

## 含锌、氟离子矿化液对牙釉质理化性能的影响

谷海晶<sup>1</sup>, 刘丽敏<sup>2</sup>, 凌均荣<sup>1\*</sup>

(1. 中山大学光华口腔医学院附属口腔医院//广东省口腔医学重点实验室 儿童口腔科, 广东 广州 510060; 2. 中山大学附属第三医院口腔科, 广东 广州 510630)

**摘要:**【目的】研究以钙磷为基础的含锌、氟离子矿化液对牙釉质理化性能的影响。【方法】将因治疗需要而拔除的成人第三磨牙牙冠制作成牙釉质切片。分别以含不同浓度氟离子和锌离子的钙磷饱和和矿化液处理牙釉质切片, 分为处理组: CaP-ZnF、CaP-F、CaP-Zn、CaP 组和双蒸水 DDW 对照组。采用扫描电镜、X 射线衍射仪和红外光谱仪, 检测矿化液处理组和对照组牙釉质切片的表面特性。【结果】扫描电镜观察到经矿化液处理后的牙釉质切片表面有聚集的微晶沉积。X 射线衍射仪分析牙釉质表层沉积的羟基磷灰石晶体显示, 含氟离子组和同时含有锌、氟离子组矿化液与含锌离子组或对照组相比, 晶粒增大、晶体完整性增高及沉积量增多。含氟离子组和同时含有锌、氟离子组矿化液处理的牙釉质表面红外光谱仪图谱分析, 结果显示在 1102、1065、1027  $\text{cm}^{-1}$  处呈现多个 P-O(磷酸组)吸收峰。【结论】含有钙离子、磷酸根离子、锌离子和氟离子的矿化液可以在牙釉质表面形成具有保护功能的载锌氟磷灰石晶体层, 从而具有防治早期牙釉质龋的作用。

**关键词:** 氟磷灰石; 锌; 矿化; 牙釉质

中图分类号: R78

文献标志码: A

文章编号: 1672-3554(2014)06-0860-06

## Effects of Calcium Phosphate Solutions Containing Fluoride and Zinc on Physical and Chemical Properties of Enamel Surface

GU Hai-jing<sup>1</sup>, LIU Li-min<sup>2</sup>, LING Jun-qi<sup>1\*</sup>

(1. Guanghua School of Stomatology, Hospital of Stomatology, Sun Yat-sen University//Guangdong Provincial Key Laboratory of Stomatology, Guangzhou 510033, China; 2. Department of Stomatology, The Third Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510630, China)

**Abstract:** 【Objective】 The purpose of this research was to determine the effects of mineralizing calcium phosphate-based solutions with zinc and fluoride ions treatment on enamel physical and chemical properties. 【Methods】 Enamel sections from adult molars were removed because treatment needed. The enamel surfaces were treated with mineralizing solution supersaturated with respect to F- or Zn-substituted calcium phosphates. According to different mineralized compositions, the enamel sections were divided into treatment groups of A, B, C and D, supplemented with solution of CaP-ZnF, CaP-F, CaP-Zn and CaP respectively, one control group of double distilled water (DDW). The untreated and treated enamel sections were characterized using scanning electron microscopy, X-ray diffraction and Fourier transform infrared spectroscopy. 【Results】 Enamel treated with mineralizing calcium phosphate-based solutions with zinc and fluoride ions showed presence of adherent coating consisting of aggregations of microcrystals. FT-IR demonstrated F alone doped apatite group or F and Zn doped apatite group caused a slight increase in the resolution of the PO<sub>4</sub> absorption band ( $\nu_3$  P-O) at 1102, 1065, and 1027  $\text{cm}^{-1}$  compared to the Zn doped apatite group or control group. 【Conclusion】 Calcium phosphate solution with zinc and fluoride ions is the ideal mineralization solution for the enamel.

