

牙齿中氟、磷和钙的测定

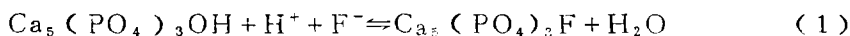
黎兰馨 张世忠 陆美琼 骆日新

(化学教研室)

江俊荣 沈彦民

(口腔系)

一般认为氟化物的防龋机理之一,是由于氟离子与牙釉质表面的羟基磷灰石 $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$ 中的羟基发生交换反应^[1,2,4]:



由于氟离子与氢氧离子电荷相等,离子半径也非常接近 OH^- ,极易发生交换反应。生成氟磷灰石 $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{F}$ 有较强的耐酸性,故有防龋作用。如忽略磷、钙、羟基和氟离子以外的其他离子的作用,则氟-羟基磷灰石的组成为:



这个组成是可变的,取决于氟的摩尔分数X(因纯氟磷灰石中氟含量为38,000ppm,此时X=1;而纯羟基磷灰石中,X=0)。

在正常营养条件下,牙釉质中钙与磷的重比为2:1^[1],但其中氟含量则变动较大。一般认为与饮水氟含量成正比^[1,2,3,6]。当饮水氟为1ppm附近时,牙釉质表面含氟量可高达1,450ppm^[1],整个牙釉质氟含量平均约为100~130ppm^[2,3]。

饮水氟的防龋作用,正是由于氟离子促进了(1)式的平衡向右移动,使牙釉质表面形成更多的氟磷灰石保护层。但如饮水氟过高(2ppm以上),将发生斑釉症和慢性氟中毒^[1,2,4,5]。因此,牙齿中氟、磷和钙的测定,对于研究牙齿的组成及阐明氟的防龋作用将有一定意义。

生物材料中氟的测定,从30年代开始直到50年代,仍沿用古典的灰化·蒸馏·比色法(或滴定法)^[7],50年代中到60年代初提出的灰化·扩散·比色法^[8],和不灰化·扩散·比色法测定生物材料中的氟含量。1966年氟电极^[9,10]问世后,分别采用了灰化·扩散·氟电极法^[12]和氧瓶燃烧·氟电极法测定生物组织中的氟^[13,14]。近年来国内已报道了用灰化·酸溶氟电极法测定骨氟^[11],但对于齿氟的测定似尚未见报道。本文采用不灰化·扩散·氟电极法,即把样品置于扩散合子(Conway型)中,加入高氯酸,用强碱液吸收扩散出来的氟化氢,配成样品溶液,按氟电极法测定样品中氟含量。同时,取扩散了氟化

氢后的底液,分别测定磷酸盐(钒黄法)^[15,16],和钙盐(EDTA滴定法^[16])的含量。

本文提出了牙齿中氟、磷和钙的测定方法及结果,还报告了广州自来水加氟初期(1966年)及7年后(1972年)市民牙齿(包括乳牙和恒牙)中氟、磷和钙含量的变化,为自来水加氟提供了参考资料。

实验材料及方法

一、仪器及主要试剂

A、测氟离子用:

PHS—2型酸度计(上海第二分析仪器厂)

232型饱和甘汞电极(上海真空器件研究所)

CSB—F—1型氟离子选择性电极(长沙半导体材料厂)

磁力搅拌器

扩散盒子(Conway型,约60×15毫米,聚乙烯)

用去离子水(比电阻约500千欧姆)及分析纯试剂配制溶液:

1.000×10⁻¹M氟化钠标准溶液,并逐级稀释为10⁻²、10⁻³、10⁻⁴、10⁻⁵M。

总离子强度调节剂(TISAB):57.80克(0.68M)硝酸钠及0.3克柠檬酸钠二水物,溶于约700毫升水中,加57毫升冰醋酸,加入氢氧化钠调节至pH5.5,用玻璃电极校正,最后加水配成1升溶液(夏天宜加入少量氯仿防腐)。

高氯酸

B、测磷酸盐用:

72型分光光度计(上海分析仪器厂)

磷酸盐标准溶液:用磷酸二氢钾配成每毫升含磷0.1000毫克的溶液

钒钼酸试剂:5%钼酸铵溶液与用硝酸(1:1)配制的偏钒酸铵溶液等体积混合(临用时混合)。

C、测钙盐用:

滴定管(25毫升)

分液漏斗(梨形,60毫升)

