

## 紫地榆牙膏对牙釉质脱矿和再矿化作用的研究

王丽梅<sup>1,2)</sup>, 周学灵<sup>2)</sup>, 布正兴<sup>2)</sup>, 蓝海<sup>2)</sup>

(1) 大理州医院口腔科; 2) 大理学院药学与化学学院, 云南大理 671000)

**[摘要]** **目的** 评价紫地榆不同溶剂提取物牙膏抑制釉质脱矿和促进再矿化作用的影响. **方法** 检测紫地榆不同溶剂提取物牙膏处理离体牙前后乳酸盐缓冲液中磷离子浓度的变化, 测定出磷溶出率, 评价紫地榆不同溶剂提取物牙膏抑制釉质脱矿作用; 此外, 制作人工龋釉质块模型, 取洛氏硬度值无统计学差异的 25 例脱矿釉质块, 随机分为 A、B、C、D、E 5 组 ( $P > 0.05$ ), 分别进行体外再矿化, 检测经紫地榆不同溶剂提取物牙膏处理前后釉质表面显微硬度值, 从而评价紫地榆不同溶剂提取物牙膏对釉质再矿化的作用. **结果** 乙酸乙酯组、正丁醇组、水层组的釉质溶解度降低率与空白牙膏组比较有统计学意义 ( $P < 0.01$ ), 但 3 组的作用无统计学意义 ( $P > 0.05$ ); 而对于再矿化前后牙釉质表层显微硬度值, 除乙酸乙酯牙膏组和空白牙膏组变化差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 正丁醇牙膏组和水层牙膏组再矿化前后牙釉质表层显微硬度值变化有统计学意义 ( $P < 0.01$ ), 但均低于 NaF 牙膏组 ( $P < 0.01$ ). **结论** 紫地榆 3 种不同溶剂提取物都具有抑制釉质脱矿的作用, 且 3 种提取物的作用无统计学意义. 正丁醇提取物牙膏组和水层牙膏组均能促进人工脱矿牛切牙再矿化, 但效果弱于 NaF 牙膏组 (20g/L).

**[关键词]** 紫地榆; 再矿化; 磷溶出率; 显微硬度

**[中图分类号]** R78 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 2095-610X (2014) 10-0015-04

## Effects of Geranium Strictipes Toothpaste on Enamel Demineralization and Remineralization

WANG Li - mei<sup>1,2)</sup>, ZHOU Xue - ling<sup>2)</sup>, BU Zheng - xing<sup>2)</sup>, LAN Hai<sup>2)</sup>

(1) Dept. of Stomatology, Dali Hospital, DaLi Yunnan 671000; 2) College of Pharmaceutics and Chemistry, Dali University, Dali Yunnan 671000, China)

**[Abstract]** **Objective** To evaluate the effect of different solvent extracts of Geranium Strictipes toothpaste in inhibiting enamel demineralization and remineralization of demineralized enamel. **Methods** We detected the phosphorus ion concentration of lactate buffer and calculate the ratio of soluble phosphorus in free teeth before and after treated by toothpaste with different solvent extracts of Geranium Strictipes, then evaluated the effects of Geranium Strictipes extracts with different solvents toothpaste in inhibiting enamel demineralization. In addition, we made artificial carious enamel block model, and selected 25 cases with similar Rockwell hardness value and randomly divided them into A, B, C, D, E 5 groups, then given them remineralization in vitro, then evaluated the effect of different solvent extracts of Geranium Strictipes toothpaste on enamel remineralization through detecting the enamel surface microhardness before and after treatment. **Results** Compared with blank group of toothpaste, the decrease rate of enamel solubility in ethyl acetate group, n-butyl alcohol group, water group were significantly different ( $P < 0.001$ ), but there were no significant differences between the 3 groups ( $P > 0.05$ ). The enamel surface microhardness had no significant difference between before and after remineralization in Ethyl acetate toothpaste group and the blank toothpaste group ( $P > 0.05$ ), the enamel surface microhardness had significant

**[基金项目]** 国家自然科学基金资助项目(81260512); 云南省大理学院应用开发研究基金资助项目(KYYY201102)

**[作者简介]** 王丽梅 (1965~), 女, 白族, 云南大理市人, 医学学士, 副主任医师, 主要从事口腔颌面修复的研究工作.

**[通讯作者]** 蓝海. E-mail: lanhai8696@126.com

difference in n-butanol toothpaste group and water toothpaste group ( $P < 0.01$ ), but all were lower than those in NaF group ( $P < 0.01$ ). **Conclusion** The 3 different solvent extracts of *Geranium Strictipes* all have the effect of inhibiting enamel demineralization, and there is no significant differences among the 3 kinds of extracts. N-butanol toothpaste group and water toothpaste group could promote the artificial demineralization of bovine incisor tooth remineralization, but the effect is weaker than that of NaF toothpaste group (20 g/L).