**Key words:** fluorapatite; zinc; mineralization; enamel

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2014, 35(6): 860-865]

收稿日期: 2014-03-27

基金项目: 国家自然科学基金(81200777); 中山大学青年教师基金(12ykpy66)

作者简介: 谷海晶, 博士, 副教授, 研究方向: 口腔内科学, E-mail: guhaijing9999@126.com

氟化物具有重要的生物学活性,氟离子可以结合牙釉质脱矿游离出的钙离子和磷酸根离子形成氟磷灰石晶体<sup>[1-2]</sup>。低浓度的氟化物即具有明显促进羟基磷灰石晶体生长的作用,并且在牙釉质矿化的同时因氟离子的纳入可以形成抗酸能力较强的氟磷灰石晶体。氟化物在防龋过程中的一个重要特性是抑制牙釉质在酸性环境中的溶解性,但是抑制牙釉质在酸性溶液中溶解所需氟离子的浓度,尚无定论。近年来有研究表明,氟离子在无机酸性缓冲溶液中具有促进牙釉质溶解和氟磷灰石晶体沉积的双重效果<sup>[3]</sup>。锌离子是影响微生物和细胞正常生长的重要微量营养元素之一,一些临床研究表明锌盐中释放的锌离子( $Zn^{2+}$ )可以结合至钙磷灰石的表明起到抑制牙石形成的作用<sup>[4-6]</sup>,由于不同浓度锌离子抗抑菌效果不同,因此会影响钙磷灰石晶体形成的类型<sup>[5,7-9]</sup>。本研究配制不同锌、氟离子浓度的矿化液,比较其并观察其在体外对牙釉质的矿化效果,筛选出性能理想的牙釉质矿化液,为进一步研究锌氟磷灰石晶体对口腔菌斑生物膜细菌生长的作用和影响奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

氯化锌,氟化钠,二水磷酸氢钙,磷酸,氢氧化钠,钙、磷、锌、氟离子标准溶液,溴化钾等皆购自(Fisher Scientific, USA)。单晶混悬液 MetaDi<sup>®</sup> Monocrystalline Diamond Suspension 购自 Buehler, USA。扫描电镜(SEM) JEOL JSM-5400。电感耦合等离子体(ICP)为 Thermo Jarrell Ash Model-Trace Scan Inductive Coupled Plasma(Waltham, MA),X-射线能谱仪(XRD)为 Philips X'Pert(Japan),傅里叶红外光谱仪(FT-IR)为 NicoletMagna IR 550 Spectrometer Series II (France),采用氟离子选择性电极 Tracer Fluoride Pocketester<sup>™</sup> (Lamotte Company, USA)。

### 1.2 配制含锌氟磷灰石晶体矿化液及检测离子含量

饱和矿化液是在以往的钙、磷化合物合成<sup>[10]</sup>及锌离子对菌斑生物膜作用的研究基础上<sup>[11]</sup>采用沉积法配制而成。四种饱和矿化液分别由化学试剂二水磷酸氢钙(dicalcium phosphate dihydrate, DCPD)、氟化钠和氯化锌配制合成,分别命名为矿

化液 CaP-ZnF、CaP-F、CaP-Zn 和 CaP。这4种矿化液 pH 值均为 5.5。CaP 含有饱和的钙离子和锌离子;其余的三种矿化液除钙离子和锌离子外, CaP-ZnF 含有饱和的锌离子和氟离子, CaP-F 含有饱和的氟离子, CaP-Zn 含有饱和的锌离子。

采用电感耦合等离子体(ICP)检测矿化液中钙、磷、锌等元素的含量。取四种矿化液各 10 mL,用双蒸水稀释 100 倍。配制质量体积浓度为 1、50 和 100 mg/L 的钙离子标准溶液及 0.1、1 和 10 mg/L 的锌离子标准溶液。稀释后的四种矿化液样品由载气(氩气)引入雾化系统进行雾化后,以气溶胶形式进入等离子体轴向通道,在矩管处气化生成等离子体。检测系统根据特征谱线强度测量出各矿化液中钙、锌等元素的含量,实验重复 3 次,取平均值。

采用氟离子选择性电极检测矿化液中氟元素含量。从配制好的四种矿化液中分别吸取 10 mL 加入到 10 mL 的 Tisab 缓冲溶液中并混匀。调整氟离子选择性电极的检测范围,按仪器使用说明依次检测四种矿化液中氟的含量,实验重复 3 次,取平均值。