0.0200MEDTA二钠标准溶液(经过用钙盐基准溶液校正)

20%钼酸钠溶液

正丁醇—氯仿(1:1)萃取液

10%氢氧化钠溶液

钙-红固体指示剂(1克指示剂与99克氯化钾混合研细,置干燥器中保存)

二、样品的收集及处理

收集:广州市自来水原来是低氟的(约0.2~0.3ppm),1965年中开始加氟(约0.6~1.0ppm)。本院口腔科于1966年和1971~72年分别收集出生并居住在广州的市民前来门诊脱落的牙样,用水冲去血迹等物,晾干,包好,贴上标签(包括姓名、性别、年

龄、籍贯及牙型、牙位等项)保存。

处理:把每一牙样中可见的牙骨质、髓质及附着物剔除,然后泡于3%过氧化氢中10分钟,取出,先用自来水冲洗,继用去离子水淋洗2~3遍,晾干或置于红外线干燥箱中干燥15分钟。把牙样用机械砸碎,置玛瑙(或瓷)研钵中研细,过筛(60~100目),得全牙粉样。

牙釉质和牙本质的分离:根据牙釉质、牙本质和牙骨质的比重不同(比重依次为2.9~3.0, 2.14和2.03)进行分离^{36, 17, 18},本文用溴仿加无水乙醇配成比重2.7(91:9)和2.07(61:39)的溴仿-乙醇溶液,分别置于分液漏斗中。将上述制备的全牙粉样先置于比重2.7的溶剂中浮选,下沉者为牙釉质,上浮者为牙本质和少量的牙骨质,将上浮者移入比重为2.07的溶剂中再浮选1次,下沉者为牙本质,上浮者为少量的牙骨质弃去。分别滤取牙釉质和牙本质,各用少量无水乙醇淋洗3次,分别干燥,包装备用,据报道^{17, 18},用此法分离出的牙釉质和牙本质的纯度达97~99%。

三、测定方法

1. 氟标准曲线的绘制:准确吸取10.00毫升 10^{-5} 、 10^{-4} 、 10^{-3} 、 10^{-2} 、 10^{-1} M氟标准溶液,各置于塑料小烧杯中,分别准确加入10.00毫升TISAB溶液,插入连接于pHS-2型酸度计的饱和甘汞电极和氟电极(先用去离子水洗至读数为-260毫伏),在搅拌下,按由稀到浓的顺序测量各个标准溶液的毫伏数(mV), (恒温 25 ± 1 °C)作mV-pF标准曲线。从各读数之间的差值,求得平均值为实验斜率。本实验用CSB-F-1型氟电极的实验斜率为58毫伏,可供标准加入法计算之用。

2. 样品溶液的制备:精称牙釉质或牙本质粉样约200毫克,小心移置于扩散盒子中,内置一盛有10滴2.5N氢氧化钠的小舟(用来吸收扩散出的氯化氢),样品先滴入少量水润湿,迅速加入5毫升高氯酸(1:1),立即盖好,移置恒温箱中,盒子上用铁板加压,在 60 ± 5 °C中扩散22小时。待冷,小心揭开盒子的上盖,把小舟内的氢氧化钠吸收液小心完全移入50毫升容量瓶中,用稀盐酸调节溶液至pH4.5~5.0附近,加水至标线,摇匀。此溶液供测氟用。

扩散了氯化氢后的底液,滤入50毫升容量瓶中,加水至标线,摇匀。此溶液供测磷、钙之用。

3. 氟化物的测定:取上述制备的牙釉质或牙本质样品液10.00毫升,加TISAB溶液10.00毫升,按上述标准曲线法,用氟电极测出各样液的读数(毫伏),从当天绘制的标准曲线求得相应的氟浓度,算出样品中氟含量(ppm)。本法回收率为 $90 \pm 5\%$,必要时可用标准加入法¹⁴予以核对。

4. 磷酸盐的测定:取6个25毫升容量瓶顺次加入0.0000、0.1000、0.2000、0.3000、0.4000和0.5000毫克磷的标准溶液,各加2.00毫升钒钼酸试剂,各加水至标线,摇匀。用72型分光光度计分别测定吸光度(A)(1厘米比色池,420毫微米波长,及用水作参比调零)。记录读数,作A-C标准曲线。

