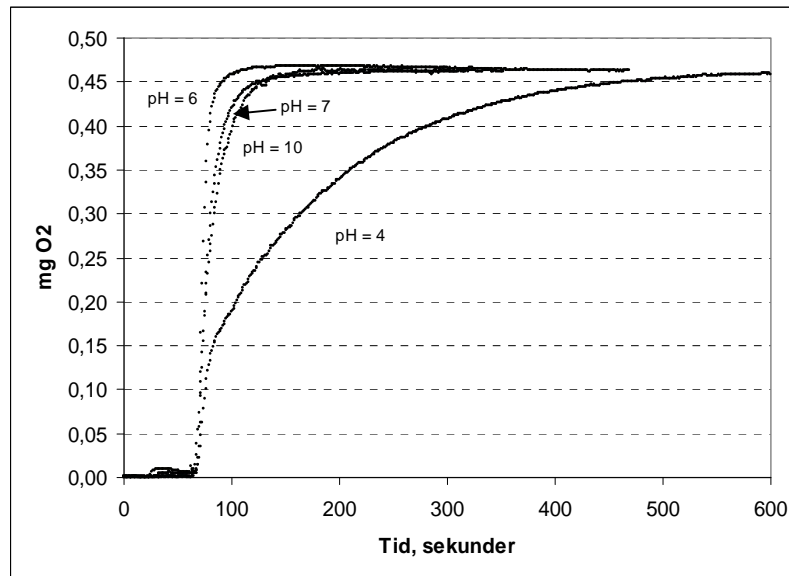
Tid døgn	Opbevaringstemperatur °C	Produceret O ₂ mg
0	20	0,5299
1	4	0,5158
1	20	0,5255
2	4	0,5256
2	20	0,5277
3	4	0,5212
7	4	0,5341
7	20	0,5349
50	20	0,5350

Holdbarheden af brugsopløsningen under opbevaring ved 4 °C og 20 °C er meget lang. Som det fremgår af Tabel 2, var katalase-aktiviteten således efter 50 døgn opbevaring ved 20 °C stadig på samme niveau som umiddelbart efter fremstilling af brugsopløsningen. Selve reaktionshastigheden var heller ikke påvirket af den lange opbevaring (data ikke vist).

3.2.2.3 Katalase-aktivitetens afhængighed af pH i bufferen

Frigivelse af peroxid fra releaseren calciumoxid er pH-afhængig. Det er derfor relevant at teste metodens pH følsomhed. Katalase har et pH optimum på omkring 7, hvilket svarer til fysiologisk pH i de fleste celler. Afvigelser i pH vil medføre ændringer i enzymets konfiguration, hvilket mindsker enzymets aktivitet.

Figur 7: Katalasens effektivitet ved pH 4, 6, 7 og 10.



Katalasens pH afhængighed blev undersøgt i en serie forsøg, hvor pH i bufferen i reaktionskammeret varierede fra 4-10 (Figur 7). Alle forsøgene blev udført i triplikat, og pH i kammeret målt både før og efter reaktionen.

Variation i bufferens pH indenfor intervallet 4-10 påvirker reaktionshastigheden, men ikke det målte iltniveau ved reaktionens afslutning (Figur 7). Reaktionen forløber hurtigst ved pH 6, hvor al peroxid er omdannet til ilt indenfor ½ minut. Ved pH 7 og 10 falder reaktionshastigheden, således at al peroxiden først er omsat efter 1½ min. Sænkes pH til 4 sker der et drastisk fald i enzymaktiviteten, og reaktionen er først løbet til ende efter ca. 10 minutter.

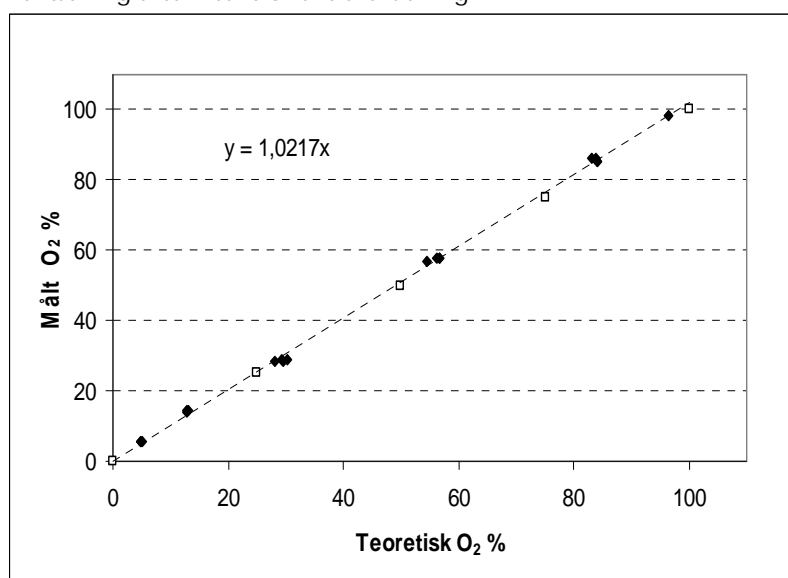
3.3 Afprøvning af katalase bioassayet på peroxider i ren form

Katalase bioassayet blev testet på forskellige peroxider med henblik på at få bekræftet et sammenfald mellem det målte og det forventede peroxidindhold i de anvendte opløsninger. Derudover blev metodens reproducerbarhed testet i en serie uafhængige forsøg som grundlag for en beskrivelse af metodens præcision ved anvendelse på de respektive peroxider.

3.3.1 Brint- og ureaperoxid

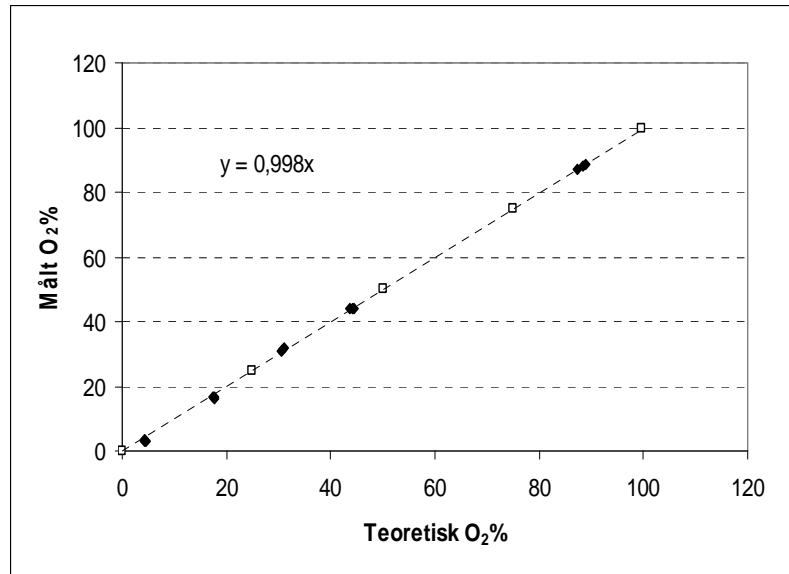
Katalase bioassayet er blevet anvendt på en række forskellige koncentrationer af brint- og ureaperoxid i ren form, hvor resultatet enten er sammenlignet med det forventede i henhold til produktspecifikationen (ureaperoxid) eller med mængden fundet ved KMnO_4 -titrering. Det sidste var nødvendigt med brintperoxid på grund af stoffets ustabilitet ved opbevaring og dermed usikre angivelse af indholdet fra producentens side. Aflæsningerne af elektrodesignalet er ved alle målingerne foretaget efter 300 sekunder (5 minutter) efter tilsætning af katalase.