### 1.3 牙釉质切片标本的制备

实验中所用的牙齿由中山大学附属口腔医院颌面外科提供。牙齿选自于因治疗需要而拔除的成人第三磨牙(20~40岁),共 30 个患者,每人 1~2 颗磨牙,磨牙牙冠完整,无缺损、无龋坏。牙齿被拔除后立即保存在生理氯化钠溶液中,采用  $\gamma$  射线消毒。水冷式金刚石切割机近远中向切割牙冠制备成牙釉质切片,每个磨牙的牙冠切成 3~4 个牙釉质切片。双蒸水冲洗后,用 1  $\mu$ m 单晶混悬液进一步抛光 30 s,使牙釉质表面光亮。最后将标本超声清理 3 次,每次 10 min。压缩空气吹干,保存于干燥器中。

### 1.4 牙釉质切片的矿化处理

将上述的预备的牙釉质切片标本进行处理分为为:A组,即矿化液 CaP-ZnF 处理组;B组,即矿化液 CaP-F 处理组;C组,即矿化液 CaP-Zn 处理组;D组,即矿化液 CaP 处理组;对照组,即 DDW 处理组。每组标本数量均为 20 个,处理时先将样本浸泡于矿化液中 4 min,然后用 1 mL 的双蒸水冲洗 3 次,最后用压缩空气将标本表面吹干并放置于干燥器中。

### 1.5 扫描电镜下观察切片表面形态特征

表 1 四种矿化液中钙、磷、锌、氟离子含量

Table 1 Ions level of Ca, P, F, Zn in 4 kinds of solution

(mg/L)

Solutions	Ca	P	F	Zn
CaP-ZnF	4 182.6 ± 25.4 <sup>1)</sup>	302.5 ± 13.3 <sup>1)</sup>	15.1 ± 0.6 <sup>1)</sup>	14.9 ± 0.7 <sup>1)</sup>
CaP-F	4 507.6 ± 37.3 <sup>2)</sup>	610.8 ± 12.7 <sup>2)</sup>	17.3 ± 0.8 <sup>1)</sup>	0 <sup>1)</sup>
CaP-Zn	4 512.6 ± 33.1 <sup>2)</sup>	905.0 ± 26.1 <sup>3)</sup>	0 <sup>2)</sup>	16.2 ± 0.3 <sup>1)</sup>
CaP	5 012.6 ± 46.8 <sup>3)</sup>	1 007.0 ± 35.6 <sup>4)</sup>		

1), 2), 3), 4) are significantly different from each other ( $P < 0.05$ ,  $n = 3$ ).

取每组切片标本各 3 个, 用传导性石墨黏剂将对照组和处理组牙釉质切片黏结于铝桩, 并采用镀金技术对样本表面进行镀金处理, 扫描电镜检测切片表面。每个切片观察和拍照的部位主要集中于切片的中间区域, 此区域的牙釉质小管垂直于牙釉质切片表面。扫描电镜观察样本并拍照, 拍照的倍数分别为 1、2、10 和 20 千倍。

### 1.6 X 射线衍射仪(XRD)检测切片表面晶粒大小

取每组切片标本各 6 个, 采用 XRD 测定牙釉质切片表面晶体结构, 弯曲水晶单色器和铜  $K\alpha$  放射线, 工作电压为 45 kV, 电流为 45 mA, 扫描的  $2\theta$  角度为  $25^\circ$  至  $35^\circ$ ,  $2\theta$  扫描速率为  $0.02^\circ/(10 \text{ s} \cdot \text{step})$ 。X 射线衍射图谱中,  $[002]$  晶面衍射峰的半峰宽被称为  $\beta_{1,2}$ , 采用 Debye-Scherrer 公式:  $t = 0.9\lambda/\beta_{1,2} \cos \theta$  计算微晶大小。公式中  $t$  为微晶大小,  $\lambda$  为入射 X 射线波长,  $\beta_{1,2} \cos \theta$  为样本和仪器本身设定的半峰宽的差值。以标准氟磷灰石材料来设定仪器本身的波峰宽度。

### 1.7 傅里叶红外光谱仪(FT-IR)鉴定切片表面组成成分

取每组切片标本各 12 个, 采用 FTIR 检测牙釉质表面的化学组成特征。用手动刮治器分别刮取各组牙釉质表层, 每 1 mg 被刮除的牙齿表面的粉末和 250 mg 的溴化钾粉末混匀。水压器将混合有样本的溴化钾粉末制成厚度为 1 mm 直径为 8 mm 的半透明薄片。每个样本红外线吸收光谱设定的检测范围为  $4000 \sim 400 \text{ cm}^{-1}$ 。以碳酸磷灰石和其他钙磷图谱作对比参照, 对图谱结果进行分析。