同时,取上述制备的样品液(牙釉质和牙本质的扩散底液)一定量,依法显色,测定其吸光度,从标准曲线上求得样品液的浓度,然后计算样品中磷含量(%)。本法回收率为 $100 \pm 5\%$ 。

5、钙盐的测定：因样品液中含磷酸盐能干扰EDTA滴定钙，所以先用溶剂萃取法^[20]去磷。即取一定量（如10.00毫升）样品液放入60毫升分液漏斗中，加2毫升盐酸（1:1），15毫升正丁醇—氯仿（1:1）及5毫升20%钼酸钠溶液，立即振摇半分钟，静置1~2分钟，待分层。弃去下层黄色萃取液（钼磷酸盐在有机相）。必要时对水层作第2次萃取。将去磷后的水层移入150毫升锥形瓶中，加水至约25~30毫升，先用氢氧化钠中和至甲基橙碱性，再加5毫升10%氢氧化钠及一小勺钙—红固体指示剂，摇匀，溶液呈红色，用0.0200MEDTA标准溶液滴定至终点（呈蓝色）。记录读数计算样品中钙的含量（%）。本法回收率为 $100 \pm 3\%$ 。

结果及讨论

应用上述分析方法（不灰化·扩散·氟电极法）对广州市自来水加氟初期及7年的牙齿（牙釉质和牙本质）进行氟的测定，回收率为 $90 \pm 5\%$ ，扩散了氟化氢后的底液，用钒黄比色法测定磷，EDTA滴定法测定钙，回收率分别为 $100 \pm 5\%$ 和 $100 \pm 3\%$ ，符合一般要求。分析结果如表1和图1所示。

（1）广州自来水在1965年11月开始加氟，在此之前自来水含氟0.2~0.3ppm，自来水加氟后，含氟0.6~1.0ppm。由表1可见，1966年乳牙牙釉质含氟量平均为 103.0 ± 40.1 ppm，正常值（上限）为181.6ppm；1972年乳牙牙釉质含氟量平均为 137.1 ± 44.2 ppm，正常值（上限）为223.7ppm，二者差异在统计学上有显著意义（ $P < 0.05$ ）。1966年乳牙牙本质含氟量平均为 219.1 ± 81.1 ppm，正常值（上限）为378.1ppm；1972年乳牙牙本质含氟量平均为 320.2 ± 128.2 ppm，正常值（上限）为571.5ppm，二者差异在统计学上有显著意义（ $P < 0.05$ ）。1966年恒牙牙釉质含氟量平均为 121.3 ± 53.6 ppm，1972年为 138.9 ± 69.8 ppm；1966年恒牙牙本质含氟量平均为 311.5 ± 118.1 ppm，1972年为 345.5 ± 103.8 ppm。这两组含氟量后者较前者高一些，但二者差异在统计学上没有显著意义（ $P > 0.05$ ）。

据报道^[5]，广州自来水加氟13年后，龋率下降了50~60%，这与本文分

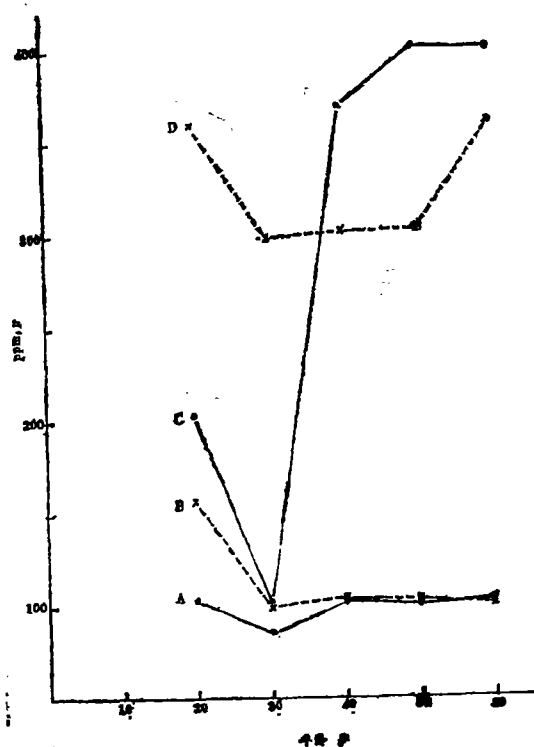


图 牙氟与年龄的关系

A 1966年恒牙牙釉质含氟量 (PPm)
B 1972年恒牙釉质含氟量 (PPm)