Figur 8: Sammenhæng mellem den potentielle ilt-frigivelse beregnet på baggrund af en KMnO_4 titrering (åbne symboler) og bestemt ved tilsætning af en varieret mængde H_2O_2 til katalase bioassayet (sorte symboler). På begge akser vises procent af bufferens iltmætning efter reaktionens afslutning.



Der er en fuldstændig lineær sammenhæng mellem den forventede iltudvikling beregnet på baggrund af en redox titrering og iltudviklingen bestemt ved katalase bioassayet for hele måleområdet (Figur 8). Katalase bioassayet er dermed anvendeligt til brintperoxid-bestemmelse inden for hele det måleinterval som afgrænses af bufferens iltmætning. Ifølge produktoplysningerne var koncentrationen af den indkøbte brintperoxid angivet til 30 %. KMnO_4 -titrering bestemte koncentrationen til 34,4 % med en standardafvigelse på 0,2 (n=4) mens katalase bioassayet bestemte koncentrationen til 33,6 med en standardafvigelse på 0,7 (n=14).

Figur 9: Sammenhæng mellem den teoretisk mulige ilt-frigivelse beregnet ud fra producentens oplysninger om stoffets renhed (åbne symboler) og bestemt ved til sætning af en varieret mængde ureaperoxid til katalase bioassayet (sorte symboler). På begge akser vises procent af bufferens iltmætning efter endt reaktion.



For ureaperoxid ses ligeledes en fuldstændig overensstemmelse mellem den målte og den teoretisk mulige iltudvikling beregnet ud fra tilsat mængde stof (Figur 9). På den baggrund konkluderes, at al den bundne peroxid frigives fra den tilsatte ureaperoxid og spaltes af katalase-enzymet indenfor den pågældende måleperiode. Producenten opgiver koncentrationen af ureaperoxid til 97 % mens katalase bioassayet bestemte koncentrationen til 97,4 % med en standardafvigelse på 0,9 (n=12). På baggrund af KMnO₄ og S₂O₃-titrering blev ureaperoxid indholdet bestemt til henholdsvis 95,83 % med en standardafvigelse på 0,4 (n=3) og 99,17 % med en standardafvigelse på 0,3 (n=3), hvilket afviger noget fra producentens angivelser og bestemmelsen ved hjælp af katalase bioassayet.

3.3.2 Calciumperoxid

Calciumperoxid har ved fysiologisk pH (pH=7) en meget lav opløselighed i vand (<0,01 % v. 20 °C), og calciumperoxid indgår i forskellige reaktioner med vand afhængigt af pH. Opløseligheden af calciumperoxid stiger med faldende pH og under dannelse af frit brintperoxid. Mængden af dannet brintperoxid afhænger helt af pH.

Ved at benytte katalase bioassayet til løbende spaltning af den dannede brintperoxid, sikres en maksimal frigivelse af ilt fra calciumperoxiden, forudsat at assayet udføres inden for det pH-spektrum hvor calciumperoxid afgiver brintperoxid. Selve katalase bioassayet blev tidligere demonstreret i stand til at nedbryde brintperoxid inden for et pH-interval mellem 4-10 (Figur 7).

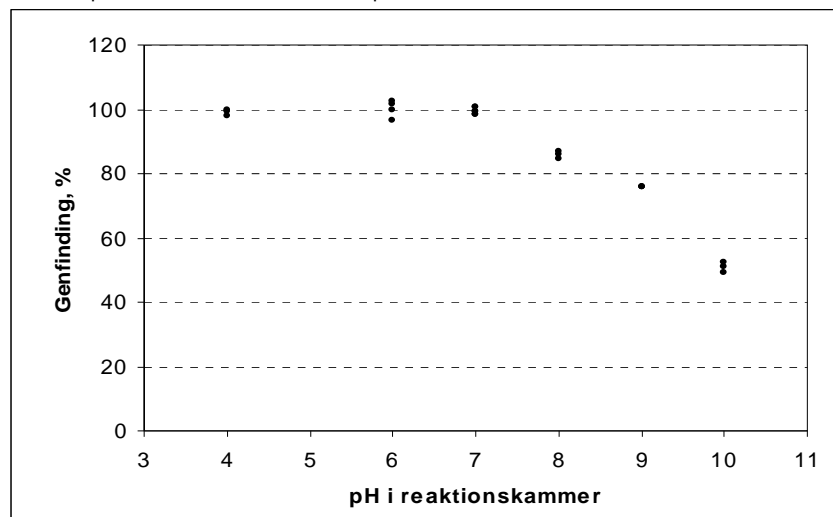
Med henblik på at fastlægge den optimale pH for analyse af produkter indeholdende calciumperoxid, blev der udført en serie forsøg hvor pH i blev varieret fra 4-10. Til hvert forsøg blev tilsat 1 mg calciumperoxid opslemmet i vand. Calciumperoxid har ifølge producenten (Sigma, MA USA) en renhed

på 75 %. Dermed vil 1 mg calciumperoxid maksimalt kunne frigøre 0,16647 mg O_2 . Genfindingsprocenten er herefter beregnet ud fra formlen:

$$(\text{mg } O_2 \text{ produceret} / 0,16647 \text{ mg}) \times 100 = \text{genfinding (\%)}$$

Iltudviklingen er fundet ved aflæsning af den producerede mængde ilt efter 10 minutter, da signalet endnu ikke var stabiliseret efter 5 minutter. Alle forsøg er udført i 3-6 gentagelser og pH i reaktionskammeret er målt både før og efter forsøget.

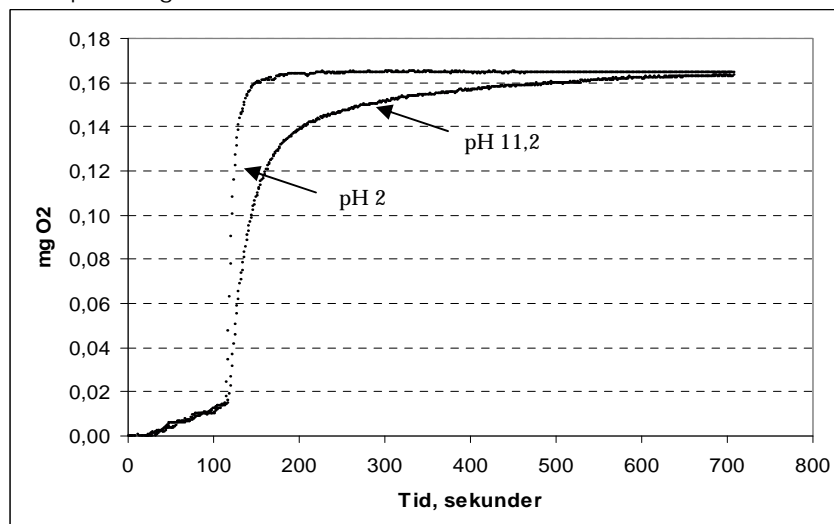
Figur 10: Sammenhæng mellem iltproduktionen (procent af maximalt mulige) fra calciumperoxid som funktion af pH.