### 1.8 统计学分析

所有计量资料采用均值加减标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 两组间均值比较, 先进行方差齐性  $F$  检验, 若方差齐, 采用独立样本  $t$  检验, 方差不齐, 改用  $t'$  检验; 多组间均值的比较, 采用单因素方差分析, 若

方差齐采用  $F$  检验进行总体均值比较, SNK 法进行均值两两比较, 方差不齐时采用 Welch 检验进行总体均值比较, Dunnett T3 法进行均值两两比较。均由 SPSS 16.0 进行统计分析,  $\alpha = 0.05$ 。

## 2 结 果

### 2.1 四种矿化液的化学成分

四种矿化液的化学成分见表 1, 可见不同溶液的各离子含量基本不同。

### 2.2 牙釉质表面矿化液处理前后扫描电镜下形态特征

在扫描电镜下, 矿化液处理前牙釉质表面形态为, 晶体排列整齐, 晶粒大小均匀, 其中 1 例切片如图 1 所示。矿化液处理后, 处理组的牙釉质切片的表面均可观察到沉积在表层的晶体, 并且牙釉质表面晶体沉积量与矿化液的化学组成紧密相关。矿化液 CaP-ZnF、CaP-F、CaP-Zn 和 CaP 处理的牙釉质标本表面均有晶体的沉积 (图 2)。对照组牙釉质表面无晶体沉积。