析结果相符合。即广州自来水加氟7年后,牙氟相应地有所增加(均在正常范围内),防龋能力有所增加,表现为龋率下降。

(2)据报道^[3],牙氟与饮水氟有关,饮水氟为0.0~0.3ppm时,牙釉质和牙本质的含氟量分别为100和240ppm;饮水氟为1.1~1.2ppm时,则分别增为130和360ppm。广州自来水含氟为0.2~0.3ppm时(1965年11月前),乳牙牙釉质和牙本质含氟量平均为103.0和219.1ppm;自来水含氟为0.6~1.0ppm时,(加氟7年后),乳牙牙釉质和牙本质含氟平均为137.1和320.2ppm。(表1)可见本文分析结果与国外资料基本符合。

(3)据报道^[1],牙齿中羟基磷灰石转变为氟羟基磷灰石 $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{F}_x(\text{OH})_{(1-x)}$ 时,钙与磷的重比为2:1,相当稳定,与本文结果符合(表1)。另外,牙釉质中钙和磷的含量比较牙本质稍高。本文分析结果为:1966年乳牙牙釉质钙、磷含量为35.58%和17.19%,牙本质钙、磷为24.72%和13.31%;恒牙牙釉质的钙、磷为34.28%和16.95%,牙本质钙、磷为25.59%和12.64%。1972年乳牙和恒牙的牙釉质中钙、磷含量也相应比牙本质中钙、磷含量为高。

(4)据报道^[2C],牙氟与年龄有关,饮水低氟区($<0.5\text{ppm}$),适宜区(0.8ppm)和高氟区($\geq 1.9\text{ppm}$),各区牙釉质各含氟量均随年龄而增加,直到30~48岁达到一定水平;牙本质氟量也随年龄而增加,到50~60岁达到一定水平。本文的分析结果如图1所示。图中纵标为ppm(F),横标为年龄组,如20为11至20岁,30为21至30岁,余类推。广州自来水不加氟时(水氟0.2~0.3ppm),恒牙牙釉质含氟量至40岁即达到一定值(40、50和60岁组平均值分别为121.6,105.7,和121.2ppm),牙本质含氟量至50~60岁组达到一定值(分别平均为421.2和413.7ppm)。其中30岁组只有1例含氟量偏低。广州自来水加氟(为0.6~1.0ppm)7年后,恒牙牙釉质含量较高(平均为157.8ppm),至30岁即达到一定值(30、40、50和60岁组分别为98.9、123.0、121.3和100.6ppm)。恒牙牙本质含氟量20岁组平均为360ppm,而30、40、和50岁组含氟量稍低,至60岁组含氟量又回升为³62.4ppm。由此看到恒牙含氟量并不因为自来水加氟而显著增加,而是稍有增加,仍在正常范围内,未见异常现象。图1是广州自来水加氟7年后的情况,不能作为牙氟成长的全过程,有待于今后继续研究。

(本院药学系学生卢炳培参加了部分实验工作)

表 广州自来水加氟初期及7年后市民牙齿中氟、磷和钙的测定结果及比较

牙 釉 质										
年份	饮水氟 PPm	牙样	例数	氟 PPm	牙氟正常值 (上限)PPm	P值	钙 %	磷 %	钙, 磷 (重比)	
1966	0.2~0.3	乳牙	16	103.0±40.1	181.6	<0.05	35.58±6.18	17.19±2.67	2.07, 1	
1972	0.6~1.0		14	137.1±44.2	223.7		34.95±4.04	15.52±1.81	2.25, 1	
1966	0.2~0.3	恒牙	23	121.3±53.6	226.4	>0.05	34.28±2.13	16.95±1.48	2.03, 1	
1972	0.6~1.0		27	138.9±69.8	275.7		33.80±2.80	16.15±1.98	2.10, 1	

牙 本 质										
年份	饮水氟 PPm	牙样	例数	氟 PPm	牙氟正常值 (上限)PPm	P值	钙 %	磷 %	钙, 磷 (重比)	
1966	0.2~0.3	乳牙	17	219.1±81.1	378.1	<0.05	24.72±4.59	13.31±3.63	1.86, 1	
1972	0.6~1.0		15	320.2±128.2	571.5		24.53±1.76	14.41±2.19	1.70, 1	
1966	0.2~0.3	恒牙	23	311.5±118.1	542.9	>0.05	25.59±2.28	12.64±1.79	2.03, 1	
1972	0.6~1.0		28	345.5±103.8	548.9		25.99±2.84	13.00±1.48	2.00, 1	