[**Key words**] *Geranium Strictipes* R.Kunth; Remineralization; Ratio of soluble phosphorus; Microhardness

紫地榆 (*Geranium Strictures* R.Kunth) 俗称隔山消, 是一种云南常见的中药材, 在彝族和白族民间长期用作厌食症的治疗, 同时具有明显的止血功能<sup>[1]</sup>. 天然药物防龋是国内外研究领域的热点, 研究发现, 紫地榆水提取物可明显增强釉质抗酸蚀能力, 抑制釉质早期的形成, 紫地榆中所含的鞣酸是其重要活性成分之一<sup>[2,3]</sup>. 本研究将紫地榆不同溶剂提取物添加到空白牙膏中, 测定磷溶出率和釉质表面显微硬度值, 观察它们抑制釉质脱矿作用的效果和对釉质矿化作用的影响, 为以后紫地榆防龋的推广提供一定的信息和依据.

## 1 材料与方法

### 1.1 药材

药材紫地榆, 购于大理云济堂大药房, 由大理学院药化学院杨月娥高级实验师鉴定为紫地榆 *Geranium strictures* R.Kunth 的根<sup>[4]</sup>.

### 1.2 主要试剂

95%乙醇, 乙酸乙酯, 正丁醇, KCl, HAC, NaCl, CaCl,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , NaF, NaOH, 以上试剂均为分析纯.

### 1.3 仪器

U791 型紫外分光光度计, PHS-25C 数字酸度计 (上海鹏顺科学仪器有限公司); YMP-2B 金相试样磨抛机 (苏州欧卡精密光学仪器有限公司); ZXQ-1 全自动金相镶嵌机 (上海维纬电子科技有限公司); 402MVD 型自动转塔数显显微硬度仪 (依工测试测量仪器上海有限公司); 电子天平 (波特乐托利多仪器有限公司); SY5200DH 超声波清洗器 (上海声源超声波仪器设备有限公司); 旋转蒸发器 (上海医疗器械设备有限公司); 303-A-I 型电热恒温培养箱 (萧山永发电器有限公司, 湖南实验仪器厂).

### 1.4 紫地榆不同溶剂提取物的制备

称取紫地榆 2 500 g, 用粉碎机粉碎后, 加入 95%酒精 16 500 mL 浸泡 3 次, 用旋转蒸发器蒸发浓缩得乙醇浸膏 828.6 g. 加入去离子水 650 mL 到乙醇浸膏中, 制成混浊液, 依次向混浊液中加入

乙酸乙酯、正丁醇萃取 3 次, 用旋转蒸发器蒸发浓缩得乙酸乙酯提取物 39.19 g, 正丁醇提取物 434.15 g, 控制水层浓缩温度 64 °C, 最后得到水层提取物 91.3 g.

### 1.5 牙膏浆的制备<sup>[5]</sup>

NaF 组牙膏浆: 取 15 g 空白牙膏 (纳爱斯集团有限公司) 加入 45 mL NaF (20 g/L) 溶液中搅拌均匀, 离心 15 min (2 000 r/min), 取 40 mL 上清液备用. 空白组牙膏浆: 将 15 g 空白牙膏与 45 mL 去离子水搅拌均匀, 离心 15 min (2 000 r/min), 取 40 mL 上清液用于实验. 乙酸乙酯提取物牙膏浆: 取 15 g 空白牙膏与 45 mL 乙酸乙酯提取物溶液 (80 mg/mL) 搅拌均匀, 离心 15 min (2 000 r/min), 取 40 mL 上清液备用. 同乙酸乙酯组的制备方法, 制备正丁醇牙膏浆 (80 mg/mL)、水层牙膏浆 (80 mg/mL), 均分别取 40 mL 上清液备用.

### 1.6 方法

**1.6.1 抑制釉质脱矿实验** (1) 牙齿标本制备: 市场购买新鲜拔除的牛切牙, 去除软组织和牙髓, 超声清洗, 选出无裂痕、无龋损的牛切牙齿 40 颗分为 5 组, 每组 8 颗, 晾干备用; (2) 乳酸盐缓冲溶液的制备: 将 2 mL 的乳酸稀释为 400 L, 将 84 g NaOH 溶于 600 mL 水中, 将上述乳酸溶液与 NaOH 溶液混合, 并用蒸馏水稀释至 2 000 mL, 搅拌均匀备用; (3) 脱保护处理: 将牙齿浸入 100 mL 乳酸盐缓冲溶液中酸蚀 2 h, 充分除去牙齿表面的抗酸溶解保护层, 1 h 更换一次液体, 结束后倾去处理液.