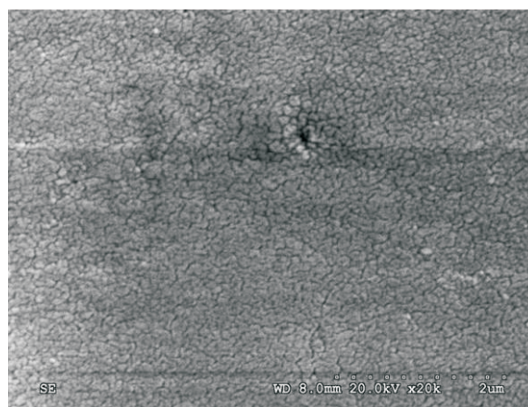


图 1 扫描电镜下牙釉质表面形态

Fig.1 SEM images of enamel before treatment

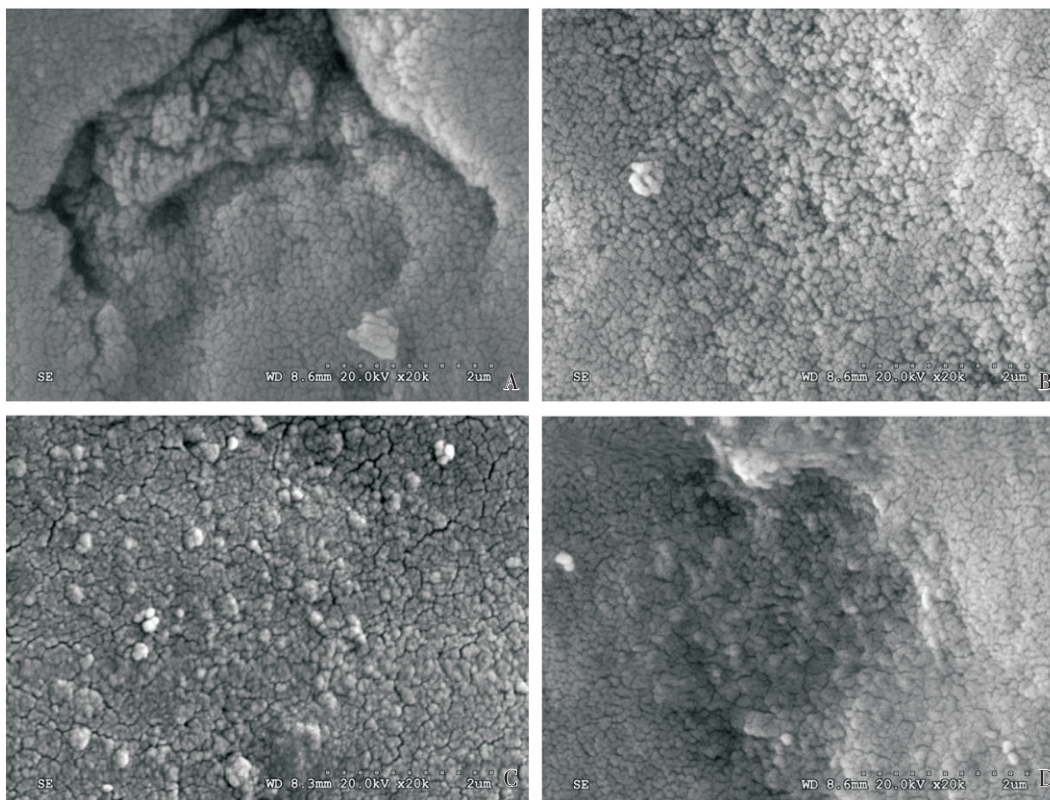


图2 扫描电镜下四种矿化液处理后牙釉质表面的形态

Fig.2 SEM images of enamel after immersion in calcium phosphate solutions

A, B, C and D are enamels treated with solutions CaP-ZnF, CaP-F, CaP-Zn, and CaP, respectively;  $\times 20\ 000$

### 2.3 X-RD 鉴定标本表面组成成分

所有处理组和对照组牙釉质样本, XRD 显示均有明显的羟基磷灰石主要特征的衍射峰。XRD 图谱中各组样本微晶大小的统计结果显示, 四组处理组 A, B, C 和 D 晶粒大小(nm)分别为  $29 \pm 4$ ,  $30 \pm 5$ ,  $26 \pm 3$  和  $26 \pm 4$ (图 3)。其中 A 组与 B 组之间及 C 组与 D 组之间的晶粒大小没有明显统计学差异( $P > 0.05$ ), 但 A 组与 C 组、A 组与 D 组( $P < 0.05$ )以及 B 组与 C 组和 B 组与 D 组( $P < 0.05$ )之间晶粒大小有明显统计学差异。XRD 结果显示, CaP-ZnF、CaP-F 矿化液处理后的牙釉质切片表层的羟基磷灰石晶粒比 C 组明显增大, 对照组无晶体颗粒沉积。

### 2.4 FT-IR 图谱分析

将各组样本表层刮下来的粉末进行傅里叶红外光谱仪分析, 图谱结果显示, 每组均有典型的碳酸磷灰石图形特征, 碳酸磷灰石的波峰表现在波长为  $1510$ 、 $1450$  和  $873\text{ cm}^{-1}$  处 C-O( $\text{CO}_3$  碳酸组)呈现多个特征性吸收峰, 以及波峰为  $1100\sim$

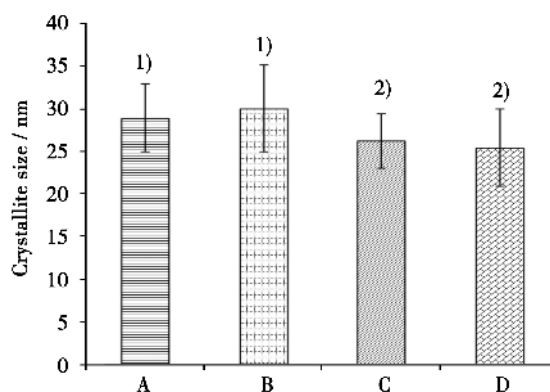


图3 4种矿化液处理后牙釉质表面沉积晶体的晶粒大小

Fig.3 Crystallite sizes deposited on the enamel surfaces treated with 4 kinds of solutions

A, B, C, D: CaP-ZnF, CaP-F, CaP-Zn, and CaP, respectively;  $n = 6$ , 1) vs 2),  $P < 0.05$

$1027\text{ cm}^{-1}$ ,  $603\text{ cm}^{-1}$  和  $562\text{ cm}^{-1}$  处 P-O ( $\text{PO}_4$  磷酸组)呈现的多个特征性吸收峰。矿化液 CaP-ZnF 和 CaP-F 处理的牙釉质表面刮除下的磷灰石晶体在

傅里叶红外光谱仪显示的图谱中,呈现出分辨率较高的多个 P-O 吸收光谱(位于 1102, 1065, 1027  $\text{cm}^{-1}$ ; 图 4)。