参 考 文 献

- [1] Ernest Newbrum: Dental Fluoride Chemistry (a) 30~40, (b) 16~18, Charles C, Thomas Publisher, USA, 1974
- [2] Ernest Newbrum: Fluoride and Dental Caries (a) 74~80, (b) 93~96, Charles C, Thomas Publisher, USA, 1972
- [3] Jenkins G Neil: The Physiology and Biochemistry of the Mouth, 4th ed, (a) 476, (b) 54, Lippincott Company, USA, 1978
- [4] Staff J Educ: Chemistry in oral health. J Chem Educ 55(11): 736, 1978
- [5] 中山医学院口腔系第一附属医院口腔科: 自来水加氟与龋齿、错颌、斑釉、萌牙和身高的关系。中山医学院学报1(1): 96, 1980
- [6] 黎兰馨等: 饮水氟、尿氟、牙氟和龋率的调查及地区比较。中山医学院学报 1(1): 141, 1980
- [7] Willard H H and Winter O B: Volumetric method for the determination of fluoride. Ind Eng Chem Anal. Ed 5,7, 1933
- [8] Singer L & Armstrong W: Determination of fluoride procedure based upon diffusion of hydrogen fluoride. Anal Biochem 10(3): 495, 1965
- [9] Frant M S & Ross J W: Electrode for sensing fluoride ion activity in solution. Science 154: 1553, 1966
- [10] (英) G J 穆迪等著: 选择性离子敏感电极(中译本), 60~68页。科学出版社, 1975
- [11] 王昌益 李怡春: 氟离子选择电极法测定骨氟含量 分析化学 5(3): 226, 1977
- [12] Singer L & Armstrong W: Determination of fluoride in bone with fluoride ion electrode. Anal Chem 40(3): 613, 1968
- [13] Moody G J & Thomas J D R: Role of ion-selective electrodes in studies on vegetation, vegetables, fruits, Juices and oils. J Sci Fd Agr 27(1): 43, 1976
- [14] 上海市劳动卫生职业病防治院: 国产氟离子选择电极在劳动卫生学和职业病中的应用。分析化学 3(5): 367, 1975
- [15] 黎兰馨: 血液中无机磷的比色测定(钒黄法)。药学学报 6(1): 55, 1958
- [16] 黎兰馨等: 尿结石的化学分析。生物化学与生物物理学报 5(3): 279, 1965
- [17] Gino G Battistone et al: Studies of the composition of human dentinal protein. J Dent Res 35(2): 255, 1956
- [18] Manly R S & Hodge H C: Density and refractive index studies of dental hard tissues. I. Methods for separation of purity. J Dent Res 18: 133, 1939

Determination of Fluoride, Phosphate and Calcium in Teeth

Li Lanxin Zhang Shizhong

Liu Meiqiong Luo Rixin

(Department of Chemistry, Zhong Shan Medical College)

Jiang Junrong Shen Yanmin

(Department of Stomatology, Zhong Shan Medical College)

Abstract

This paper describes a method for the determination of fluoride, phosphate, and calcium in teeth. The whole tooth is crushed and ground to a fine powder (which can pass through a 60 mesh sieve). Using a flotation method, the whole tooth powder is separated into enamel (density 2.9—3.0) and dentine (density 2.14), while the cementum (density 2.03) is discarded.

The fluoride in the sample (enamel and dentine) was isolated by diffusion (in a cell of Conway-type) and determined with the fluoride ion selective electrode after the pH of the diffusate was adjusted to 5.5. The phosphate and calcium in the residual solution after diffusion of hydrogen fluoride was determined by a colorimetric procedure employing the molybdovanadophosphoric acid, and by an EDTA titration procedure after extraction of phosphate.

Fluoride of teeth (enamel and dentine) after the use of fluoridated water supply for seven years (1972) and before that nonfluoridated water supply (1965) in Guangzhou was determined. The results of the analyses of over 80 samples are presented in tabular form. It has been shown that the boys who drink fluoridated water have significant increase in the fluoride content of primary teeth, and gives a calcium to phosphorus weight ratio of about 2:1.