Ved høj pH er iltudviklingen fra calciumperoxid lavere end ved de optimale pH-værdier omkring 6-7 (Figur 10).

Calciumperoxid kræver lav pH (surt miljø) for at kunne bringes på en opløst form. For at undersøge om pH i den calciumperoxid-opløsning der tilsættes reaktionskammeret har betydning for analysens resultat, blev der tilsat 1 mg calciumperoxid opslemmet i vand (pH = 11,2) henholdsvis i en H_2SO_4 -opløsning med en pH værdi på 2,0. pH i selve målekammeret blev fastholdt på 7,0 ved hjælp af fosfat-bufferen.

Figur 11: Sammenhæng mellem reaktionshastighed og pH i calciumperoxid stamopløsningen.



Det ses af Figur 11, at reaktionshastigheden er størst når calciumperoxid tilsættes efter at være opløst i en H_2SO_4 -opløsning ved pH 2. Her sker iltudviklingen momentant ved tilsætning af katalase, og reaktionen forløber helt til ende indenfor 1 minut. Injiceres i stedet en opslemning af calciumperoxid i vand med pH 11,2, foregår reaktionen noget langsommere, men ender på fuldstændig samme niveau efter 10 minutter. Denne forskel skyldes dels, at calciumperoxid ved den lave pH allerede har frigivet den samlede brintperoxid-pulje, og dels at tilsætningen af calciumperoxid i uopløst form sænker hastigheden for frigivelsen af brintperoxid til væskefasen.

3.3.3 Natriumperborater og natriumpercarbonat

Traditionelt har natriumperborate-monohydrat, $NaBO_3 \cdot H_2O$ (CAS nr. 10332-33-9) og natriumperborate-tetrahydrat, $NaBO_3 \cdot 4H_2O$ (CAS nr. 10486-00-7) været brugt som blegemidler i vaskemidler. Indenfor de seneste år, er natriumperborat også taget i brug i tandblegemidler. Modsat produkterne indeholdende brintperoxid og ureaperoxid findes natriumperborater herhjemme kun i produkter der benyttes af tandlæger. Brintperoxid releaseren natriumpercarbonat findes endnu ikke i tandblegeprodukter som anvendes i Danmark (1, 8).

Peroxid-dannelsen og iltudviklingen fra de to natriumperborater og natriumpercarbonat blev testet. De to perborater adskiller sig ved at have en forskellig mængde krystalvand bundet. Natriumperborat-monohydrat kan teoretisk frigive brintperoxid svarende til 34 % af molekylvægten, mens natriumperborat-tetrahydrat afgiver brintperoxid svarende til 22 % af molekylvægten. Natriumpercarbonat kan potentielt frigive en brintperoxid andel svarende til 28 % af stoffets molekylvægt. Disse andele indgår i beregningen af genfindingsprocenten efter ilt-dannelsen i katalase bioassayet.

Der blev for alle tre stoffer lavet en forsøgsserie med fire gentagelser. pH var justeret til 7, og der blev injiceret 100 – 250 μ l af en 1 % opløsning af de tre stoffer. Signalet var i alle tilfælde stabiliseret inden for ca. 2 minutter, resultaterne blev aflæst efter 5 minutter og iltmængden anvendt til beregning af genfindingsprocenterne (se Tabel 3).

Tabel 3: Genfinding – natriumperborater og natriumpercarbonat.

Kemikalie	Teoretisk O ₂ , mg	Målt O ₂ , mg	Genfinding, %	Gennemsnit	Standard-afvigelse	n
Natriumperborat-monohydrat	0,400	0,408	102,00	102,56	0,8260	4
	0,400	0,414	103,50			
	0,400	0,407	101,75			
	0,400	0,412	103,00			
Natriumperborat-tetrahydrat	0,259	0,270	104,17	104,07	1,4564	4
	0,259	0,275	106,10			
	0,259	0,267	103,01			
	0,259	0,267	103,01			
Natriumpercarbonat	0,143	0,143	100,00	100,03	0,9207	4
	0,359	0,361	100,70			
	0,359	0,361	100,70			
	0,359	0,354	98,74			

Som det fremgår af tabellen er der for natriumperborat-monohydrat og natriumperborat-tetrahydrat god overensstemmelse mellem det fundne og det

teoretiske peroxid-indhold. Genfindingsprocenterne afviger i alle tilfælde mindre end 1,5 %.

3.3.4 Oversigt over genfindingsprocenter samt præcision på de forskellige peroxider målt i katalase bioassayet

Den udviklede metode er blevet valideret på en række forskellige peroxider i ren form (Tabel 4):

Tabel 4: Genfindingsprocenter for rene peroxid-forbindelser.

Aktiv stof	Mængde tilsat mg	Genfinding (%)	Standard-afvigelse (%)	n
Brintperoxid ^{a)}	0,25-1,0	100,18	1,5908	14
Ureaperoxid	0,25-2,5	100,48	0,8915	12
Calciumperoxid, pH 7	1,0	98,79	1,8686	8
Natriumperborat, 1 H ₂ O	2,5	102,56	0,8260	4
Natriumperborat, 4 H ₂ O	2,5	104,07	1,4564	4
Natriumpercarbonat	1-2,5	100,03	0,9207	4

a): Genfinding af brintperoxid er beregnet med udgangspunkt i koncentrationen i stamopløsningen fundet ved KMnO₄-titrering.

Valideringen viste, at der for alle de testede stoffer var en meget fin overensstemmelse mellem den teoretiske og den målte iltudvikling. Genfindingsprocenterne afviger i alle tilfælde mindre end 1,9 %, hvilket dermed beskriver metodens usikkerhedsmargin under de valgte analysebetingelser.

4 Afprøvning på produkter

På baggrund af metodeudviklingen og afprøvning på en række af de rene stoffer som anvendes i tandblegemidler, er en protokol til analyse af peroxid-indholdet i tandblegemidler opstillet:

Med udgangspunkt i, at der anvendes et lukket analysekammer på ca. 100 ml i henhold til beskrivelse i afsnit 3.1, opstilles hermed følgende standardbetingelser:

- 1) Analysen udføres ved 22 °C.
- 2) Mængden af aktiv stof (peroxid) i prøven begrænses, så den maximale iltudvikling svarer til 80 % af bufferens iltmætning. Dette svarer (ved et kammer-volumen på 100 ml og 22 °C) til en maximal iltudvikling på 0,88 mg O₂.
- 3) Der anvendes 5000 units katalase pr. reaktion for at sikre en tilpas reaktionshastighed.
- 4) Resultater aflæses efter 5 minutter (forudsat at signalet er stabilt).
- 5) pH i reaktionskammeret justeres med en 50 mM fosfat-buffer til 7,0.