**1.6.2 第 1 次酸蚀** 将装有 5 组牙齿的 5 个烧杯分别浸入 37 °C 恒温水浴 30 min, 然后分别在每个小烧杯中加入 40 mL 乳酸盐缓冲液, 酸蚀 15 min 后, 将乳酸盐缓冲液收集到样品瓶中, 备用. 用去离子水将牙齿冲洗 3 次.

**1.6.3 牙膏浆处理** 分别取 5 种牙膏浆上清液 40 mL 加入相应牙齿样品中, 浸泡 5 min 后倾去处理液, 用去离子水将牙齿冲洗 3 次.

**1.6.4 第 2 次酸蚀** 将用 5 种牙膏浆处理后的牙齿样品再次分别放入 40 mL 乳酸盐缓冲溶液中进行第 2 次酸蚀, 方法同第 1 次, 收集 2 次酸蚀后的乳

酸盐缓冲液, 备用.

**1.6.5 牙釉质溶解降低率的测定**<sup>[6-9]</sup> (1) 磷标准溶液的配制: 准确称取磷酸二氢钾 0.439 4 g 溶于水并定容至 100 mL (储备液, 含磷 1 mg/mL), 使用时, 将磷储备液稀释 500 倍 (含磷 2  $\mu$ g/mL). 25 g/L 钼酸铵溶液的配制: 称取 2.5 g 钼酸铵, 加 20 mL 水, 15 mL 浓硫酸溶解, 用水稀释至 100 mL. 抗坏血酸的制备: 称取 10 g 抗坏血酸溶于适量蒸馏水中, 稀释至 100 mL; (2) 标准曲线的绘制: 分别吸取磷标准溶液 0.00 mL, 0.50 mL, 1.00 mL, 3.00 mL, 5.00 mL, 7.00 mL, 10.00 mL, 15.00 mL, 置入 8 个 50 mL 的刻度管中, 加水至 25 mL, 摇匀, 加 2 mL 25 g/L 钼酸铵溶液, 摇匀, 放置 30 s

后, 再加 1 mL 抗坏血酸, 加水至 50 mL, 于室温下显色 15 min, 波长 325 nm, 1 cm 比色皿, 以水作参比, 测定吸光度, 并绘制标准曲线. 以标准溶液的浓度为横坐标, 以相应的吸光度为纵坐标绘制工作曲线, 见图 1.

采用钼酸铵分光光度法测定磷酸盐缓冲液中的磷含量. 酸性条件下, 钼酸铵溶液与磷反应, 生成非还原性磷钼酸化合物, 在波长为 325 nm 处测定其吸光度 A, 由标准曲线方程  $Y = 1.4764X - 0.0042$  计算磷含量, 计算公式:

$$C = \frac{A(\text{样品}) + 0.0042}{1.4764}$$

(3) 牙釉质溶解度降低率(enamel soly rate, ESR):

$$\text{牙釉质溶解度降低率} = \frac{\text{牙膏浆处理前后缓冲液中磷含量 (mmol/L) 差值}}{\text{牙膏浆处理前缓冲液的磷含量 (mmol/L)}} \times 100$$