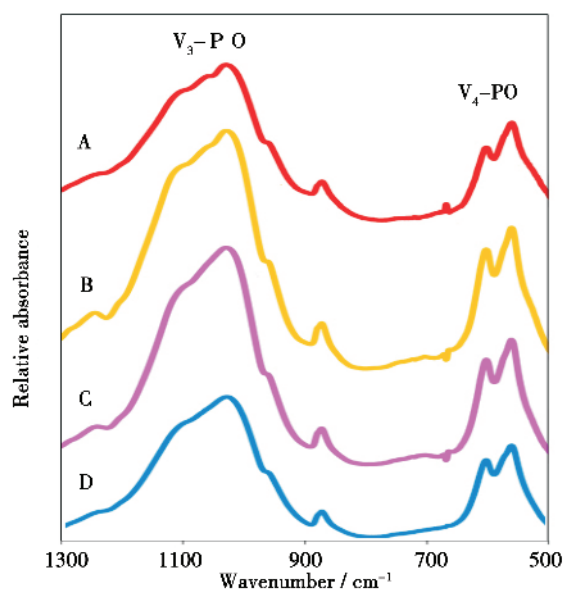


图 4 四种矿化液处理后牙釉质表面 P-O 吸收光谱

Fig.4 P-O absorption bands in the spectra of materials scraped from treated enamel surface

In 1102, 1065, 1027  $\text{cm}^{-1}$ . A, B, C, and D: Enamels treated with solutions CaP-ZnF, CaP-F, CaP-Zn, and CaP, respectively.

### 3 讨论

本研究结果发现经含锌、氟离子矿化液处理后的牙釉质切片表面均有微晶沉积。XRD 分析晶粒大小显示,含氟离子组(CaP-F)和同时含有锌、氟离子组(CaP-ZnF),与含锌离子组(CaP-Zn)或 CaP 组相比,晶粒增大、晶体完整性增高及沉积量增多,因而矿化效果较佳。FT-IR 图谱显示,经含氟离子组和同时含有锌、氟离子组矿化液处理的牙釉质切片表层均有氟磷灰石晶体形成。

牙釉质龋早期防治措施包括减少细菌在牙齿表面的附着和生长,中和细菌代谢过程中的酸性产物及矿化治疗。其中磷灰石晶体在牙面沉积的矿化治疗,为牙釉质龋预防和早期治疗的主要措施之一,如果定期适当实施,可以预防、静止及修复早期龋损,从而避免临床预备和充填窝洞<sup>[12]</sup>。矿化修复包括来自口腔唾液钙离子和磷酸根离子的内源性矿化修复和来自外源性的钙离子和磷酸根

离子的矿化修复;还包括全身系统性或局部氟化产品的应用<sup>[3,13-14]</sup>。再矿化液中添加氟离子形成的氟磷灰石晶体是较理想的矿化晶体。本研究在此矿化液中进一步添加锌离子,结果显示牙釉质表面形成一层具有保护功能的矿化涂层。沉积于牙釉质表面的磷灰石晶体量与矿化液的组成密切相关。XRD 分析矿化晶粒大小显示矿化液中含有氟离子时晶粒增大、晶体的完整性增高及沉积量增多。傅里叶红外线图谱结果表明,随着氟离子的添加,在 1102、1065、1027  $\text{cm}^{-1}$  处呈现的多个 P-O (磷酸组)吸收峰。

氟离子在牙釉质矿物质被纳入的过程是一个矿物质溶解(脱矿)和矿物质沉积(再矿化)的过程,并且再矿化的矿物质属于抗酸能力较强的含氟的磷灰石<sup>[15]</sup>。此外,含氟的磷灰石被酸溶解时,引起牙釉质周围释放出的氟离子的浓度也相应增高,进而促进再矿化的功能。在矿化溶液中加入氟离子,人工合成的磷灰石和牙釉质磷灰石的溶解性均下降。LeGeros 等<sup>[16]</sup>早期采用同时含有钙(Ca)、磷酸根(P)和氟(F)三种离子的矿化液,使人工合成的磷灰石或牙釉质磷灰石矿化后,其抗酸能力比采用仅含有两种离子(Ca+P)、(F+Ca)或者(F+P)的矿化液明显增强,而且含有两种离子的矿化液抗酸效果比采用单一 Ca 离子或者 P 离子的矿化液的抗酸效果好。