Ved anvendelse af ovenstående protokol blev en række forskellige tandblegnings-produkter, som alle findes i handlen i Danmark, undersøgt.

Produkterne som indgår i valideringen repræsenterer:

- 1) Forskellige koncentrationer af peroxid
- 2) Forskellige indhold af aktivstoffer
- 3) Forskellige formuleringer af produktet

I proceduren for måling på aktivstoffer i tandblegemidler indgår to typer af kontroller:

- 1) En parallel bestemmelse på rent stof i kendt mængde
- 2) En tilsætning ("spike") af rent stof i kendt mængde – tilsat reaktionskammeret efter at reaktionen med tandblegemidlet er afsluttet

I alt er 7 produkter blevet analyseret i mindst 14 gentagelser:

Tabel 5: Oversigt over de testede produkter (Anonymiserede).

Produkt	Produkt type	Indhold af aktivstof
A	Blege-gel	10 % ureaperoxid
B	Blege-gel	22 % ureaperoxid
C	Blege-gel	16 % ureaperoxid
D	Blege-gel	?? % ureaperoxid
E	Blege-gel	?? % brintperoxid
F	Væske	?? % brintperoxid
G	Blege-gel	6 % brintperoxid

Yderligere oplysninger om produkterne, såsom forhandler, varenummer, batchnummer mv. kendes af Miljøstyrelsen.

Parallelt med katalase-metoden, er alle produkter tillige analyseret på traditionel vis ved hjælp af redox-titreringer. Alle produkter og de to rene stoffer, brintperoxid og ureaperoxid, er titreret med kaliumpermanganat, mens produkterne indeholdende ureaperoxid desuden er titreret med natriumthiosulfat.

Resultaterne fra både titreringer og test af katalase-assayet ses i Tabel 6, sammen med producentens angivelse af indholdsstoffer. For tre af produkterne har det ikke været muligt at få oplyst mængden af aktivstof.

Tabel 6: Oversigt over peroxid indhold i 7 tandblegningsprodukter samt brintperoxid og ureaperoxid fundet ved hhv. to titreringsmetoder og katalase bioassayet.

Produkt			Koncentration (%) af aktivstof fundet ved		
Navn	Aktivstof	Koncentration (%) angivet af producent	KMnO ₄ -titrering	S ₂ O ₃ -titrering	Katalase bioassay
A	Urea-peroxid	10	10,49	12,89	9,67
B	Urea-peroxid	22	20,29	21,00	20,68
C	Urea-peroxid	16	15,45	14,66	15,36
D	Urea-peroxid	?	11,65	22,80	10,41
E Første analyse	Brint-peroxid	?	0	-	0
E Anden analyse	Brint-peroxid	?	2,84	-	2,96
F Første analyse	Brint-peroxid	?	0	-	0,037
F Anden analyse	Brint-peroxid	?	1,90	-	2,04
G	Brint-peroxid	6	5,40	-	4,875
Brintperoxid Rent stof	Brint-peroxid	ca. 30	34,39	-	33,579
Ureaperoxid Rent stof	Urea-peroxid	ca. 97	95,83	99,173	97,47

I Bilag 4 findes ovenstående tabel med angivelse af standardafvigelser.

Generelt ses en fin overensstemmelse mellem koncentrationer fundet ved titrering og ved katalase assayet. Særlig lille er afvigelserne mellem tallene fra KMnO₄-titreringer og katalase assayet.

Produktet "E" og "F" er analyseret 2 gange – da der i den først indkøbte pakning ikke kunne detekteres brintperoxid i gelen i "E", hverken ved titrering eller ved katalase bioassayet, mens der i "F" blev fundet en forsvindende lille mængde peroxid ved katalase bioassayet og intet ved titrering.

For at afgøre, om det var en fejl ved assayet eller produktet blev endnu et sæt købt og analyseret. Denne gang blev der fundet peroxid i både "E" og "F" ved begge analysemetoder.

Bestemmelse af peroxid koncentrationen i de testede tandblegemidler er ved hjælp af katalase bioassayet foretaget på flere forskellige prøvekonzentrationer og i mindst 14 gentagelser per produkt. Tilsvarende er assayet afprøvet på de rene stoffer brintperoxid og ureaperoxid i en række forskellige koncentration.

Variationskoefficienten på målinger af produkter med katalase bioassayet er 0,9 – 3 %. Tilsvarende er variationen på målinger af de rene aktivstoffer 0,9 – 1,9 %. Redoxtitreringerne er foretaget i tre gentagelser på både produkter og rene stoffer. For kaliumpermanganat titreringerne af tandblegeprodukterne er variationskoefficienten 0,4-2,4 %. For de rene stoffer er variationen på målingerne 0,4 – 1 %. For natriumthiosulfat titreringerne ses en meget stor variation for produkterne: 9,4 – 23,8 %. Dog er variationen på natriumthiosulfat titrering af ureaperoxid i ren form kun 0,33 %.

I forhold til de testede produkter er variationen (præcisionen) på katalase bioassayet således sammenligneligt med variationen på den kemiske analyse baseret på en kaliumpermanganat titrering, hvorimod den fremstår mere præcis end natriumthiosulfat titreringerne.

I forhold til producenternes angivelse af peroxid-indhold i produkterne afviger koncentrationsbestemmelserne foretaget med katalase bioassayet med 3,3 – 5,9 %. Koncentrationer fundet ved kaliumpermanganat-titrering afviger 3,4 – 7,7 % og natriumthiosulfat-titrering 4,6 – 28,9 % fra producentens oplysninger. Igen er variationen på resultater fra katalase-assayet altså helt sammenligneligt med resultater fra kaliumpermanganat-titrering, og begge dele er meget bedre end natriumthiosulfat-titreringer.

Kurveforløb for kontroller i form af ”spiking” med rent stof i kendt mængde er vist for alle produkter i Bilag 3a-i. Her bekræftes, at der i de testede tandblegeprodukter ikke findes stoffer der hæmmer katalase-aktiviteten. Det udviklede katalase bioassay er altså fuldt ud brugbart til analyse af de pågældende produkter.

5 Resultatvurdering og konklusion

En ny metode og protokol til analyse af peroxid-indhold i tandblegeprodukter er udviklet. Metoden bygger på måling af iltudvikling efter enzymatisk omdannelse af peroxid til ilt og vand. Sammenlignet med traditionelle analysemetoder baseret på titreringer med permanganat og thiosulfat er det nyudviklede katalase bioassay nemt at udføre, og alle peroxidforbindelser – uanset om de er bundet til forskellige 'releasere' – kan måles på en gang. De fundne peroxid-indhold i tandblegeprodukterne svarer godt overens med produkt-oplysningerne.