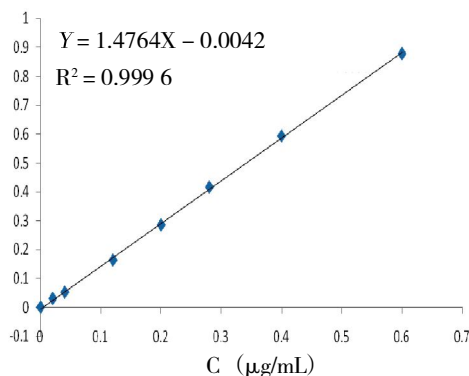


图 1 磷标准曲线

Fig. 1 Phosphorus standard curve

## 1.7 促进釉质再矿化实验

**1.7.1 离体牙釉质块的制备** 新鲜拔出的牛切牙 100 颗, 去除压根、软组织, 用去离子水将冠髓冲洗干净, 用 0.9% 的生理盐水超声清洗 40 min, 用 YMP-2B 金相试样磨抛机去除釉质表面的色素菌斑, 晾干备用.

**1.7.2 脱矿标本的制备** 将制备好的牛切牙标本浸入 110 mL 脱矿液 (2.2 mmol/L CaCl, 2.2 mmol/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.05 mol/L CH<sub>3</sub>COOH, pH = 4.0) 中, 37 °C 培养箱内放置, 5 d 更换 1 次脱矿液, 共脱矿 10 d. 用 ZXQ-1 全自动金相镶嵌机将脱矿后牛切牙的标本固定于镶嵌粉中, 露出完好的牙釉质. 在牙釉质中心用 402MVD 型自动转塔数显微硬度仪在正压力为 200 g 的条件下测定硬度, 每个标本平行测定 3 次, 取其平均值. 选取硬度值在 300 kg/mm<sup>2</sup> 左右的 25 颗牛切牙作为试验样本, 随机分为 A、B、C、D、E 5 组 ( $P > 0.05$ ), 每组 5 颗.

**1.7.3 再矿化实验** A 组用棉签蘸取乙酸乙酯提

取物牙膏浆上清液涂抹于牙釉质 1 min, 再用再矿化液 (2.2 mmol/L CaCl<sub>2</sub>, 2.2 mmol/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.05 mol/L CH<sub>3</sub>COOH, 用 NaOH 调节 pH = 7.0) 涂抹 1 min, 每隔 3 h 处理 1 次, 10 d 后进行再矿化后釉质表面显微硬度值的测量. 用同样的方法分别测定 B 组 (正丁醇提取物牙膏), C 组 (水层提取物牙膏), D 组 (20 g/L NaF 牙膏), E 组 (空白牙膏), 各组均模拟再矿化处理程序<sup>[10]</sup>.

## 1.8 统计学分析

采用 SPSS 统计软件对数据 ( $\bar{x} \pm s$ ) 进行方差分析, 两两比较用 LSD-t 检验, 检验水准  $\alpha = 0.05$ .

## 2 结果

### 2.1 抑制釉质脱矿实验的结果

分别取各组牙膏液 3.00 mL, 用绘制标准曲线的方法测定 2 次酸蚀缓冲溶液中的磷含量, 计算磷浓度降低率 (ESR):

$$ESR = \frac{C1 - C2}{C1}$$

用方差分析对数据进行分析处理, 所得数据用 (s) 表示, 结果见表 1.

结果表明: 将乙酸乙酯组、正丁醇组、水层组、NaF 组的 ESR 与空白组比较有统计学意义 ( $P < 0.001$ ); 将乙酸乙酯组、正丁醇组、水层组与 NaF 组比较也有统计学意义 ( $P < 0.001$ ); 将乙酸乙酯组、正丁醇组、水层组组间比较 ( $P > 0.05$ ), 无统计学意义. 说明这 3 种牙膏液都有抑制牙釉

质脱矿作用,但三者抑制牙釉质脱矿的作用没有显著性差异,并且作用都小于 NaF 牙膏。

## 2.2 促进釉质再矿化实验的结果

所测数据用  $(\bar{x} \pm s)$  表示,见表 2。釉质脱矿标本经正丁醇组牙膏、水层组牙膏、20 g/L NaF 牙膏处理后,各组釉质硬度值均较基线值明显增高 ( $P < 0.01$ );而乙酸乙酯组牙膏和空白组牙膏再矿化前后的釉质硬度值无统计学差异 ( $P > 0.05$ ),说明正丁醇组牙膏、水层组牙膏和 20 g/L NaF 牙膏对脱矿牛切牙都具有再矿化的能力;用 LSD 法进行再矿化后组间比较,结果显示:正丁醇组和水层组对脱矿牛切牙均有显著的促进再矿化作用且无统计学意义,但作用不及 NaF (20 g/L) 组;乙酸乙酯组对脱矿牛切牙再矿化作用无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

表 1 牙釉质磷浓度降低率 (ESR)  $(\bar{x} \pm s)$

Tab. 1 The decrease rate of Enamel phosphorus concentration (ESR)  $(\bar{x} \pm s)$

组别	C1(mmol/L)	C2(mmol/L)	ESR
乙酸乙酯组	0.159 ± 0.002	0.103 ± 0.001	0.352 ± 0.012**
正丁醇组	0.161 ± 0.003	0.130 ± 0.003	0.192 ± 0.024**
水层组	0.161 ± 0.002	0.151 ± 0.002	0.062 ± 0.001**
NaF 组	0.163 ± 0.001	0.081 ± 0.002	0.503 ± 0.006**
空白组	0.161 ± 0.001	0.164 ± 0.003	-0.019 ± 0.003