本研究在以往研究成果的基础上,发现在含有钙(Ca)、磷酸根(P)、锌(Zn)和氟(F)四种离子的矿化液中,当 pH 值相同时,矿化晶体在牙釉质表面沉积的量及对牙釉质理化性能的影响取决于矿化液的中钙(Ca)、磷酸根(P)和氟(F)及锌(Zn)离子的含量及组合。

综上所述,含有钙离子、磷酸根离子、锌离子和氟离子的矿化液可以在牙釉质表面形成具有保护功能的载锌氟磷灰石晶体层,从而具有防治早期牙釉质龋的作用。在以后的研究中,我们将分析、比较沉积有载锌氟磷灰石晶体的牙釉质表面对变形链球菌附着和繁殖的影响,为该矿化液临床应用于龋病防治提供新的理论依据。

#### 参考文献:

- [1] Chen H, Sun K, Tang Z, et al. Synthesis of fluorapatite nanorods and nanowires by direct precipitation from solution [J]. Cryst Growth Des, 2006, 6 (6):1504-

- 1508.
- [2] Chinthaka Silva GW, Ma L, Hemmers O, et al. Micro-structural characterization of precipitation-synthesized fluorapatite nano-material by transmission electron microscopy using different sample preparation techniques [J]. *Micron*, 2008, 39(3): 269-274.
- [3] Lynch RJ, Mony U, Ten Cate JM. The effect of fluoride at plaque fluid concentrations on enamel de- and remineralisation at low pH [J]. *Caries Res*, 2006, 40(6):522-529.
- [4] Charles CH, Cronin MJ, Conforti NJ, et al. Anticalculus efficacy of an antiseptic mouthrinse containing zinc chloride [J]. *J Am Dent Assoc*, 2001, 132(1):94-98.
- [5] Yamada Y, Ito A, Kojima H et al. Inhibitory effect of Zn<sup>2+</sup> in zinc-containing beta-tricalcium phosphate on resorbing activity of mature osteoclasts [J]. *J Biomed Mater Res A*, 2008, 84(2):344-352.
- [6] Matsunaga K. First-principles study of substitutional magnesium and zinc in hydroxyapatite and octacalcium phosphate [J]. *J Chem Phys*, 2008, 128(24):245101.
- [7] Li X, Sogo Y, Ito A, et al. The optimum zinc content in set calcium phosphate cement for promoting bone formation in vivo [J]. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2009, 29(3): 969-975.
- [8] Tang Y, Chappell HF, Dove MT, et al. Zinc incorporation into hydroxylapatite [J]. *Biomaterials*, 2009, 30(15): 2864-2872.
- [9] Silva GW, Hemmers O, Czerwinski KR, et al. Investigation of nanostructure and thermal behavior of zinc-substituted fluorapatite [J]. *Inorg Chem*, 2008, 47(17):7757-7767.
- [10] Yao F, LeGeros JP, LeGeros RZ. Simultaneous incorporation of carbonate and fluoride in synthetic apatites: Effect on crystallographic and physico-chemical properties [J]. *Acta Biomater*, 2009, 5(6): 2169-2177.
- [11] Gu H, Fan D, Gao J, et al. Effect of ZnCl<sub>2</sub> on plaque growth and biofilm vitality [J]. *Arch Oral Biol*, 2012, 57(4): 369-375.
- [12] Anusavice KJ. Efficacy of nonsurgical management of the initial caries lesion [J]. *J Dent Educ*, 1997, 61(11): 895-905.
- [13] Petersson LG, Twetman S, Dahlgren H, et al. Professional fluoride varnish treatment for caries control: a systematic review of clinical trials [J]. *Acta Odontol Scand*, 2004, 62(3): 170-176.
- [14] Petersson LG. The role of fluoride in the preventive management of dentin hypersensitivity and root caries [J]. *Clin Oral Investig*, 2013, 17 Suppl 1:S63-71.
- [15] Tanaka M, Moreno EC, Margolis HC. Effect of fluoride incorporation into human dental enamel on its demineralization in vitro [J]. *Arch Oral Biol*, 1993, 38(10):863-869.
- [16] Okazaki M, LeGeros RZ. Properties of heterogeneous apatites containing magnesium, fluoride, and carbonate [J]. *Adv Dent Res*, 1996, 10(2):252-259.

(编辑 刘清海)