Resultaterne af metodeudviklingen og analysen af de undersøgte produkter kan kortfattet opsummeres således:

- Bestemmelse af peroxid indhold i tandblegeprodukter ved hjælp af katalase bioassayet er nemt og hurtigt at udføre
- Assayet er robust, simpelt, hurtigt, har høj følsomhed og god reproducerbarhed (variationskoefficient < 3 %)
- Assayet er i stand til med stor nøjagtighed at bestemme peroxid-indholdet i produkter med meget lav koncentration af aktiv stof. Den nedre detektionsgrænse er 0,0002 % brintperoxid i produktet
- Til forskel fra traditionelle redox-titreringer påvirkes assayet ikke af eventuelle reducerende eller oxiderende kemikalier i produkterne
- Assayet kan med fordel anvendes på tandblegeprodukter med brintperoxid som aktivstof - hvad enten peroxiden findes som frit brintperoxid eller bundet i releasere
- Assayet vil kunne anvendes på produkter med indhold af flere forskellige aktivstoffer. F.eks. findes produkter med både ureaperoxid og calciumperoxid (1)
- Assayet vil med stor sandsynlighed kunne benyttes på andre produkttyper med indhold af brintperoxid, for eksempel kosmetikprodukter hvor tilstedeværelse af fedtstoffer besværliggør redox-titreringer
- For 4 af de testede produkter svarede koncentrationerne fundet ved katalase bioassay og kaliumpermanganat titrering fint overens med produktoplysningerne
- For 3 af de testede produkter var koncentrationen af aktivstoffer ikke oplyst
- To af de testede produkter ("E" og "F" der indkøbes som et samlet kit) viste ved gentagne analyser af samme batch ingen – eller meget lille – indhold af peroxid ved analyse med både titrering og katalase bioassay. Ved indkøb af nyt batch blev fundet peroxid ved begge analysemetoder.

6 Referencer

1. Binnerup, SJ og Rastogi, SC (2006) Tandblegningsmidler, Rapport til Miljøstyrelsen Kemikalier.
2. Directive 82/434/EEC. Determination og hydrogen peroxide in hair care products. Second Commision Directive 82/434/EEC of 14. May 1982.
3. Bottari E and Libert A, in: Università degli Studi di Roma (Eds.). *Analisi Chimica Quantitativa*, Ferr V Printing – Lithographic Shop, Roma, pp. 267-271 280-281.
4. Tang B, Zhang Li and Xu K (2005). FIA – near – infrared spectrofluorometric determination of trace determination of hydrogen peroxide using triachlorobocyanine (Cy.7.CI) and horseradish peroxidase (HRP). *Talanta* 68: 876-882.
5. Campanella L, Roversi R, Sammartino MP and Tomassetti M (1998) Hydrogen peroxide determination in pharmaceutical formulations and cosmetics using a new catalase biosensor. *J Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 18: 105-116.
6. Campanella L, Favero G, Giancola D and Tomassetti M (2003) Determination of hydrogen peroxide in disinfectant solutions using a biosensor with two antagonist enzymes. *J Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 32: 737-751.
7. Faguri RLRP, Lupetti KO and Fatibello O (2005) Flexible potentiometric minisensor based on manganese dioxide-composite for the determination of hydrogen peroxide in bleach and pharmaceutical products. *Anal Lett* 38: 1857-1867.
8. SCCP. Appendix to opinion on hydrogen peroxide, in its free form or when released, in oral hygiene products. European Commission. SCCP/xxxx/07. (unpublished)

Tekniske specifikationer for ilt- elektroden.

MINI DISSOLVED OXYGEN PROBE (MINI-DO)

Specifications

Dimensions	dia 15mm, length 90mm
Measuring principle	galvanic cell, self temperature compensating
Type	% saturation
Output	c. 25 mV at 100% O ₂ saturation, output impedance is c. 2 kOhm
Wiring	White wire is zero (0 or GND,) brown wire is positive
Flow requirements	typically 1 cm/sec, depending on oxygen saturation and temp
Cable	3 m, other lengths available on request
Measuring range	0-200%
Accuracy	typically better than $\pm 1\%$ of measured value, depending on calibration
Repeatability	typically better than $\pm 0.5\%$ of measured value
Response time	T ₉₀ (90% of end value) is <20 sec

Anvendt måleudstyr



DMU
Afd. for Miljøkemi og Mikrobiologi
Att. Margit Fernqvist
Frederiksborgvej 399
4000 Roskilde

Ordre nr.:	2006257
Ordre dato:	17. jan 2007
Faktura nr.:	2007248
Faktura dato:	1. februar 2007
Rekv. nr.:	24113
Ref. person:	Margit Fernqvist
Side:	1/1

Følgeseddel

Code	Qty.	Description
5714-OXY	1	LoliOxy iltmåle- og regulatorsystem, inkl. - Iltmåleinstrument m. display, relæer og analogt output - Luftsten, 1 stk - PU slange til N ₂ /O ₂ /luft, 5m - Magnetventil (230V/50Hz), 1 stk - MINI-DO galvanisk iltsonde med tilbehørskit, 1 stk - Datakabel, 1 stk - Brugervejledning, 1 stk
RESP-SPC	4	Special-lavet glaskammer samt akryllåg med port til iltsonde samt fittings til prøvesampling/-injektion. (Øi45mm x D60mm, volumen ca. 100 ml)
PMD-1208	1	USB datalogger (12-bit) inkl. windows software
MAG-300A	15	Glas-coated magnetomrører
FRAGT	1	Fragt

Afprøvning af katalase bioassay på tandblegeprodukter.

Herunder vises kurveforløb for kontrol af 7 tandblegeprodukter analyseret med det udviklede katalase bioassay. Alle produkter er analyseret som beskrevet i protokollen, og efter endt reaktion er der tilsat en kendt mængde ureaperoxid. Kontrollerne bekræfter, at der i de testede tandblegeprodukter ikke findes stoffer der hæmmer katalase-aktiviteten.

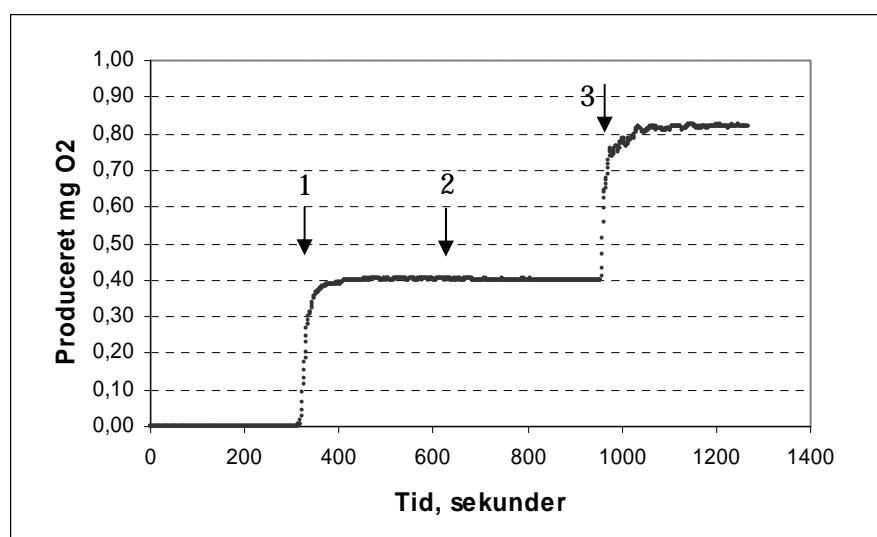
Alle forløb har samme opbygning:

Pil 1 angiver tilsætning af tandblegeproduktet og katalase

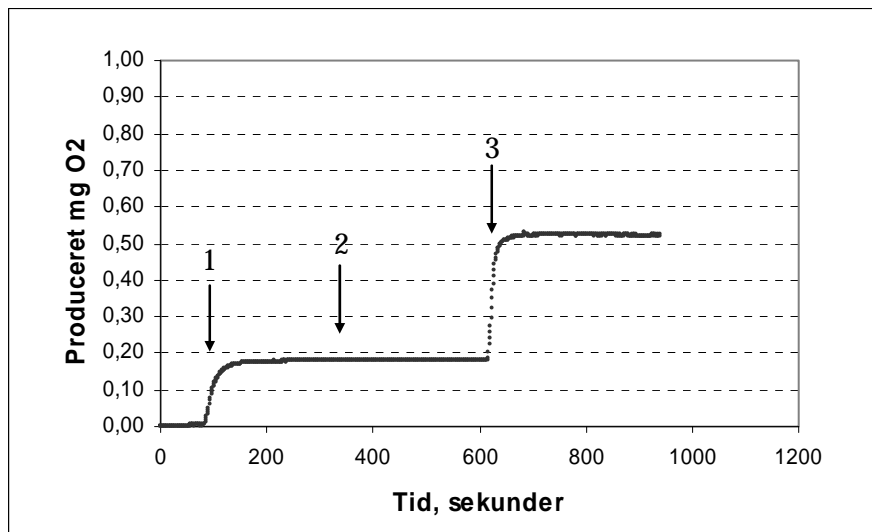
Pil 2 angiver tilsætning af yderligere katalase

Pil 3 angiver tilsætning af kendt koncentration ureaperoxid opløsning.

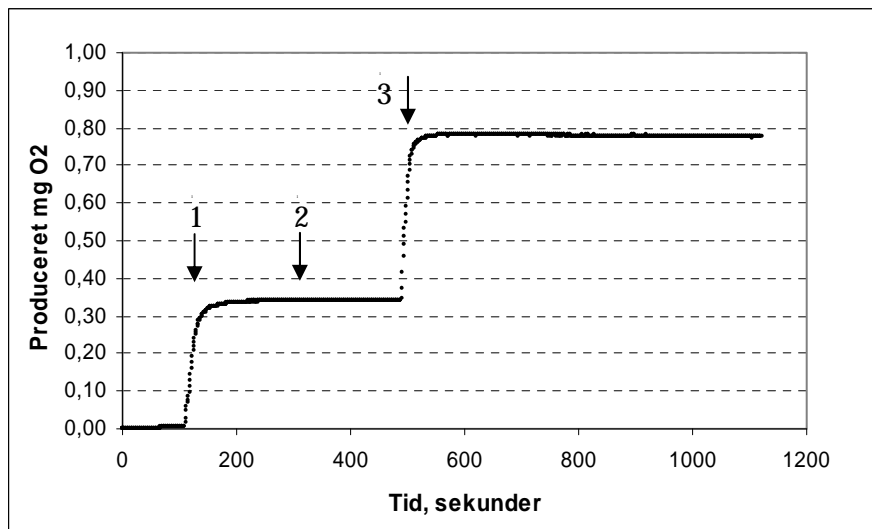
3a: Produkt "A"



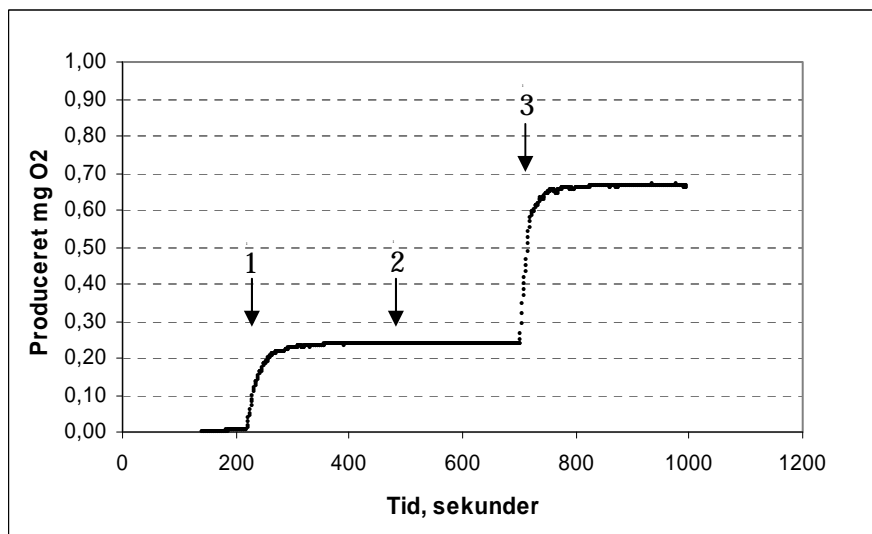
3b: Produkt "B"



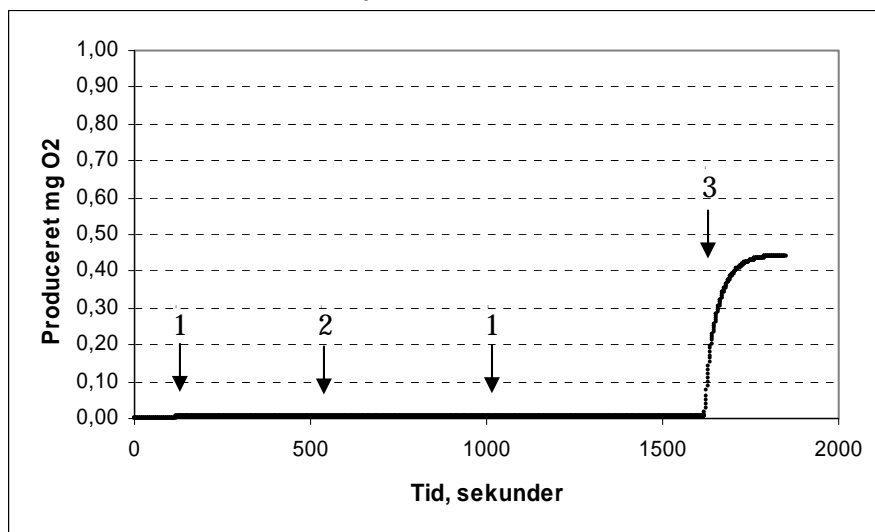
3c: Produkt "C"