注: C1 为牙膏浆处理前磷溶出值, C2 为牙膏浆处理后磷溶出值,与空白组比较, \*\* $P < 0.01$ 。

表 2 各组再矿化前后牙釉质显微硬度平均值  
[ $n = 3, (\bar{x} \pm s)$ ]

Tab. 2 The average hardness of enamel before and after remineralization in each group [ $n = 3, (\bar{x} \pm s)$ ]

组别	脱矿后 (kg/mm <sup>2</sup> )	再矿化后 (kg/mm <sup>2</sup> )
乙酸乙酯组	302.1 ± 8.3	347.6 ± 18.6**
正丁醇组	288.3 ± 8.7	387.6 ± 22.0*
水层组	286.5 ± 9.1	359.1 ± 5.9*
NaF 组	301.5 ± 16.7	422.3 ± 23.1*
空白组	300.5 ± 15.8	303.6 ± 11.5**

与脱矿后比较, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ 。

## 3 讨论

抑制牙釉质脱矿实验结果表明紫地榆不同溶剂提取物的牙膏均有抑制牙釉质磷溶出的作用,说明在牙釉质的脱矿与再矿化的动态平衡中,具

有抑制脱矿的作用。在促进釉质再矿化实验中,先将完整的牛切牙釉质脱矿形成早期人工龋,再用紫地榆不同溶剂提取物的牙膏模拟再矿化处理程序涂抹脱矿后的人工龋样本,实验表明正丁醇组牙膏和水层组牙膏对脱矿牛切牙均有显著的促进再矿化作用,但作用不及 NaF (20 g/L) 牙膏组。

分析乙酸乙酯组未能促进再矿化的原因可能是:(1)紫地榆防龋的活性成分是多羟基类物质,极性较大,乙酸乙酯的极性不及正丁醇和水,所以提取的活性物质少;(2)在模拟再矿化处理程序时,人工涂抹牙膏浆和再矿化液不均匀,导致活性成分不能与胶原蛋白和钙离子充分结合。另外,龋损的形状,矿物质的分布情况也可能会影响其测试值<sup>[4]</sup>。

前期实验已经证实天然药物紫地榆具有抑制脱矿和促进再矿化的作用,现将紫地榆不同溶剂提取物添加到牙膏中,观察紫地榆牙膏对牙釉质脱矿和再矿化的影响,对开发紫地榆牙膏具有一定的指导意义。

## [参考文献]

- [1] 刘娟,王良信. 老鹤草的本草考证[J]. 中草药, 1992, 23(5): 276 - 278.
- [2] 蓝海,李龙星,杨永寿. 隔山消有效成分的研究[J]. 大理医学院学报, 2001, 10(4): 13 - 14.
- [3] 蓝海,罗常辉. 隔山消和五倍子水体物对牛切牙脱矿与再矿化动力学研究[J]. 中成药, 2011, 33(4): 692 - 694.
- [4] 万近福,李学芳,王丽,等. 紫地榆的生药鉴定[J]. 中药材, 2008, 31(4): 496 - 497.
- [5] 陈菲菲,汪大照,张向宇,等. 五倍子牙膏对釉质矿化作用的影响[J]. 口腔医学研究, 2011, 27(4): 269 - 271.
- [6] 申禹,李玲. 钼酸铵分光光度法测定磷浓度实验方法的改进[J]. 实验技术与管理, 2013, 30(1): 56 - 59.
- [7] 李春莉,王莎莉,王亚平,等. 紫外分光光度法测定青蒿素的含量[J]. 重庆医科大学学报, 2007, 32(4): 413 - 415.
- [8] 黄心丹. 钼酸铵分光光度法测定水中总磷质量控制指标研究[J]. 企业技术开发, 2012, 31(1): 175 - 176.
- [9] 蓝海,杨颖,杨晓莉,等. 隔山消水提取物对再矿化及抗酸脱矿作用的体外研究[J]. 中国现代医学杂志, 2008, 18(24): 3 639 - 3 641.
- [10] 李安泽,陈常兴,朱惠学,等. 复方鞣酸液对离体牙石溶解性的研究[J]. 临沂医学专科学校学报, 2003, 25(2): 81 - 83.
- [11] 陈俊霞,李奇贤,赵鹏,等. 含氟牙膏对脱矿恒牙釉质再矿化作用的体外研究[J]. 大理学院学报, 2011, 10(8): 7 - 9.

(2014 - 06 - 19 收稿)