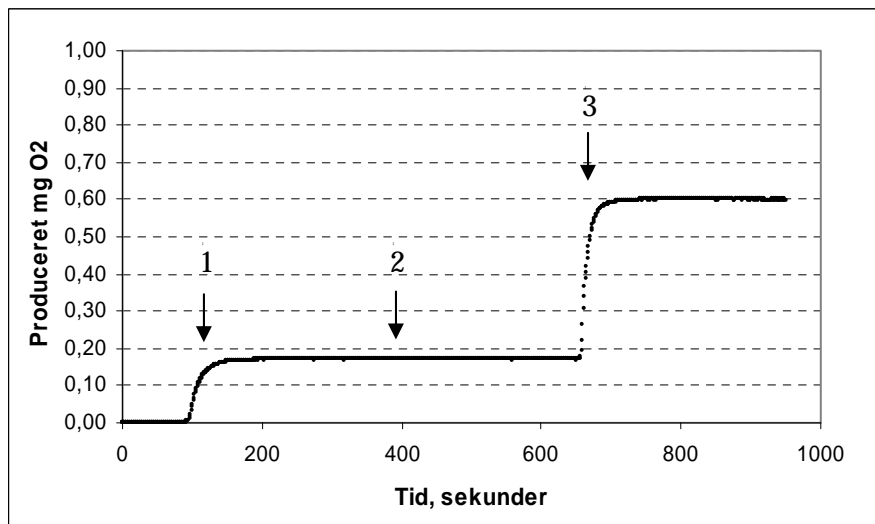
3d: Produkt "D"



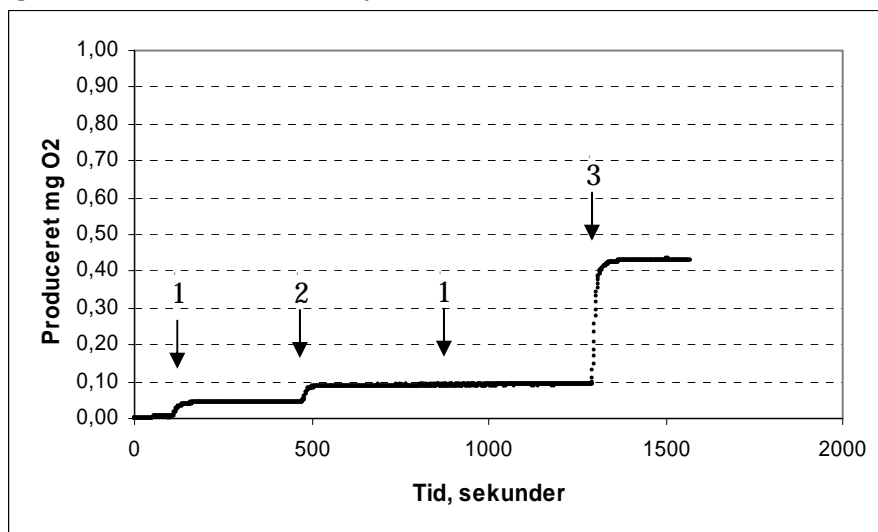
3e: Produkt "E" – første analyse (lot nr. 30187)



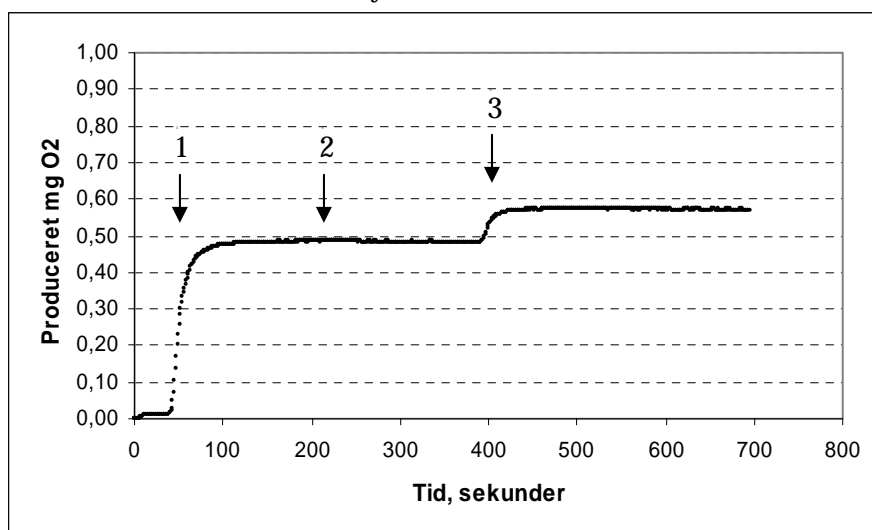
3f: Produkt "E" – anden analyse (lot nr. 0704002)



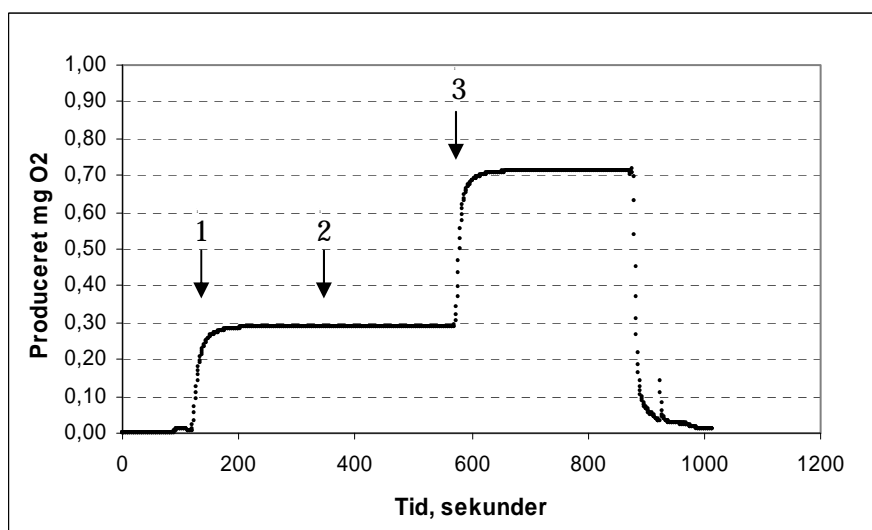
3g: Produkt "F" – første analyse (lot nr. 30187)



3h: Produkt "F" – anden analyse (lot nr. 0704002)



3i: Produkt "G"



Data fra titreringer og katalase bioassay

Produkt	Aktivstof	Angivet	Titrering	Standard-	Titrering	Standard-	Katalase-assay	Standard-	n
		indhold af aktivstof %							
A	UP	10	10,49	0,260	12,884	2,028	9,665	0,146	27
B	UP	22	20,29	0,098	20,998	1,9934	20,682	0,561	21
C	UP	16	15,45	0,096	14,657	2,157	15,362	0,485	19
D	UP	ej oplyst	11,65	0,099	22,804	5,419	10,405	0,157	17
F – første analyse	BP	ej oplyst	nd				0,037	0,001	14
F – anden analyse	BP	ej oplyst	1,90	0,003			2,041	0,019	3
E – første analyse	BP	ej oplyst	nd				-		
E – anden analyse	BP	ej oplyst	2,84	0,071			2,957	0,064	15
G	BP	6	5,40	0,054			4,875	0,127	17
Ureaperoxid, rent	UP	ca. 97	95,83	0,396	99,173	0,3238	97,470	0,895	12
Brintperoxid, rent	BP	ca. 30	34,39	0,211			33,579	0,657	14

Udkast til Japansk Industri Standard for tandblegemidler

Japanese Industrial Standard (draft)

JIS T XXXX: 200X

Dentistry – Whitening materials for teeth

1) Scope

This standard specifies tooth bleaching materials and medical-agent-containing tooth surface cleaning auxiliary materials principally consist of hydrogen peroxide or urea peroxide, (hereinafter referred to as whitening materials).

2. Normative references

The following standards contain provisions that, through reference in this text, constitute provisions of this standard. The latest edition of the referenced standards (including any amendments) is applied.

JIS R 6253 Waterproof abrasive papers

JIS T 0993-1 Biological evaluation of medical devices – Part 1: Evaluation and testing

JIS T 6001 Preclinical evaluation of biocompatibility of medical devices used in dentistry – Test methods for dental materials

JIS Z 2244 Vickers hardness test – Test method

JIS Z 8802 Methods for determination of pH of aqueous solutions

3. Classification

3.1 Application

Whitening materials shall be classified as follows by their application:

- a) Type 1: used by a patient under the supervision of a dental practitioner
- b) Type 2: used by a dental practitioner

3.2 Chemical composition

Whitening materials shall be classified as follows according to their concentration of peroxides prepared for use:

The concentration of hydrogen peroxide is equal to that of urea peroxide multiplied by 0.36.

- a) Class 1: whitening materials containing hydrogen peroxide of not more than 4.0 %(w/w), or that of urea peroxide of not more than 11.1 %(w/w).
- b) Class 2: whitening materials containing hydrogen peroxide of more than 4.0 %(w/w) and not more than 6.0 %(w/w), or that of urea peroxide of more than 11.1 %(w/w) and not more than 17 %(w/w).
- c) Class 3: whitening materials containing hydrogen peroxide of more than 6.0 %(w/w), or that of urea peroxide of more than 17 %(w/w).

4. Requirements

4.1 Biocompatibility

As for biocompatibility of whitening materials, biological safety shall be evaluated according to **JIS T 0993-1** and **JIS T 6001**.

4.2 Appearance

Powder, liquid or paste of whitening materials shall be homogeneous and without foreign materials by visual inspection.

4.3 Concentration of hydrogen peroxide or urea peroxide

When tested according to 5.1, a concentration of hydrogen peroxide or urea peroxide of whitening materials shall comply with 3.2

4.4 pH

When tested according to 5.2, whitening materials shall have a pH value within the following ranges:

- a) pH is from 5 to 8 for Classes 1 and 2 whitening materials
- b) pH is from 4 to 11 for Class 3 whitening materials

4.5 Influence to enamel

4.5.1 Morphological change of enamel

When tested according to 5.3, enamel of any of 3 test specimens treated with the whitening material shall not have morphological change due to the treatment such as crack or exfoliation.

4.5.2 Change of enamel hardness

When tested according to 5.3, the change rate of enamel hardness before and after treatment with the whitening material shall be less than 10 %.

5. Test methods

5.1 Measurement of hydrogen peroxide and urea peroxide concentration

Test methods for measuring concentration of hydrogen peroxide and urea peroxide are as follows:

a) Measurement of hydrogen peroxide concentration

Dispense precisely 1.00 g of the whitening material prepared according to the instructions for use. Add purified water to the whitening material with stirring, make 250 mL of homogeneous solution. Dispense precisely 25 mL of the solution, add 10 mL of sulfuric acid (ca. 5 %), and titrate the mixture with 0.1 N potassium permanganate. Calculate the concentration of hydrogen peroxide from the following equation:

$$C = 1.7007 \times V / W$$

C: concentration of hydrogen peroxide (%)

V: titer of 0.1 N potassium permanganate (mL)

W: amount of the whitening material dispensed (g)

b) Measurement of urea peroxide concentration

Dispense precisely 100 mg of the whitening material prepared according to the instructions for use into an iodine flask, and add 25 mL of water and 5 mL of glacial acetic acid to the whitening material with stirring. Then, add 2 g of potassium iodide and 1 drop of ammonium molybdate reagent to the prepared solution, and seal the flask tightly, keep it in a dark place for 10 minutes. And titrate iodine residue with 0.1 mol/L sodium thiosulfate solution. Calculate the concentration of urea peroxide from the following equation: Indicator: starch reagent

$$C = 4.704 \times V \times 100 / W$$

C: concentration of urea peroxide (%)

V: titer of 0.1 mol/L sodium thiosulfate (mL)

W: amount of whitening material dispensed (g)

5.2 pH test

Measure a pH value of the whitening material prepared according to the instructions for use using a pH meter with a glass electrode at $(25\pm 2)^{\circ}\text{C}$ in accordance with JIS Z 8802. **5.3 Test for the influence to enamel**

5.3.1 Apparatus

- a) optical microscope
- b) Vickers hardness tester

5.3.2 Test for the morphological change of enamel

Observe a morphological change of enamel before and after treatment with the whitening material prepared according to the instructions for use. The test method is as follows:

- a) Select 3 bovine mandibular anterior teeth (kept frozen or refrigerated after extraction) with no significant color difference by visual observation.
- b) After tooth root removal, embed the bovine tooth in dental stone with their labial surface exposed.
- c) As shown in Fig 1, polish the labial surface of the bovine tooth with waterproof abrasive papers to make flat surface without dentin exposure. Use the abrasive papers P400, P600, P1000 and P2000 specified in JIS R 6253 consecutively, then buff up the surface with aluminum oxide grain of $0.3\ \mu\text{m}$ in mean particle diameter. The polished surface shall be approximately 10mm in minor diameter.
- d) Observe the polished tooth surface before and after the treatment with the whitening material by an optical microscope (at 100-fold magnification) whether the enamel has undergone any morphologic change such as crack or exfoliation.

Prevent the test specimens from drying out during observation.

Note Distinguish the crack/exfoliation that was present before the treatment or due to drying during observation from the crack/exfoliation by the treatment with the whitening material.

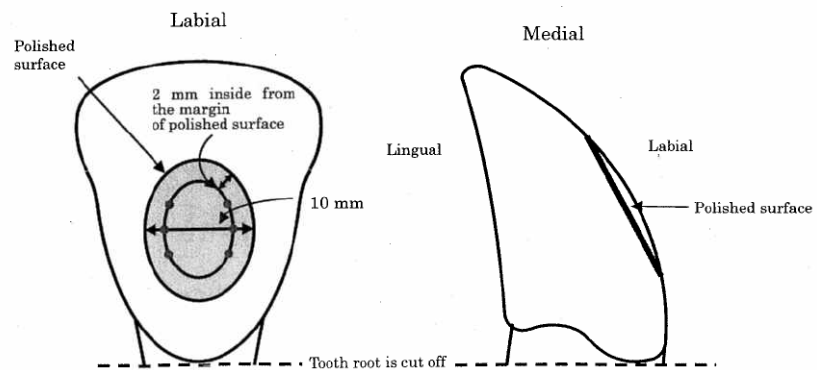


Fig. 1 Polished surface and measuring positions for hardness

5.3.3 Test for Change of enamel hardness

Compare enamel hardness before and after the treatment with the whitening material using the test specimens used in 5.3.2. The test method is as follows:

