

國立臺灣大學牙醫專業學院臨床牙醫學研究所

碩士論文

Graduate Institute of Clinical Dentistry

School of Dentistry

National Taiwan University

Master Thesis



鈣離子濃度梯度對於牙釉質酸蝕之影響：體外實驗

Effect of Concentration Gradient of Calcium Ion

on Enamel Erosion :

An in vitro Study

余思嫻

Szu-Hsien Yu

指導教授：林俊彬 博士

Advisor : Chun-Pin Lin, Ph.D.

中華民國一百零四年六月

June 2015

國立臺灣大學碩士學位論文
口試委員會審定書



鈣離子濃度梯度對於牙釉質酸蝕之影響：

體外實驗

Effect of Concentration Gradient of Calcium Ion
on Enamel Erosion :

An in-vitro Study

本論文係余思嫻君 (R01422027) 在國立臺灣大學臨床牙醫學研究所完成之碩士學位論文，於民國 104 年 06 月 07 日承下列考試委員審查通過及口試及格，特此證明

口試委員： 林俊彬 (指導教授)
(簽名)

郭敏光

柯弘平

王國禎

臨床牙醫學研究所 所長

柯弘平

(簽名)

中文摘要



目的：牙齒酸蝕問題隨盛行率上升日益受到重視，過去文獻指出在軟性飲料中添加鈣離子能有效降低其酸蝕潛能。本實驗目的在於以體外實驗探討不同酸度下鈣離子濃度梯度對於降低牙釉質酸蝕程度的影響。

材料與方法：使用鹽酸當作酸性來源，並以氫氧化鈉滴定成 pH 2.5、pH 3、pH 5.5 三種酸度，分別調配成鈣離子濃度為 1 M、0.1 M、 10^{-2} M、 10^{-3} M、 10^{-4} M、 10^{-5} M、 10^{-6} M 等七種濃度的含鈣溶液，與一組不含鈣者當成實驗對照組，總共 24 組，共使用 72 片人類牙釉質樣本。樣本浸泡溶液 3 分鐘後，以感應耦合電漿質譜儀分析溶液內磷離子含量、以維氏微小硬度計測量樣本表面硬度變化、使用雷射掃描共軛焦顯微鏡以及電子掃描顯微鏡觀察表面影像。

結果：在 pH 3 以及 pH 5.5 下鈣離子濃度 1 M 的組別，溶液中沒有檢出磷析出。在各組 pH 值下，添加鈣離子能有效降低牙釉質表面硬度下降量。pH 2.5 下鈣離子濃度為 10^{-5} M 與 10^{-6} M 組可觀察到實驗區與對照區明顯高度落差。

結論：在酸性溶液中添加一定濃度的鈣離子，能有效降低酸性環境對牙釉質所造成的影響。隨著 pH 值下降，要達到有效降低酸蝕影響，需添加更高濃度的鈣離子。溶液 pH 值大於 3，添加鈣離子濃度 1 M 時，在溶液中無法測得磷元素。pH 5.5 以下的溶液，鈣離子含量小於 1 M 的各組，皆會使牙釉質表面硬度下降。檢出磷離子析出、表面硬度下降、表面粗糙度改變，三者不一定會同時發生，三者關係需進一步實驗釐清。

關鍵詞： 牙齒酸蝕、鈣離子、濃度梯度、牙釉質、感應耦合電漿質譜儀

Abstract



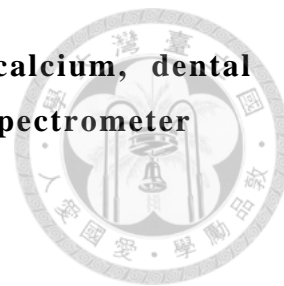
Objectives: With the rising prevalence, dental erosion gradually becomes seriously taken. The aim of this study was to evaluate the effect of concentration gradient of calcium ion on dental erosion in vitro.

Materials and methods: HCl was chosen as acid source in the present study. The pH value was adjusted by NaOH to pH values of 2.5, 3 and 5.5. Calcium chloride dehydrate was added to the former solutions to achieve a calcium concentration of 1 M, 0.1 M, 0.01 M, 10^{-3} M, 10^{-4} M, 10^{-5} M, 10^{-6} M and 0 M. Seventy two enamel discs made of human extracted teeth were divided into 24 groups. Each enamel samples was then exposed to 30 ml of the appropriate solution for 3 minutes individually. After the exposure, the solution was tested by ICP-MS to detect the concentration of phosphorus and the samples were rinsed in gently running distilled water for 30 seconds. The samples were then analyzed of surface hardness change and surface structure by confocal laser scanning microscope, Vickers' hardness tester and electronic scanning microscope.

Results: At pH 3 and pH 5.5, the addition of 1 M calcium resulted in no detection of phosphorus in the solution. At each of the pH values, the addition of calcium ion significantly decreased the amount of surface hardness loss. At pH 2.5, with 10^{-5} M and 10^{-6} M calcium, there was a significant difference between eroded area and the control area.

Conclusion: By adding a particular amount of calcium to acid, the acid showed less effect on enamel samples. With a pH value lower than 5.5, surface hardness loss would take place in spite of adding high concentration (1 M) of calcium.

Keyword: dental erosion, concentration gradient, calcium, dental enamel, inductively coupled plasma mass spectrometer



目錄



口試委員會審定書.....	i
中文摘要.....	ii
Abstract.....	iii
第一章：文獻回顧.....	1
1.1 牙釉質.....	1
1.1.1 組成.....	1
1.1.2 結構.....	2
1.1.3 性質.....	2
1.2 牙齒酸蝕.....	3
1.2.1 定義.....	4
1.2.2 成因.....	4
1.2.3 臨床診斷.....	5
1.2.4 預防方法.....	6
1.3 牙釉質酸蝕.....	7
1.3.1 酸蝕過程.....	7
1.3.2 臨界 pH 值.....	8
1.3.3 影響因素.....	8
第二章：研究目的.....	9
第三章：實驗材料與方法.....	10
3.1 牙齒樣本.....	10
3.1.1 樣本來源.....	10
3.1.2 樣本製備.....	10
3.1.3 樣本分組.....	11
3.2 實驗溶液.....	11



3.3 實驗步驟.....	12
3.4 雷射掃描共軛焦顯微鏡.....	13
3.4.1 原理	13
3.4.2 實驗步驟.....	13
3.4.3 分析步驟.....	14
3.5 維氏微小硬度計.....	15
3.5.1 原理	15
3.5.2 測量步驟.....	15
3.6 感應耦合電漿質譜儀.....	16
3.6.1 實驗步驟.....	16
3.7 掃描式電子顯微鏡.....	17
3.7.1 操作條件	17
3.7.2 實驗步驟.....	17
第四章：實驗結果.....	18
4.1 牙釉質析出磷離子濃度.....	18
4.2 牙釉質初始表面硬度.....	20
4.3 牙釉質表面硬度之變化.....	20
4.4 雷射掃描共軛焦顯微鏡影像.....	22
4.4.1 pH 5.5	22
4.4.2 pH 3	23
4.4.2 pH 2.5	23
4.5 雷射掃描共軛焦顯微鏡影像表面輪廓分析	24
4.6 電子掃描顯微鏡之影像.....	24
第五章：討論.....	25
5.1 研究方法.....	25
5.1.1 酸性溶液種類.....	25

5.1.2 酸性溶液 pH 值	26
5.1.2 酸性溶液作用時間	26
5.1.3 酸蝕程度評估方法	27
5.2 鈣離子對於降低牙釉質酸蝕程度的效果	29
5.3 體外實驗與體內實驗差異	29
第六章：結論	31
第七章：未來研究努力方向	32
第八章：圖次	33
第九章：表次	49
參考文獻	52



圖目錄



圖 3-1 : 真空包埋機.....	33
圖 3-2 : 鋸片機.....	33
圖 3-3 : 硬組織研磨機.....	34
圖 3-4 : 超音波震盪器.....	34
圖 3-5 : 牙釉質樣本製備各階段彩圖.....	35
圖 3-6 : 牙釉質樣本分組收納情形.....	35
圖 3-7 : pH 計主機及測量電極.....	36
圖 3-8 : 雷射掃描共軛焦顯微鏡.....	36
圖 3-9 : 維氏微小硬度計.....	37
圖 3-10 : 感應耦合電漿質譜儀.....	37
圖 4-1 : 不同酸度下, 添加鈣離子濃度取對數後, 各組牙釉質樣本所析出的磷離子濃度 (ppb).....	39
圖 4-2 : 不同酸度下, 添加不同鈣離子濃度, 各組牙釉質樣本表面硬度下降百分比 (%).....	40
圖 4-3 : pH5.5 不同鈣離子濃度組 1000 倍下雷射共軛焦顯微鏡影像與 3D 圖。.....	41
圖 4-4 : pH3 不同鈣離子濃度組 1000 倍下雷射共軛焦顯微鏡影像與 3D 圖.....	42
圖 4-5 : pH2.5 不同鈣離子濃度組 1000 倍下雷射共軛焦顯微鏡影像與 3D 圖.....	43
圖 4-6 : pH5.5 不同鈣離子濃度組 1000 倍下雷射共軛焦顯微鏡影像之輪廓分析.....	44
圖 4-7 : pH3 不同鈣離子濃度組 1000 倍下雷射共軛焦顯微鏡影像之輪廓分析.....	45

圖 4-8：pH 2.5 不同鈣離子濃度組 1000 倍下雷射共軛焦顯微鏡影像之輪廓分析	46
圖 4-9：pH3 鈣離子濃度 10^{-5} M 組 3000 倍下雷射共軛焦顯微鏡影像	47
圖 4-10：pH2.5 鈣離子濃度 10^{-6} M 組 3000 倍下雷射共軛焦顯微鏡影像	47
圖 4-11：pH 2.5 鈣離子濃度 10^{-6} M 組牙釉質樣本縱切面放大 600 倍下電子掃描顯微影像	48
圖 4-12：pH 2.5 鈣離子濃度 10^{-6} M 組牙釉質樣本縱切面放大 1000 倍下電子掃描顯微影像。A：實驗區。B：對照區	48

表目錄

表 4-1：pH5.5 下牙釉質樣本各組所析出磷離子濃度 (P) 之平均值 (mean) 與標準差 (SD)	49
表 4-2：pH3 下牙釉質樣本各組所析出磷離子濃度(P)之平均值(mean) 與標準差 (SD)	49
表 4-3：pH2.5 下牙釉質樣本各組所析出磷離子濃度 (P) 之平均值 (mean) 與標準差 (SD)	50
表 4-4：pH5.5 下牙釉質樣本各組表面硬度下降百分比 (Hard) 之平均值 (mean) 與標準差 (SD)	50
表 4-5：pH3 下牙釉質樣本各組表面硬度下降百分比 (Hard) 之平均值 (mean) 與標準差 (SD)	51
表 4-6：pH2.5 下牙釉質樣本各組表面硬度下降百分比 (Hard) 之平均值 (mean) 與標準差 (SD)	51



第一章：文獻回顧



1.1 牙釉質

牙齒之牙冠結構由外而內分為三層，分別是牙釉質(enamel)、牙本質(dentin)與牙髓腔(pulp chamber)。最外層的牙釉質最硬，需承受咬合時的壓力與磨耗；第二層的牙本質，質地較牙釉質軟許多且有彈性，可作為牙齒受力時的緩衝亦為牙齒知覺的通路；牙冠最內層為一空腔，內充填神經與血管等軟組織稱為牙髓。

1.1.1 組成

牙釉質由重量百分比約95~96%的無機質與4~5%的有機質與水組成，係人體礦化程度最高的組織^{1,2}。

牙釉質中無機質的主要組成為六角形的磷灰石晶體，其化學通式為 $A_5(XO_4)_3Z$ ，其中隨著牙釉質生成過程中出現離子不同，A可能為鈣離子(Ca^{2+})、鉛離子(Pb^{2+})、鋇離子(Sr^{2+})等；X可能為磷離子(P^{5+})、矽離子(Si^{4+})等；Z可能為氟離子(F^-)、氯離子(Cl^-)、氫氧基離子(OH^-)、碳酸根離子(CO_3^{2-})等，不同元素組成的晶體具有不同的硬度以及溶解度，進而影響牙釉質性質^{1,3,4}。牙釉質中的磷灰石晶體主要為氫氧磷灰石(hydroxyapatite, $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$)，此外，牙釉質中約含有重量百分比3%的碳酸根離子，相較於組成中除了鈣離子、磷酸根離子與氫氧基的其他參雜元素，係影響牙釉質溶解度與硬度之主因^{5,6}。



1.1.2 結構


牙釉質的基本組成為直徑約 3 至 6 μm 的稜柱或稱牙釉柱 (prism, enamel rod) 以及柱間物 (interrod、inter-prismatic substance)，稜柱與柱間物皆由寬度約為 50 至 70 nm，厚度約為 20 至 25 nm⁷，拉長的磷灰石晶體排列互相堆疊成。稜柱近似於圓柱形，稜柱內晶體走向與稜柱走向平行並垂直於牙齒表面；稜柱與稜柱間，大約占稜柱外圍四分之三的区域，晶體排列走向為向齒頸部方向延伸，與稜柱內晶體排列方向明顯不同，稱之為柱間物；稜柱與柱間物之間隔著一層較薄，含蛋白質的膜鞘 (rod sheath)；稜柱周圍有一個區域沒有膜鞘包覆，此區域內稜柱和柱間物的晶體交錯排列，無法明確區隔稜柱和柱間物。此種特殊構造，使牙釉質的橫切面外觀有如鑰匙孔洞 (key-hole) 般排列^{2,7,8}。

於牙齒頰面與舌面靠近齒頸部處的牙釉質表面偶爾可見一些與牙釉質—牙骨質交界平行的線，線與線互相平行，間隔約 30 到 100 μm ，呈現波浪狀的牙釉質橫紋 (Perikymata)，是瑞氏增生線 (Striae of Retzius) 於牙釉質表面的表現⁹。

1.1.3 性質

牙釉質硬而脆，是人體最硬的組織。牙釉質的硬度隨著個體差異 (如年紀、健康狀況、齒質組成)、牙齒內的位置 (頰側、舌側、咬頭、齒頸部、內層、外層等) 以及量測方法而有所差異^{8,10-12}。文獻中測量到的硬度從 270 到 430 KHN 或 250 到 430 VHN，標準差在 20 到 60 之間，存在很大的變異^{11,13-15}。KHN 為努氏硬度值 (Knoop Hardness Number)，VHN 為維氏硬度值 (Vickers Hardness Number)，兩者大小大致相等¹⁶。由牙釉質表面到牙釉質—牙本質交界處，牙釉質硬度逐漸降低^{11,13,16,17}；牙釉質表面以下約 100 μm 深度內的牙釉質硬度受年紀影響達顯著差異，年紀越大硬度越高，越往牙釉質—牙本質交界處則無此特性¹⁸。頰側面牙釉質表面硬度較舌側面牙釉質表面硬度高，功能性咬頭的牙釉質表面硬度較非功能性咬頭牙釉質表面硬度高，頰側面牙釉質硬度變化較舌側面牙釉質硬度小¹⁹。

1.2 牙齒酸蝕



牙齒酸蝕問題存在已久，最早相關文獻可追溯至 1892 年²⁰。近年來隨著盛行率上升，相關問題日漸受到重視⁷，相關研究也蓬勃發展。根據 Jaeggi 等人在 2006 年所發表文獻，回顧 1994 年至 2005 年間不同國家所發表牙齒酸蝕的盛行率在學齡前兒童約有 6 % 至 50 %；在 5 歲至 9 歲的兒童中，有 14% 已能觀察到恆齒有酸蝕跡象；在青少年中，受測者中約有 11 % 至 100 % 牙齒有酸蝕跡象；在成年人中盛行率約為 4 % 至 82 %²¹。2012 年 Mantonanaki 等學者調查希臘 605 位 5 歲兒童發現至少有一顆牙齒有酸蝕跡象的比率高達 78.8 %²²。2013 年巴西的研究發現 6 歲受測兒童中有 58.3 % 有牙齒受到酸蝕的跡象²³。學者於 2014 年觀察挪威 796 位 16 歲至 18 歲青少年，有牙齒酸蝕者占 59 %²⁴。2014 年日本學者在 116 位 2 歲到 6 歲的兒童中觀察到牙齒有酸蝕跡象者比率高達 86 %²⁵。同屬亞洲的香港，在 2014 年研究中，在 704 位 12 歲孩童中觀察到有牙齒酸蝕問題的比率達 75 %²⁶。以上研究皆提到牙齒酸蝕與飲食中的酸，例如酸的水果、軟性飲料的關係，更進一步推估牙齒酸蝕的高盛行率，恐與近年來逐年成長的軟性飲料消費相關²⁴⁻²⁶。根據 Cavadini 等人在 2000 年發表的文獻中指出，美國從 1965 年至 1996 年，30 年間對於軟性飲料的消費量成長迅速，軟性飲料的銷售量成長 3 倍，在 1995 年超過一半以上的美國學童每天至少消費一份軟性飲料，其中有 20% 的學童每天至少消費四份以上的軟性飲料²⁷；調查發現加拿大從 1988 年到 1998 年間軟性飲料消費量增加了 20.3%²⁸；德國的調查中則指出從 1991 年到 2001 年間，德國人在軟性飲料的消費量增加了 18.9%²⁹。

牙齒酸蝕除了造成牙齒的外型改變、影響美觀、牙齒齒質流失、牙齒強度下降，也使齒質更容易被機械力移除，例如刷牙、磨牙、咬耗等，造成不可回復的齒質喪失，情況嚴重甚至會造成牙本質暴露，形成敏感性牙齒³⁰。

綜觀以上文獻，隨著飲食習慣改變，早期檢測牙齒酸蝕以及早期預防越發受重視。



1.2.1 定義

牙齒酸蝕的定義為牙齒硬組織與酸性物質接觸所造成的不可逆的化學性破壞，且此過程中不涉及微生物的影響與作用。在牙齒冠部，牙釉質與牙本質皆有可能受到酸蝕而影響結構、組成與性質^{7,31}。

1.2.2 成因

牙齒與酸性物質接觸引起的化學性變化係牙齒酸蝕的成因，依照酸性物質來源可分為內因性與外因性。

內因性主要來源是胃酸，胃食道逆流症候群、飲食障礙、疾病症狀為容易反覆嘔吐的患者胃酸或是酸性食團湧入口腔，使口腔內環境pH值下降，造成牙齒酸蝕，好發的酸蝕部位在前牙的舌側面³²⁻³⁴。

外因性主要來源為飲食中的酸，最常見的為柑橘類等酸性水果以及軟性飲料。軟性飲料係指酒精所占體積百分比低於0.5%，不含乳製品、茶、咖啡等飲料，常見的軟性飲料包含果汁、碳酸飲料、運動飲料，常以冰涼狀態儲存飲用。軟性飲料pH偏低，碳酸飲料的pH值最低可到pH 2.4左右，大多在3以下；運動飲料pH值大約為3；檸檬汁與柳橙汁的pH值也大概在3左右，葡萄汁的pH值較高，大約在3.5-4左右³³⁻³⁵，低於牙釉質酸蝕的臨界pH值，pH 5.5。此外，在品酒師口中也常發現嚴重的牙齒酸蝕狀況，紅酒與白酒的pH值大約在3左右^{31,36}。造成酸蝕的外因性來源除了飲食外，環境中酸性物質也可能造成牙齒酸蝕，例如電鍍工廠或是化學工廠所產生的酸性氣體或懸浮物質被吸入體內³⁷，或是泳池的氯氣³⁸等。

1.2.3 臨床診斷

現今牙科常規照護中，仍缺乏能有效監控牙齒酸蝕情況以及進程的診斷工具，只能靠臨床表徵判定⁷，但牙齒受酸蝕影響的初期，並無明顯之臨床表徵，診斷不易，因此常造成持續性破壞到明顯齒質結構破壞及改變後才確診，但此時常常已經造成無可回復性的齒質破壞甚至需後續復形。牙齒酸蝕最初期的臨床表徵有：光滑、如同絲綢般有光澤的瑤瑤質表面、以及在齒頸部釉面橫紋消失等；隨著病程進行有可能出現咬頭變的比較光滑，甚至因為齒質流失，使補綴物高於臨近的牙齒；在一些嚴重的案例中，牙釉質喪失後，牙本質外露，進一步造成牙齒敏感的問題^{7,29}。

近年來學者致力於設計能藉由觀察牙齒酸蝕早期變化如：軟化、微觀結構改變等特徵，以達到早期診斷牙齒酸蝕並早期介入預防的儀器³⁹⁻⁴¹，但可惜皆未達到可以供臨床使用的成果。因此，現階段著重在如何降低牙齒在酸性環境中所受到的影響⁴²。



1.2.4 預防方法

預防牙齒酸蝕可從兩方面著手，一是降低牙齒暴露在酸性環境的機會，或是降低酸性環境的酸蝕潛力，另一方面是增加牙齒對抗酸蝕的能力或使脫礦化的組織可以再礦化以避免進一步的損壞等。

降低牙齒暴露在酸性環境的機會，可藉由詳細病史詢問、飲食諮詢與職場環境調查等，找出造成酸蝕的可能因素並改善，例如治療腸胃疾病，改善胃酸逆流情形或治療造成持續嘔吐的病因^{33,35}；改以吸管代替以杯子飲用軟性飲料⁷。

在降低酸性物質之酸蝕潛力方面，在使用氯氣消毒的泳池中添加氫氧磷灰石，增加離子活度積（ion activity product），使泳池環境相較於口腔環境趨近於飽和溶液，減少酸蝕發生³⁸；此外 Scaramucci T.等學者在 2011 年發表的一個原位實驗也顯示在柳橙汁內添加鈣離子能降低其對牙釉質樣本之酸蝕潛力⁴³。

增加牙齒對抗酸蝕能力方面，近年來有許多學者將牙齒以不同物質處理過後，使牙齒在酸性環境下的溶解度下降、抑制酸蝕作用，減少齒質流失，例如使用氟化物⁴⁴、兒茶素⁴⁵、木糖醇⁴⁶等。

目前尚未有簡單且具效益的預防酸蝕的方法，學者仍致力從上述方法中找出最可行又有用的方法。



1.3 牙釉質酸蝕

1.3.1 酸蝕過程

以牙釉質中最主要的組成，氫氧磷灰石來看，得到以下反應式：



溶液中酸性時，有多的氫離子會和磷酸根離子鍵結，也會與氫氧基鍵結，使兩者濃度下降，根據勒沙特略原理，反應會向右，更多氫氧磷灰石溶解，直至反應到達平衡。

巨觀來看，牙釉質的酸蝕過程一開始為表面部分礦物質流失，造成表面粗糙度上升，表面硬度下降⁴⁷⁻⁴⁹；持續酸蝕的狀況下，較多表面礦物質流失，但表面仍保持只有部分去礦化，牙釉質蜂巢狀的酸蝕表面可能會在此階段觀察到，此時縱切面可能可以在表面看到一層薄且鬆散的結構^{50,51}，以上階段仍屬於可逆反應，若有適當環境，則可進行再礦化反應，在 SEM 下可觀察到少量晶體結晶，但是卻無法回到未酸蝕前的硬度⁵²也無法使酸蝕的表面恢復原先的平順⁵³。再持續酸蝕，可能使牙釉質片狀剝落，造成不可逆的齒質流失；且在剝落後的牙釉質上，仍可發現一層已經軟化結構改變的牙釉質。

酸蝕後的牙釉質表面分為三種型態。第一型中，酸溶解牙釉柱多於溶解柱間質，牙釉柱結構流失較柱間質多，故表面呈現蜂巢狀；第二型中則反之，柱間質結構流失較牙釉柱多，表面呈現牙釉柱凸起而柱間質卻較低下的型態；第三型則是能在表面同時觀察到第一型與第二型。造成此種差異的原因目前仍有爭議，最被廣為接受的因素為晶體走向的不同所造成的差異。晶體走向與待酸蝕的牙釉質表面垂直者最容易被酸蝕，平行者則最不易被酸蝕。因此被酸蝕的牙釉質表面位置不同或是牙釉質被切削的角度不同，都可能是造成酸蝕型態不同的原因。



1.3.2 臨界pH值

臨界 pH 值係指溶液中離子濃度恰巧到達飽和時的 pH 值，也就是溶液中離子活度積恰巧等於化合物的溶解度積常數 (K_{sp}) 時，溶液的 pH 值。溶解度常積會隨著溫度有所改變，但對於牙釉質的溶解度常積，因為溫度不同而造成的差異很小，甚至在實驗中可以忽略⁵⁴。牙釉質在口腔環境或是在實驗環境中的臨界 pH 值除了受到環境中鈣離子濃度以及磷酸根離子濃度的影響外，也受到個體的牙釉質組成不同而有個體差異⁴⁸。因此臨界 pH 值是個範圍^{28,54,55}，根據文獻回顧，在口腔內與人工唾液中所得臨界 pH 值從 4.5 到 6.0 皆有⁵⁶。根據一項英國研究指出，口腔環境的臨界 pH 值在 5.7 到 6.3 之間⁵⁷；但是最常被提及的臨界 pH 值是 5.5⁵⁸。

1.3.3 影響因素

文獻指出酸性溶液對於牙釉質的酸蝕能力和酸的種類、pH 值、滴定酸度 (titratable acidity)、緩衝容量 (buffer capacity)、螯合能力 (chelating properties)、所含鈣、磷或氟離子含量、鈣磷比、以及作用環境的二氧化碳濃度有相關^{43,59}。碳酸、檸檬酸、磷酸除了因為 pH 值與濃度造成的酸蝕影響外，都會因為酸液的組成元素而對酸蝕效果有較大影響；乳酸、草酸與硫酸影響則較小⁵⁶。若酸液中有元素對於牙釉質的組成元素有螯合作用，也會使酸蝕作用有加成效果⁶⁰。根據一篇 2014 年發表的研究指出，相較於酸液本身 pH 值，酸蝕的效果與酸液的滴定濃度較為相關⁶¹。過去已有很多研究針對酸液中加入不同濃度比例的鈣離子與磷酸根離子，探討此兩種離子比例不同對於酸液酸蝕能力的影響^{28, 47, 54, 56, 60}，但磷酸根離子在不同 pH 值下可能會產生磷酸氫根或是磷酸二氫根，造成實驗測量上的困難，進一步造成誤差^{54,55}。

近年來許多研究著重於在柳橙汁或是檸檬酸中單純添加特定濃度以上的鈣離子，研究發現，單純添加鈣離子，對酸液的酸蝕潛力即有影響。

第二章：研究目的

由前一章節文獻回顧可知隨著飲食習慣改變，牙齒酸蝕問題日漸受到重視；軟性飲料中所含鈣離子濃度可能是影響牙齒在軟性飲料中受酸蝕程度的原因。本研究目的是在探討酸性溶液中不同濃度鈣離子對於降低牙釉質酸蝕程度的效果，以下列項目來作為評估的依據：（一）溶液中磷元素的量，（二）牙釉質表面之微硬度(microhardness)的改變等定量分析；（三）牙釉質表面粗糙度性質評估。藉由以上的測試來尋求臨床上對於牙齒酸蝕預防的可行模式。

。

第三章：實驗材料與方法



3.1 牙齒樣本


3.1.1 樣本來源

本實驗所採用牙齒樣本皆為台大醫院口腔顎面外科門診所拔除之人類恆牙第三大白齒。手術拔除前以書面及口頭告知捐贈者本實驗牙齒樣本使用與實驗目的，經捐贈者了解並同意後簽署臨床試驗受試者同意書，始得收集牙齒樣本。納入本實驗之牙齒條件：無任何齲齒病灶、拔除時未破壞牙齒本體。

3.1.2 樣本製備

所需器材：上述之牙齒樣本、牙科刮匙、牙科高速手機、鑽石鑽針、去離子水、環氧樹脂 (Epoxy resin, Epothin, Buehler Ltd., USA)、真空包埋機 (Cast N' Vac 1000, Buehler Ltd., USA) (圖 3-1)、鋸片機 (Saw Microtome Leica SP1600, USA) (圖 3-2)、硬組織研磨機 (NECAOIK O329 OEREm Oresu Corp., France) (圖 3-3)、砂紙 (800 grit、2500 grit、4000 grit)、超音波震盪器 (Elma transonic digital S, Germany) (圖3-4)、特氟龍膠帶。製備步驟如下：

1. 牙齒拔除後，以牙科刮匙刮除表面黏附軟組織，以2.5 %次氯酸鈉浸泡消毒一天後，以去離子水充分沖洗，並放入去離子水中保存。
2. 以牙科高速手機與鑽石鑽針將牙齒沿牙釉質—牙骨質交界處切割為牙冠部分及牙根部分，並以牙科刮匙刮除與蒸餾水沖洗去除牙髓腔內軟組織。
3. 取牙冠部分，以牙科高速手機與鑽石鑽針切下頰側面外側約2 mm厚度樣本，作為牙釉質樣本塊。
4. 將上述牙釉質樣本於真空包埋機內以環氧樹脂包埋成直徑25 mm，高25 mm圓柱形樣本 (圖 3-5)。

- 
5. 待24小時樹脂硬化後，使用鋸片機將包埋好的牙釉質樣本切成上下面平行，厚度為5 mm的大小
 6. 以硬組織研磨機依序以2500 grit、4000 grit砂紙研磨拋光上述牙釉質塊樣本，使樣本表面呈現平整鏡面狀，並曝露出一約為3 mm x 3 mm之樣本窗口，磨掉齒質厚度控制在150 μm 以內（圖 3-5）。
 7. 以筆刀於樣本窗口內刻劃十字定位點後，將樣本置入超音波震盪器震盪兩分鐘，並以去離子水沖洗樣本表面，表面稍作乾燥後以十字定位點為基準點，以特氟龍膠帶覆蓋樣本窗口半部作為實驗組，置入去離子水中備用（圖 3-5）。

3.1.3 樣本分組

本實驗共使用72片牙釉質樣本，使用亂數表將牙齒樣本依其產生的亂數大小排列，隨機各分為24組，每組各有3片牙釉質樣本。每片背面以奇異筆標記標號與組別，避免混淆。（圖 3-6）

3.2 實驗溶液

取去離子水、37% HCl 與 NaOH 粉末調配 0.01 M HCl 與 0.01 M NaOH，以 pH 計（MM-60R, TOA-DK, Japan）（圖 3-7）以及上述兩水溶液測量調配 pH 2.5、pH 3、pH 5.5 之酸性溶液；量取 CaCl_2 粉末加入上述酸液中，並以序列稀釋調製以上三種酸度下，鈣離子濃度分別為 1 M、 10^{-1} M、 10^{-2} M、 10^{-3} M、 10^{-4} M、 10^{-5} M、 10^{-6} M、0 M，共 24 組實驗溶液，各組別各調配三管 30 毫升的溶液。

3.3 實驗步驟

1. 觀察記錄樣本初始雷射共軛焦顯微鏡影像與 3D 重組影像、維氏硬度。
2. 上述牙釉質樣本分別在 37 °C 下浸泡上述實驗溶液 3 分鐘。
3. 以感應耦合電漿質譜分析儀測量上述實驗溶液所含磷元素濃度。
4. 以去離子水充分沖洗牙釉質樣本表面，置入去離子水中儲存。
5. 以十字定位點找尋雷射共軛焦顯微鏡下與起始影像之相同視野以及膠帶分隔區，拍攝顯微鏡影像與 3D 重組影像。
6. 於維氏微小硬度計的顯微鏡下，找到測量起始硬度之刻痕，量測此刻痕的近心-遠心處的硬度。
7. 以掃描式電子顯微鏡觀察牙釉質樣本表面變化。





3.4 雷射掃描共軛焦顯微鏡

本實驗使用雷射掃描共軛焦顯微鏡 (Keyence VK-9710 violet laser, Keyence Corp., Japan) (圖 3-8) 掃描觀察牙釉質樣本表面影像，分析其面積變化量、表面粗糙度變化與表面齒質喪失情形。

3.4.1 原理

本實驗所用雷射掃描共軛焦顯微鏡 (Laser Scanning Confocal Microscopy, LSCM) 為反射式光學顯微鏡，內建白色光源與紫光雷射光源 (波長480 nm)。共軛焦係指點光源發射探測光通過透鏡聚焦至焦點上的待測物，反射光會匯聚回光源處；共軛焦顯微鏡以半反半透鏡 (Dichroic mirror)，偏折反射光，於其焦點處放置一帶有針孔之擋板，經探測光焦點上的待測物反射的反射光匯聚回針孔，針孔後方的光度計測量反射光強度。透過控制焦點深度與高度限制，獲得特定深度下焦點內的影像，經逐點蒐集計算重組得具有高度景深之立體影像。成像快速、解析度高且立體，不須傷害樣本也無需前處理，用於分析樣本表面立體結構上為理想的檢測工具。

3.4.2 實驗步驟

1. 開啟顯微鏡觀察應用程式VK viewer，將載物台恢復至原點位置，將待測牙釉質樣本置於載物台上。
2. 由最低倍率物鏡 (10x) 開始觀察，以粗調節輪與細調節輪調整焦距至影像清晰，將樣本上以筆刀所刻製的十字定位點移至視野左上方定位，逐步換至高倍率物鏡 (150x物鏡，放大倍率為3000倍) 並重複調節焦距至清晰；於實驗區對照區使用50x物鏡，放大倍率為1000倍觀察。
3. 在雷射光源模式下，調整濾鏡 (Filter) 至30%及亮度 (Brightness)，降低雜訊以獲得適合的反射光強度。
4. 設定Z軸量測範圍，涵蓋樣本範圍上下界之外。
5. 開始掃描，靜待掃描完成後，儲存影像結果以待後續分析。

3.4.3 分析步驟

1. 開啟顯微鏡分析應用程式VK analyzer，載入實驗區對照區交界處影像檔案。
2. 校正樣本傾斜度 (Correct tilt)：選擇手動，以對照區為標準拉出校正線，校正。
3. 加入比例尺 (Scale)，儲存影像。
4. 選取3D模式 (3D display)，加入比例尺，調整倍率與角度並儲存。
5. 選取量測分析 (Measurement analysis) 中的輪廓 (Profile)，點選水平線，量測觀察實驗區與對照區的表面高低落差。



3.5 維氏微小硬度計

本實驗使用維氏微小硬度計（HMV-2 Microhardness tester, Shimadzu, Japan）（圖 3-9）測量牙釉質樣本表面微硬度。



3.5.1 原理

施力未達造成物體臨界形變之力前，施力大小與物體形變量有正相關。維氏微小硬度計以一交角為136度的正方錐刻印頭（indenter）以不同施力大小（F）與施壓時間於待測物上刻出一印痕，測量印痕兩對角線長度(d_1, d_2)，取平均值(d)，進而換算出維氏微小硬度值(Hmv)。

$$Hmv = \frac{2F \sin \frac{136^\circ}{2}}{d^2}$$

3.5.2 測量步驟

1. 將待測物至於載台，調節焦距至影像清晰，移動鏡頭至待測區域。
2. 設定條件為施力大小500 g、施壓時間10秒，分析軸向為兩個軸。
3. 點選開始測量，將鏡頭轉為刻印頭，進行施壓。刻印結束後轉回鏡頭觀測測量印痕大小，以獲得微小硬度值。
4. 每個牙釉質樣本量測三處硬度值後平均，獲得樣本的表面硬度。

3.6 感應耦合電漿質譜儀

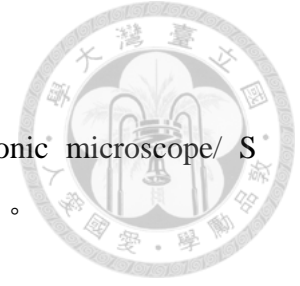
本實驗使用感應耦合電漿質譜儀 (Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometer, Agilent 7700x ICP-MS, Agilent Technologies Inc., America) (圖 3-10) 測量牙釉質樣本浸泡後實驗溶液中的磷離子濃度。以樣品導入系統汲取樣品，導入感應耦合電漿中，經氣化、原子化及離子化後產生單價離子，並藉由真空系統引入質譜系統進行分離與測定。對金屬元素及許多非金屬元素有極佳的偵測極限 (磷元素範圍在 2.5~4 ppm 以下)，質譜背景較其他原子光譜背景單純且容易解讀。

3.6.1 實驗步驟

1. 以質譜儀調校溶液(Mass spectrometer tuning solution)確認儀器達熱穩定狀態並進行解析度及質量校正(Mass calibration)。分析信號的解析度在 10 % 波峰高度時的寬度必須小於 0.9 amu，若質量校正結果與真實值差異超過 0.1 amu 以上時，則須進行質量校正。
2. 建立檢量線：去離子水配製序列濃度的磷標準液，其濃度設定為 0 ppb、50 ppb、100 ppb、150 ppb、200 ppb、300 ppb、400 ppb。以 ICP-MS 測量建立檢量線，其線性關係大於 0.995 才進行磷離子濃度分析。
3. 分析每個樣品前，先用洗滌空白溶液 (本實驗中使用去離子水) 沖洗系統30秒直到訊號降至最低。汲取樣品導入系統30秒，分析訊號穩定後，始收集數據。

3.7 掃描式電子顯微鏡

本實驗使用電子掃描顯微鏡 (Hitachi scanning electronic microscope/ S-2400) (圖 3-11) 觀察牙釉質樣本酸蝕後高倍率表面影像。



3.7.1 操作條件

4. 工作長度 (Working distance, Z axis) : 10-50 mm
5. 加速電壓 (Acceleration voltage) : 18 KV
6. 鏡徑 (Aperture) : 0.1 mm ; 掃描孔徑 (Spot size) : 7.5
7. 傾斜角度 (Tilting angle) : 0度

3.7.2 實驗步驟

1. 牙釉質樣本置於乾燥箱24小時乾燥後，垂直劈開，以導電膠袋黏著固定於載台，分別觀察縱切面與表面變化。
2. 使用覆膜機 (BIO-RED SC 502, Fisons plc Registered Office, England) (圖3-12) 進行金覆膜處理。
3. 先以低倍(60x)觀察樣本巨觀表面型態，在切換至較高倍率(1000x、3000x、5000x) 觀察微觀表面構造並截圖存檔。

第四章：實驗結果




4.1 牙釉質析出磷離子濃度

各組牙釉質樣本浸泡實驗溶液三分鐘後，使用感應耦合電漿質譜儀量測出的磷離子濃度如圖 4-1 所示：

隨著 pH 值下降，酸度上升，測得磷離子濃度增加；隨著鈣離子濃度上升，所測得磷離子濃度下降。pH 5.5 和 pH 3 在鈣離子濃度為 1 M 下，未檢出磷離子，測得磷離子濃度為 0 ppb；但 pH 2.5 下，鈣離子濃度為 1 M 時，檢出鈣離子析出量為 16.05 ± 18.02 ppb。pH 2.5 和 pH 3 鈣離子濃度對應所析出磷離子濃度作圖的圖形走勢類似，鈣離子濃度 0.1 M 與 1 M 相比，所析出磷離子濃度大量上升；鈣離子濃度 10^{-4} M 至 10^{-6} M 間，所析出磷離子濃度變化趨緩。

如表 4-1 所示，在 pH 5.5 下，鈣離子濃度 1 M 時，所測得磷離子濃度為 0.00 ± 0.00 ppb，和其他組別皆有達顯著差異；鈣離子濃度 0.1 M 時，所測得磷離子濃度為 30.94 ± 18.66 ppb，和其他組別皆有達顯著差異；鈣離子濃度 10^{-2} M 時，所測得磷離子濃度為 89.78 ± 13.34 ppb；鈣離子濃度 10^{-3} M 時，所測得磷離子濃度為 108.10 ± 12.96 ppb；鈣離子濃度 10^{-4} M 時，所測得磷離子濃度為 115.69 ± 12.44 ppb；鈣離子濃度 10^{-4} M 和 10^{-3} M、 10^{-2} M 三組間所析出磷離子濃度無顯著差異；鈣離子濃度 10^{-5} M 時，所測得磷離子濃度為 151.30 ± 11.58 ppb，和鈣離子濃度 10^{-4} M 組別無顯著差異，但與鈣離子濃度 10^{-3} M 和 10^{-2} M 的組別有顯著差異；鈣離子濃度 10^{-6} M，所測得磷離子濃度為 176.21 ± 13.39 ppb，除了與鈣離子濃度 10^{-5} M 組無顯著差異外，和其他鈣離子濃度之組別皆有顯著差異。



如表 4-2 所示，在 pH 3.0 下，鈣離子濃度 1 M 時，所測得磷離子濃度為 0.00 ± 0.00 ppb，和其他組別皆有達顯著差異；鈣離子濃度 0.1 M 時，所測得磷離子濃度為 106.03 ± 13.42 ppb，和鈣離子濃度 10^{-2} M 的組別所析出磷離子濃度沒有顯著差異，但與其他各組皆有達顯著差異；鈣離子濃度 10^{-2} M 時，所測得磷離子濃度為 129.62 ± 10.77 ppb，和鈣離子濃度為 10^{-3} M 和 0.1 M 的組別所析出磷離子濃度沒有顯著差異，但與其他各組皆有達顯著差異；鈣離子濃度 10^{-3} M 時，所測得磷離子濃度為 187.86 ± 42.61 ppb，除了與鈣離子濃度 10^{-2} M 和 10^{-4} M 組無顯著差異外，和其他組別皆有顯著差異；鈣離子濃度 10^{-4} M 時，所測得磷離子濃度為 241.55 ± 17.65 ppb，除了與鈣離子濃度 10^{-3} M、 10^{-5} M 和 10^{-6} M 組無顯著差異外，和其他組別皆有顯著差異；鈣離子濃度為 10^{-5} M 時，所測得磷離子濃度為 264.78 ± 19.38 ppb；鈣離子濃度為 10^{-6} M 時，所測得磷離子濃度為 284.25 ± 15.33 ppb，除了與鈣離子濃度 10^{-5} M 和 10^{-4} M 組無顯著差異外，和其他組別皆有顯著差異。

如表 4-3 所示，在 pH 2.5 下，鈣離子濃度 1 M 時，所測得磷離子濃度為 16.05 ± 18.02 ppb，和其他組別皆有達顯著差異；鈣離子濃度 0.1 M 時，所測得磷離子濃度為 169.04 ± 19.15 ppb，和鈣離子濃度為 10^{-2} M 的組別沒有顯著差異，但與其他各組皆有達顯著差異；鈣離子濃度 10^{-2} M 時，所測得磷離子濃度為 198.60 ± 23.44 ppb，和鈣離子濃度為 0.1 M、 10^{-3} M 和 10^{-4} M 的組別沒有顯著差異，但與其他各組皆有達顯著差異；鈣離子濃度 10^{-3} M 時，所測得磷離子濃度為 247.96 ± 30.74 ppb，和鈣離子濃度為 10^{-2} M 及小於等於 10^{-4} M 的組別所沒有顯著差異，但與其他各組皆有達顯著差異；鈣離子濃度 10^{-4} M 時，所測得磷離子濃度為 265.84 ± 24.85 ppb，和鈣離子濃度小於等於 10^{-2} M 的組別沒有顯著差異；鈣離子濃度 10^{-5} M 時，所測得磷離子濃度為 281.13 ± 17.71 ppb，和鈣離子濃度大於等於 10^{-2} M 的組別有顯著差異；鈣離子濃度 10^{-6} M 時，所測得磷離子濃度為 293.82 ± 22.76 ppb，和鈣離子濃度大於等於 10^{-2} M 的組別有顯著差異。

綜觀 4-1 至 4-3，在各組 pH 值下，鈣離子濃度 1 M 牙釉質所析出磷離子濃度與其他鈣離子濃度之組別皆有顯著差異。



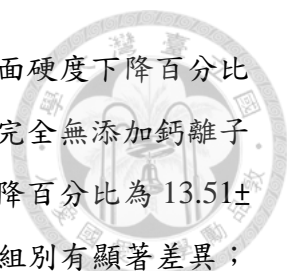
4.2 牙釉質初始表面硬度

本次實驗所用 72 片牙釉質樣本表面初始硬度平均值為 346.40 VHN，標準差為 12.45。各組間初始硬度並沒有顯著差異。

4.3 牙釉質表面硬度之變化

各組牙釉質樣本經酸蝕過後，與起始硬度相比，表面硬度皆有程度不等之下降（圖 4-2），隨著 pH 值下降，酸度上升，表面硬度下降百分比增加；隨著所添加鈣離子濃度上升，表面硬度下降百分比濃度下降。下降百分比從 4.1% 至 39.7% 不等。

如表 4-4 所示，在 pH 5.5 下，添加 1 M 的鈣離子時，有最低的表面硬度下降量，下降百分比為 $4.10 \pm 1.41\%$ ，和其他組別皆有達顯著差異；添加 0.1 M 的鈣離子時，表面硬度下降百分比為 $8.30 \pm 1.52\%$ ，和添加鈣離子濃度 1M 以及添加鈣離子濃度小於等於 10^{-5} M 的組別有顯著差異；添加 10^{-2} M 的鈣離子時，表面硬度下降百分比為 $9.87 \pm 1.70\%$ ；添加 10^{-3} M 的鈣離子時，表面硬度下降百分比為 $11.33 \pm 0.97\%$ ；添加 10^{-4} M 的鈣離子時，表面硬度下降百分比為 $12.49 \pm 0.39\%$ ；添加 10^{-5} M 的鈣離子時，表面硬度下降百分比為 $13.76 \pm 0.68\%$ ；添加 10^{-6} M 的鈣離子時，表面硬度下降百分比為 $14.10 \pm 0.71\%$ ；添加鈣離子濃度在 10^{-2} M 至 10^{-6} M 間的組別，之間無顯著差異，和添加鈣離子濃度 1 M 以及完全無添加鈣離子的組別有顯著差異；完全沒有添加鈣離子時，表面硬度下降百分比為 $16.39 \pm 1.29\%$ ，和添加鈣離子濃度大於等於 10^{-3} M 的組別有顯著差異。



如表 4-5 所示，pH 3.0 下，添加 1 M 鈣離子時，表面硬度下降百分比為 $12.87 \pm 0.79\%$ ，和添加鈣離子濃度小於等於 10^{-4} M 以及完全無添加鈣離子的組別有顯著差異；添加 0.1 M 的鈣離子時，表面硬度下降百分比為 $13.51 \pm 0.58\%$ ，和添加鈣離子濃度 10^{-6} M 以及完全無添加鈣離子的組別有顯著差異；添加 10^{-2} M 的鈣離子時，表面硬度下降百分比為 $14.24 \pm 0.92\%$ ，和添加鈣離子濃度 10^{-6} M 以及完全無添加鈣離子的組別有顯著差異；添加 10^{-3} M 的鈣離子時，表面硬度下降百分比為 $15.63 \pm 0.36\%$ ，和添加鈣離子濃度 10^{-6} M 以及完全無添加鈣離子的組別有顯著差異；添加 10^{-4} M 的鈣離子時，表面硬度下降百分比為 $16.78 \pm 0.79\%$ ，和添加鈣離子濃度 1 M 以及完全無添加鈣離子的組別有顯著差異；添加 10^{-5} M 的鈣離子時，表面硬度下降百分比為 $18.40 \pm 0.33\%$ ，和添加鈣離子濃度大於等於 10^{-2} M 以及完全無添加鈣離子的組別有顯著差異；添加 10^{-6} M 的鈣離子時，表面硬度下降百分比為 $19.85 \pm 0.95\%$ ，和添加鈣離子濃度大於等於 10^{-3} M 以及完全無添加鈣離子的組別有顯著差異；添加鈣離子濃度在 10^{-6} M 至 10^{-4} M 間的組別，之間無顯著差異；添加鈣離子濃度在 10^{-5} M 至 10^{-3} M 間的組別，之間無顯著差異；添加鈣離子濃度在 10^{-4} M 至 0.1 M 間的組別，之間無顯著差異；完全沒有添加鈣離子時，表面硬度下降百分比為 $27.54 \pm 1.58\%$ ，與有添加鈣離子的各組均有顯著差異。

如表 4-6 所示，pH 2.5 下，添加 1 M 鈣離子時，表面硬度下降百分比為 $14.21 \pm 0.87\%$ ；添加 0.1 M 的鈣離子時，表面硬度下降百分比為 $15.18 \pm 1.15\%$ ；添加 10^{-2} M 的鈣離子時，表面硬度下降百分比為 $15.90 \pm 1.15\%$ ；添加 10^{-3} M 的鈣離子時，表面硬度下降百分比為 $17.94 \pm 0.99\%$ ；添加 10^{-4} M 的鈣離子時，表面硬度下降百分比為 $19.26 \pm 1.14\%$ ；添加鈣離子濃度在 10^{-4} M 至 1 M 間的組別，之間無顯著差異；添加 10^{-5} M 的鈣離子時，表面硬度下降百分比為 $20.62 \pm 1.03\%$ ；添加鈣離子濃度在 10^{-5} M 至 0.1 M 間的組別，之間無顯著差異；添加 10^{-6} M 的鈣離子時，表面硬度下降百分比為 $23.75 \pm 1.33\%$ ，和添加鈣離子濃度大於等於 10^{-4} M 以及完全無添加鈣離子的組別有顯著差異；完全沒有添加鈣離子時，有最高的表面硬度下降量，表面硬度下降百分比為 $39.73 \pm 1.55\%$ ，與有添加鈣離子的各組均有顯著差異。

綜合表 4-4 到表 4-6，在 pH 3 與 pH 2.5 的酸度下，有添加鈣者與無添加鈣者，表面硬度下降量較低，相較於各組皆有達到顯著差異。在 pH 5.5 下，添加鈣離子濃度 1 M 者硬度下降百分最低，與添加其他鈣離子濃度之組別有顯著差異。



4.4 雷射掃描共軛焦顯微鏡影像

4.4.1 pH 5.5

1000 倍下，添加鈣離子濃度 1 M 組(圖 4-3-B)、0.1 M 組(圖 4-3-D)、 10^{-5} M 組(圖 4-3-F)、 10^{-6} M 組(圖 4-3-H)，皆可觀察到實驗區(左方)顏色較對照區(右方)深， 10^{-6} M 組兩區顏色差異最大；四組樣本皆可在實驗區與對照區觀察到製作樣本時磨平拋光的刮痕與牙釉質橫切面牙釉柱與柱間物交錯如同鑰匙孔洞般的排列；除了 1 M 組外，皆可觀察到同一條刮痕在實驗區的顏色較對照區的顏色淡；在 10^{-5} M 組可以觀察到平行排列的牙釉橫紋，實驗區的牙釉橫紋顏色差異較對照區明顯。3D 彩色高度圖(4-3-A、4-3-C、4-3-E、4-3-G)顯示樣本實驗區(左方)與對照區(右方)並無太大的高度落差，但可觀察到隨著添加鈣離子濃度減少，高度落差亦些許增加，亦觀察到數條刮痕，但無法觀察到前述鑰匙孔洞般的特殊形態。



4.4.2 pH 3

1000 倍下，雷射掃描共軛焦顯微鏡影像可發現，添加鈣離子濃度 1 M 組（圖 4-4-B）、0.1 M 組（圖 4-4-D）、 10^{-5} M 組（圖 4-4-F）、 10^{-6} M 組（圖 4-4-H），皆可在對照區觀察到製作樣本時磨平拋光的刮痕與牙釉質橫切面牙釉柱與柱間物交錯如同鑰匙孔洞般的排列；四組樣本皆可觀察到實驗區（左方）顏色較對照區（右方）深；除了 1 M 組其他組別皆可觀察到實驗區與對照區有明顯差異，可在對照區觀察到牙釉質樣本表面有明顯的蜂巢狀構造。3D 彩色高度圖部分，四組樣本亦皆可在對照區觀察到數條刮痕，但無法在對照區觀察到鑰匙孔洞般的形態；添加鈣離子濃度 1 M 組（圖 4-4-A）與添加鈣離子濃度 0.1 M 組（4-4-C）樣本實驗區（左方）與對照區（右方）並無太大的高度落差，但可觀察到隨著添加鈣離子濃度減少，高度落差增加，添加鈣離子濃度 0.1 M 組（圖 4-4-C）、 10^{-5} M 組（圖 4-4-E）、 10^{-6} M 組（圖 4-4-G）三組之間可觀察到高度落差明顯不同。在 5000 倍下（圖 4-9）pH 3 添加鈣離子濃度為 10^{-5} M 組的對照區可觀察到有蜂巢狀第一型的酸蝕結構。

4.4.2 pH 2.5

1000 倍下，添加鈣離子濃度 1 M 組（圖 4-5-B）、0.1 M 組（圖 4-5-D）、 10^{-5} M 組（圖 4-5-F），皆可在對照區觀察到製作樣本時磨平拋光的刮痕與牙釉質橫切面牙釉柱與柱間物交錯如同鑰匙孔洞般的排列，但 10^{-6} M 組（圖 4-5-H）則受到膠帶殘膠影響較無法觀察到同樣現象；四組樣本皆可觀察到實驗區（左方）顏色較對照區（右方）深；除了 1 M 組其他組別皆可觀察到實驗區與對照區有明顯差異，可在對照區觀察到牙釉質樣本表面有明顯的蜂巢狀構造。3D 彩色高度圖部分， 10^{-6} M 組（圖 4-5-G）的對照區（右方）受到殘膠影響而有明顯高度落差，但仍可觀察到與實驗區（左方）有明顯落差；添加鈣離子濃度 1 M 組（圖 4-5-A）樣本實驗區與對照區並無太大的高度落差，但可觀察到隨著添加鈣離子濃度減少，高度落差增加，添加鈣離子濃度 0.1 M 組（圖 4-5-C）、 10^{-5} M 組（圖 4-5-E）、 10^{-6} M 組三組之間可觀察到高度落差明顯不同於彼此。在 5000 倍下（圖 4-10）pH 2.5 添加鈣離子濃度為 10^{-5} M 組的對照區可觀察到有蜂巢狀第一型的酸蝕結構。

4.5 雷射掃描共軛焦顯微鏡影像表面輪廓分析

如圖 4-6 所示，在 pH 5.5 下，添加不同鈣離子濃度各組實驗區與對照區並無明顯高度落差也無明顯表面粗糙度變化。如圖 4-7 所示，在 pH 3 下，添加鈣離子濃度 1 M 組 (4-7-A) 和 0.1 M 組 (4-7-B) 實驗區與對照區並無明顯高度落差，也無明顯表面粗糙度變化；然而在 10^{-5} M 組 (4-7-C) 與 10^{-6} M (4-7-D) 組可觀察到實驗區與對照區表面粗糙度有明顯不同，且 10^{-6} M 組可以觀察到實驗區與對照區有明顯高度落差。如圖 4-8 所示，在 pH 2.5 下，添加鈣離子濃度 1 M 組 (4-8-A) 實驗區與對照區並無明顯高度落差，也無明顯表面粗糙度變化；然而在和 0.1 M 組 (4-7-B) 10^{-5} M 組 (4-7-C) 與 10^{-6} M (4-7-D) 組可觀察到實驗區與對照區表面粗糙度有明顯不同，且 10^{-5} M 組與 10^{-6} M 組可以觀察到實驗區與對照區有明顯高度落差。

4.6 電子掃描顯微鏡之影像

圖 4-10 表示 pH 2.5，鈣離子濃度 10^{-6} M 組，牙釉質樣本縱切面以電子掃描顯微鏡放大 600 倍觀察，對應牙釉質樣本區域示意圖。放大 1000 倍觀察實驗區 (圖 4-11-A) 與對照區 (圖 4-11-A)，可觀察到實驗區有空掉的牙釉柱以及較窄的柱間物，深度大約 $10\ \mu\text{m}$ ，而對照區無法觀察到此現象。

第五章：討論



5.1 研究方法

5.1.1 酸性溶液種類

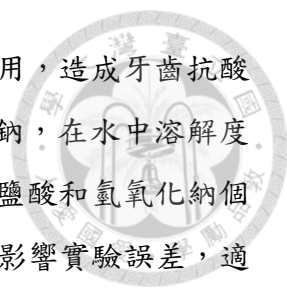
根據以往的研究顯示，酸液的種類、緩衝容量、螯合能力、所含元素等皆會影響酸性溶液對於牙釉質的酸蝕能力^{43,49}。

檸檬酸是許多軟性飲料，如柳橙汁與沙士中酸性的主要成分之一，係一種三質子酸；溶液中的檸檬酸根為一種螯合配體(chelating ligand)，會與鈣離子行螯合作用，形成難溶於水的檸檬酸鈣，因此檸檬酸除了使溶液pH值下降，同時也會使溶液中鈣離子減少。在West等人的研究中發現，在此雙重作用下，即便是在相同pH值下，檸檬酸所造成的牙釉質喪失量也比其他酸高⁶²。

碳酸則為軟性飲料中，氣泡式飲料的主要成分，也會與鈣離子結合，形成難溶於水的碳酸鈣，使溶液中鈣離子減少，因此在許多過去研究中都顯示，在有加壓的二氧化碳環境下或是溶液中含有碳酸，即便是在相同pH值下，也較其他溶液有較強的酸蝕能力^{54,56}。

磷酸也是一種三質子酸，pKa分別是2.15、7.20、12.35，雖然是弱酸，但因為pKa₁較低，所以酸度較高；在溶液中因溶液pH值不同，而有可能存在四種不同狀態：磷酸(H₃PO₄)、磷酸二氫根(H₂PO₄⁻)、磷酸氫根(HPO₄²⁻)、磷酸根(PO₄³⁻)，磷酸在pH值3.5以下的環境中，大多為磷酸、磷酸氫根或/與磷酸二氫根的狀態。因此，牙釉質浸泡在單純只有磷酸的酸液時，並不會因為磷酸具有磷酸根，而減緩牙釉質溶解的狀況⁶³，反而會因為磷酸解離出的產物具有較強的和鈣離子結合的能力，形成Ca(HPO₄)(H₂PO₄)⁻或是Ca(H₂PO₄)OH，使得牙釉質溶解度增加^{54,55,56,62}。但若是溶液中，磷酸和鈣離子同時存在的情況下，在特定的鈣/磷比時，反而可以降低牙釉質溶解度，過去的實驗也多著重於尋找可以減少牙釉質酸蝕的特定鈣/磷比^{59,64-67}。

因此本實驗所使用酸液來源為鹽酸，並使用氫氧化鈉調整酸鹼值至實驗條件，Chen等人在2004年所做研究中，也建議以鹽酸做為調整實



驗溶液的酸度來源，以避免造成實驗溶液間的交互作用，造成牙齒抗酸蝕實驗的誤差⁵⁴；鹽酸和氫氧化鈉混合後產物為氯化鈉，在水中溶解度高，鈉離子與氯離子並非牙釉質的主要組成元素，且鹽酸和氫氧化鈉個別屬於強酸與強鹼，混和後的溶液緩衝容積差，不會影響實驗誤差，適合用來觀察添加特定物質後對於牙齒酸蝕之影響。

5.1.2 酸性溶液pH值

Meurman與ten Cate在1996年的研究報告中指出，不管是何種溶液，只要溶液pH值低於5.5，便有可能產生酸蝕，特別是在長時間與重複地與牙釉質作用的情況下⁶⁹，往後研究中也多把pH 5.5當成是牙釉質解離的臨界pH值；雖然由前述文獻回顧可知臨界pH是個範圍，受到很多因素影響⁵⁵，但本實驗仍把pH 5.5設為一個實驗條件。

市售軟性飲料pH值最低者為可口可樂大約在pH 2.5，而其他可能造成牙釉質酸蝕的飲品如運動飲料、柳橙汁、檸檬汁、紅酒等的pH值大約在3左右³¹⁻³⁵，因此本實驗選用了pH 2.5與pH 3作為實驗條件。

5.1.2 酸性溶液作用時間


研究指出，進食後，口中pH值回復時間會隨著口中區域不同而有所差異，在正中門齒顎側面區域大約需要2分鐘，而在上顎第一大白齒的顎側面大約需要4至5分鐘，會隨著解剖構造不同以及進食方式不同而有所差異⁷⁰。由此可見口中低pH值時的持續時間與體外實驗動輒15分鐘以上的酸蝕作用時間大相逕庭。因此本實驗選擇觀察3分鐘之內，酸性環境對於牙釉質的影響。

5.1.3 酸蝕程度評估方法

以往酸蝕實驗評估酸蝕程度主要分成兩大方向，一是藉由顯微鏡或表面輪廓儀（surface profilometry）觀察牙釉質樣本表面變化，推估牙釉質喪失量；另一個是研究表面物理性質變化，如硬度或是彈性係數等方式；而非直接測量溶液中所含鈣或磷離子量推估牙釉質喪失量。主要原因可能來自於過去研究使用溶液多以包含鈣與磷，且磷酸根在不同pH值下會以磷酸氫根或磷酸二氫根的形式存在於水溶液中，難以藉由溶液中磷酸根濃度估算牙釉質喪失量。故大多數酸蝕研究多分析表面變化，分析實驗區與對照區高度變化，以推斷是否有齒質喪失，但此方法需要齒質喪失達一定程度後，才可觀察到，無法測量微量齒質流失，這同時也可解釋為何大多數酸蝕實驗中，牙釉質與酸性溶液作用時間偏長。故本實驗使用不含磷元素的酸性溶液，加入鈣離子，以感應耦合電漿質譜儀測量反應後溶液中的磷元素含量，以微觀方式觀察推算是否有牙釉質喪失。

觀察牙釉質樣本表面變化方面，目前大多數酸蝕研究多使用原子力顯微鏡（atomic force microscopy, AFM）、表面輪廓儀或是掃描式電子顯微鏡（SEM）。

原子力顯微鏡由Quate與Gerber於1986年發明，屬於探針掃描式顯微鏡，解析度高，適合用於奈米等級實驗觀察。掃描原理為：當樣本與探針非常接近時，顯微鏡上細長有彈性的懸臂（cantilever）上的尖銳探針（probe）與樣本間的作用力會使懸臂彎曲且維持一定高度，顯微鏡上的二極體紀錄掃描樣本時，探針與懸臂隨樣本表面高低起伏移動的軌跡，並記錄分析轉化為樣本表面影像與物理性質。觀測範圍（150 μm x 150 μm ），樣本表面高度落差不得超過20 μm ，掃描速度緩慢，過程中容易刮傷樣本也容易耗損探針，進而影響掃描結果。



近年來酸蝕研究多使用表面輪廓儀評估酸蝕程度，表面輪廓儀測量方式與原子力顯微鏡類似，藉由記錄分析金屬或是鑽石接觸式探針施予特定力量與距離在樣本表面掃描產生的垂直運動，計算出樣本表面硬度、粗糙度與彈性細數等物理性質。雖然量測距離較原子力顯微鏡長，具有精確性與再現性，但定位和辨認細微量測位置也較困難，而且和原子力顯微鏡一樣，探針有可能會刮壞樣本表面，造成實驗誤差。

掃描式電子顯微鏡利用高能量電子束掃描樣本表面，紀錄電子與原子間交互作用，轉化成樣本圖像。放大率可達50萬倍，掃描速度快且範圍廣，解析度高，但是觀測樣本表面需具有導電度，因此不導電樣本需要於觀測前包覆金屬，有可能會在處理過程中破壞樣本結構，且無法定量分析，只能得到影像。

本實驗除了使用SEM外，也使用雷射掃描共軛焦顯微鏡觀察樣本表面變化。好處在於樣本不需前處理，操作方法簡單且掃描速度快，因為是光學方式掃描，不會傷害樣本，除定性觀察外，也可計算出牙釉質表面粗糙度。



5.2 鈣離子對於降低牙釉質酸蝕程度的效果


文獻顯示，添加少量鈣離子，即可降低酸性溶液對於牙釉質的影響，可觀察到添加鈣離子組別有較少的表面硬度下降量以及較少的表面齒質喪失量^{28,43,59,60,71,72}。但大多數實驗中仍會在溶液中加入磷^{43,59}，或是原先實驗溶液中就含有磷^{60,71}，只有少數實驗²⁸有觀察酸性溶液中單純只有鈣離子的作用。

其中 Attin 等人在 2003 年的研究中分析牙齒的表面硬度以及以表面輪廓儀分析表面齒質喪失量，提出在 pH 2.2 的檸檬酸溶液中加入鈣離子能有效降低酸性溶液造成的影響，但添加量多寡 (5×10^{-4} M、 10^{-3} M、 1.5×10^{-3} M) 降低酸蝕的程度並沒有達到統計上顯著差異²⁸。本實驗在 pH 2.5 酸度下也觀察到同一現象，添加鈣離子濃度在 10^{-3} M 到 10^{-4} M 組別間析出磷離子濃度與牙釉質表面硬度下降百分比無顯著差異，卻與完全無添加組有顯著差異。

文獻皆是以牙釉質的飽和溶液觀點解釋添加鈣、磷離子對於減低酸蝕效果的作用原理，因此絕大多數實驗選擇同時添加鈣與磷。然而如前所述，添加的磷酸鹽類或是磷酸根離子，會隨著 pH 值不同而轉換成不同形式，在 pH 值低於 3 的狀況下，反而會解離釋放出更多氫離子，加強酸蝕效果。故本實驗選擇只添加鈣離子，希望藉由鈣離子的飽和溶液的觀點尋找可能降低酸蝕效果的方法。而由實驗結果可看出單純添加鈣離子在各 pH 值下皆可有效降低酸蝕對於牙釉質表面硬度的影響，且在 pH 值高於 3 的狀況下，於溶液中無法檢出磷離子。

本實驗中在 pH 5.5 與 pH 3 添加鈣離子濃度 1 M 的組別可觀察到牙釉質表面硬度下降，但溶液中未檢出磷離子也沒有觀察到表面粗糙度與高度變化的狀況，推測可能原因在於牙釉質酸蝕後產生鈣離子與磷酸根離子，但溶液中鈣離子濃度已飽和，因此鈣離子會跟溶出的磷酸根離子反應，生成鹽類，但無法判定為磷酸鈣、磷酸二氫鈣亦或是磷酸氫鈣，仍需後續研究釐清，但此情況下牙釉質表面結構已改變，造成物理性質變化。因此才會觀察到表面硬度改變，但未檢出磷離子的狀況。

5.3 體外實驗與體內實驗差異



體內實驗仍須考量人體口腔環境複雜、唾液成分多樣、口腔內微生物不同、個人進食習慣不同以及齒質生成環境不同等影響。其中最重要的因素為唾液與後天薄膜。唾液富含化學物質與蛋白質，其中蛋白質溶液與鈣離子結合，是唾液中主要鈣離子的來源。唾液能持續分泌，流速以及組成也影響進食後 pH 值恢復的時間；後天薄膜為唾液中蛋白質在牙齒表面形成的一層有機膜，除了可以當作牙齒物理性屏障，阻礙酸性物質與牙齒直接接觸外，也會釋放鈣離子，降低酸蝕作用進行⁷³。

同時也須考慮軟性飲料中添加鈣離子以降低酸蝕影響時，額外添加的鈣離子是否會與酸性溶液中物質作用沉澱而降低在溶液中的濃度或是造成人體負擔。

與體外實驗相比，要探討軟性飲料添加鈣離子對於減低人體牙釉質酸蝕效果，需要額外考慮許多因素，具體成效需要進一步評估。

第六章：結論



1. 含有鈣離子的各組在pH 2.5、pH 3、pH 5.5的環境下，皆較未含有鈣離子的各組有較少的表面硬度下降百分比，因此本實驗認為在酸性溶液中添加一定濃度的鈣離子，能有效降低酸性環境對牙釉質所造成的影響。
2. 在pH 2.5，若要達到有效降低溶液中所測得磷元素析出量，鈣離子含量需要在 10^{-2} M以上，pH 3的狀況下則是 10^{-3} M以上，pH 5.5各組則是 10^{-4} M以上，則隨著pH值下降，要達到有效降低酸蝕影響，需添加更高濃度的鈣離子。
3. 在pH 5.5和pH 3，鈣離子濃度為1 M組，溶液中未測得磷元素，磷元素的濃度為0 ppb；但pH 2.5，鈣離子濃度1 M組在實驗溶液中卻測得 16.05 ± 18.03 ppb的磷元素。溶液pH值大於3，添加鈣離子濃度1 M時，在溶液中無法測得磷元素溶出。沒有磷元素溶出是否代表沒有牙釉質溶出這點需要後續實驗映證，因為也有可能是牙釉質溶出後，與溶液中其他離子結合形成沉澱物，或者牙釉質溶出物不含磷。
4. pH 5.5以下的溶液，鈣離子含量小於1M的各組，皆會使牙釉質表面硬度下降。雖然下降百分比會隨著鈣離子濃度上升而減少，但相較於初始表面硬度仍是較為軟化的狀況，在pH 5.5，鈣離子濃度含有1M，硬度下降百分比最少的組別，仍有4.10 %的下降量。
5. 根據以往實驗，牙釉質酸蝕可分為牙釉質溶解、軟化、牙釉質崩解造成齒質喪失等步驟，但本實驗中卻觀察到牙釉質軟化卻沒有檢出磷元素溶出的狀況，顯示牙釉質軟化，並不一定會在溶液中可以測得牙釉質主成分氫氧磷灰石中所含有的磷元素，完全未測得磷元素也不能代表沒有牙釉質酸蝕產生。因此檢出磷元素溶出、表面硬度下降、表面粗糙度改變，三者不一定會同時發生，三者與酸蝕程度的關係需進一步實驗釐清。

第七章：未來研究努力方向



1. 本實驗中，分析出牙釉質樣本表面硬度下降，卻未檢出磷元素也未觀察到表面粗糙度改變，未來須研究軟化的牙釉質深度，同時記錄牙釉質硬度下降量與影響範圍，更能了解酸蝕程度。
2. 本實驗中量測磷元素析出量的時間點只有一個，未來可在特定時間間距量測，了解作用時間對牙釉質溶解的關係。
3. 根據以往實驗，牙釉質酸蝕可分為牙釉質溶解、軟化、牙釉質崩解造成齒質喪失等步驟，但本實驗中卻觀察到牙釉質軟化卻沒有檢出牙釉質溶出的狀況，推測可能是溶出的元素又與溶液中物質作用沉澱，未來實驗可進一步研究檢出磷離子析出、表面硬度下降、表面粗糙度改變、表面組成變化等牙釉質酸蝕程度指標間的關係。
4. 過去實驗多採用牙釉質頰側面或舌側面，與臨床上觀測到咬合面或是切緣面酸蝕齒質喪失的狀況不同，未來可採用牙冠部橫切面觀察牙釉質、牙釉質牙本質交界、牙本質等不同部位酸蝕狀況。

。

第八章：圖次

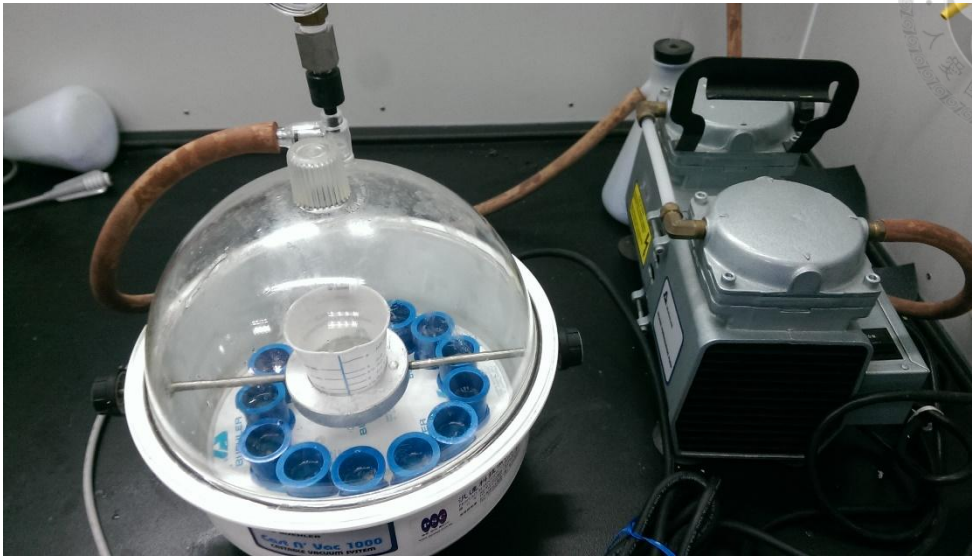


圖 3-1：真空包埋機



圖 3-2：鋸片機



圖 3-3：硬組織研磨機

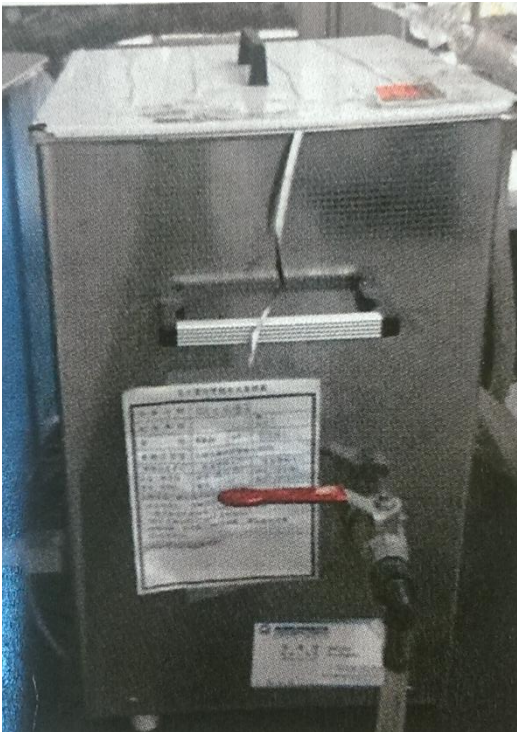


圖 3-4：超音波震盪器

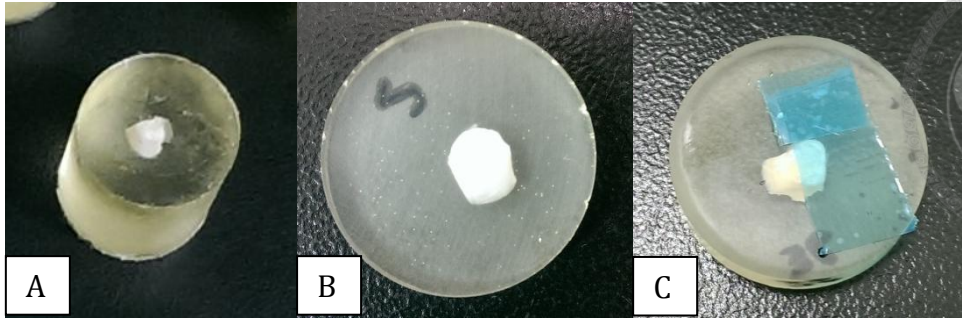


圖 3-5：牙釉質樣本製備各階段彩圖。A：以環氧樹脂包埋後脫模。B：使用鋸片機切割成上下平行，5 mm 的厚度。C：使用膠帶覆蓋一半樣本窗作為對照區。

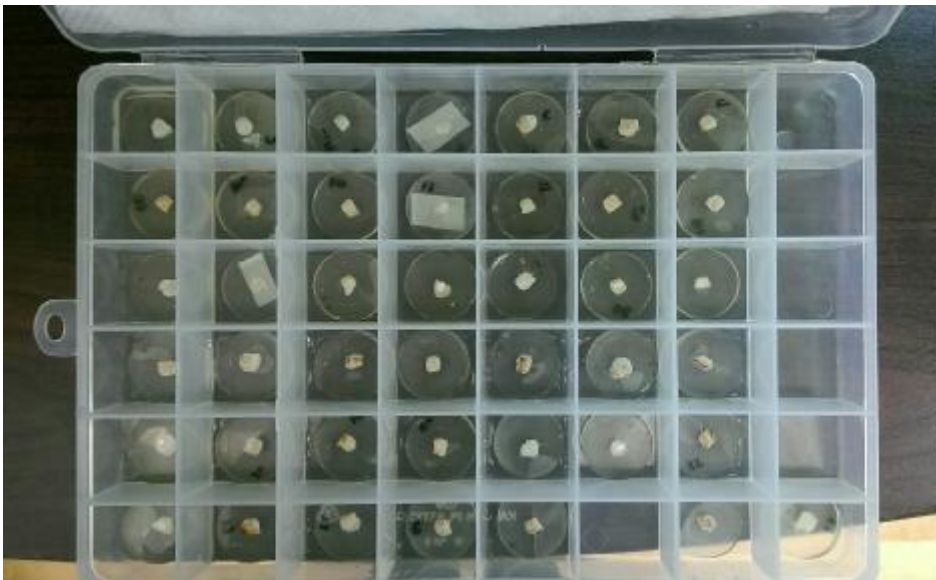


圖 3-6：牙釉質樣本分組收納情形



圖 3-7：pH 計主機及測量電極



圖 3-8：雷射掃描共軛焦顯微鏡

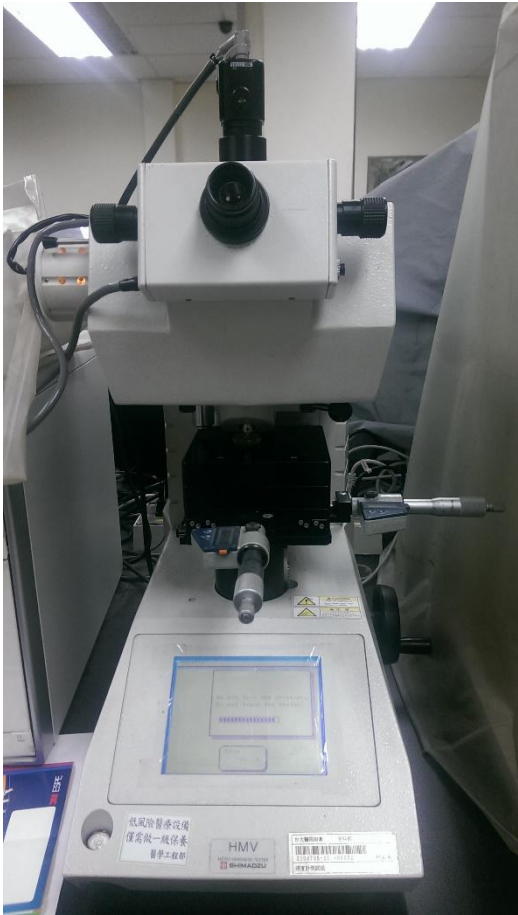


圖 3-9：維氏微小硬度計



圖 3-10：感應耦合電漿質譜儀

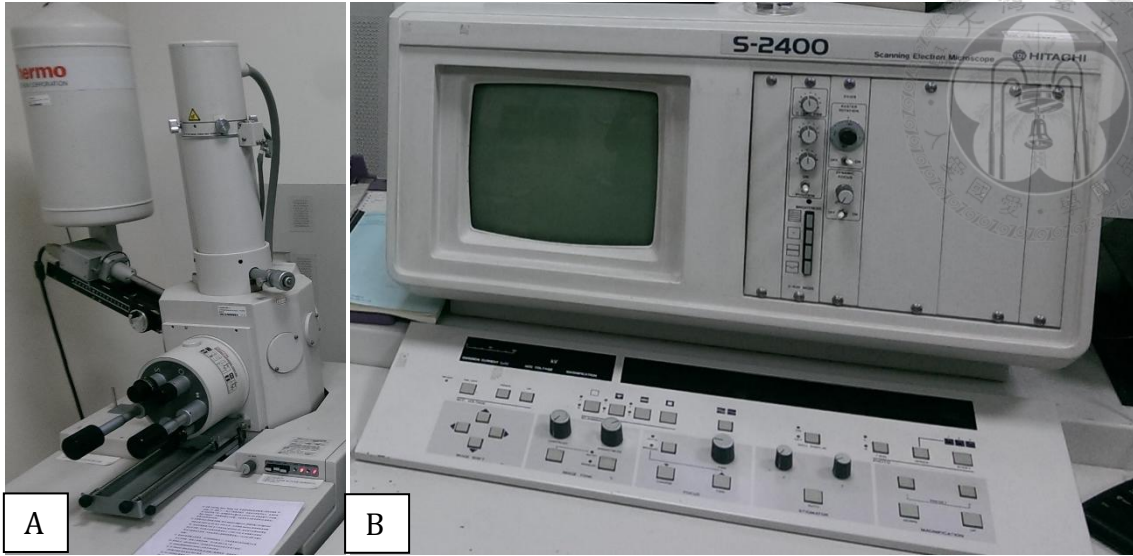


圖 3-11：電子掃描顯微鏡。A：樣本操作區。B：螢幕操作區。

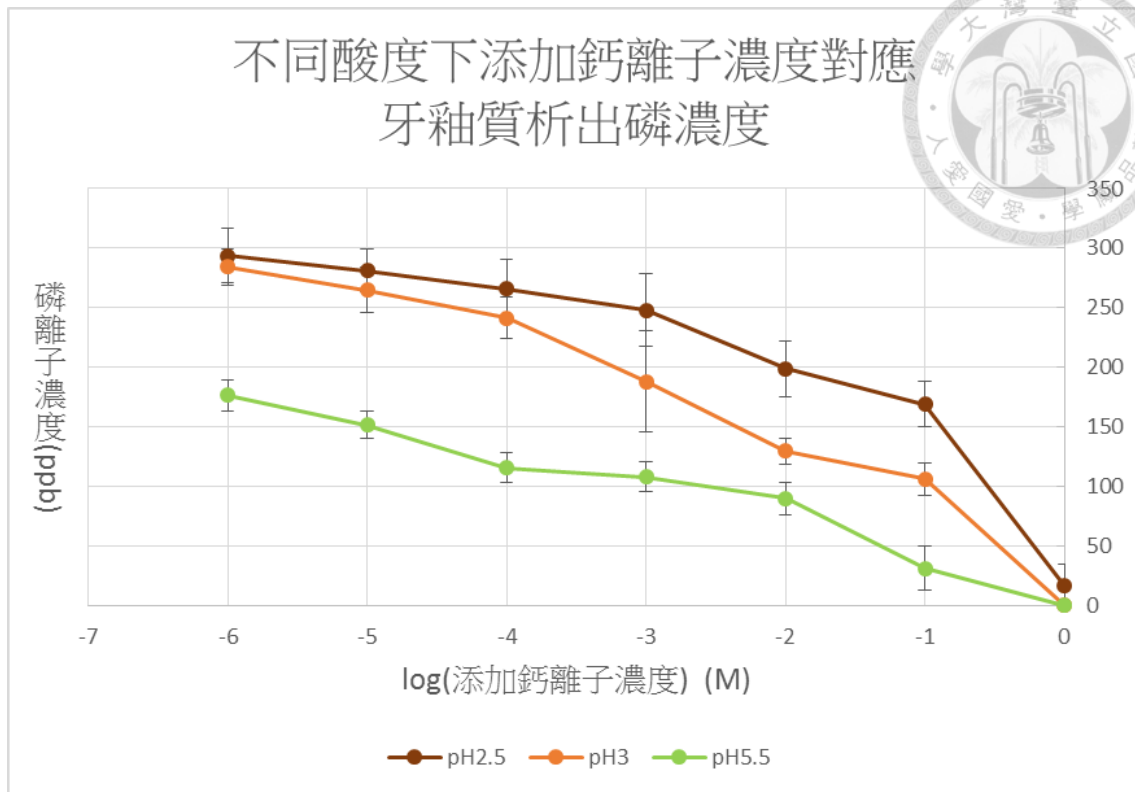


圖 4-1：不同酸度下，添加鈣離子濃度取對數後，各組牙釉質樣本所析出的磷離子濃度 (ppb)

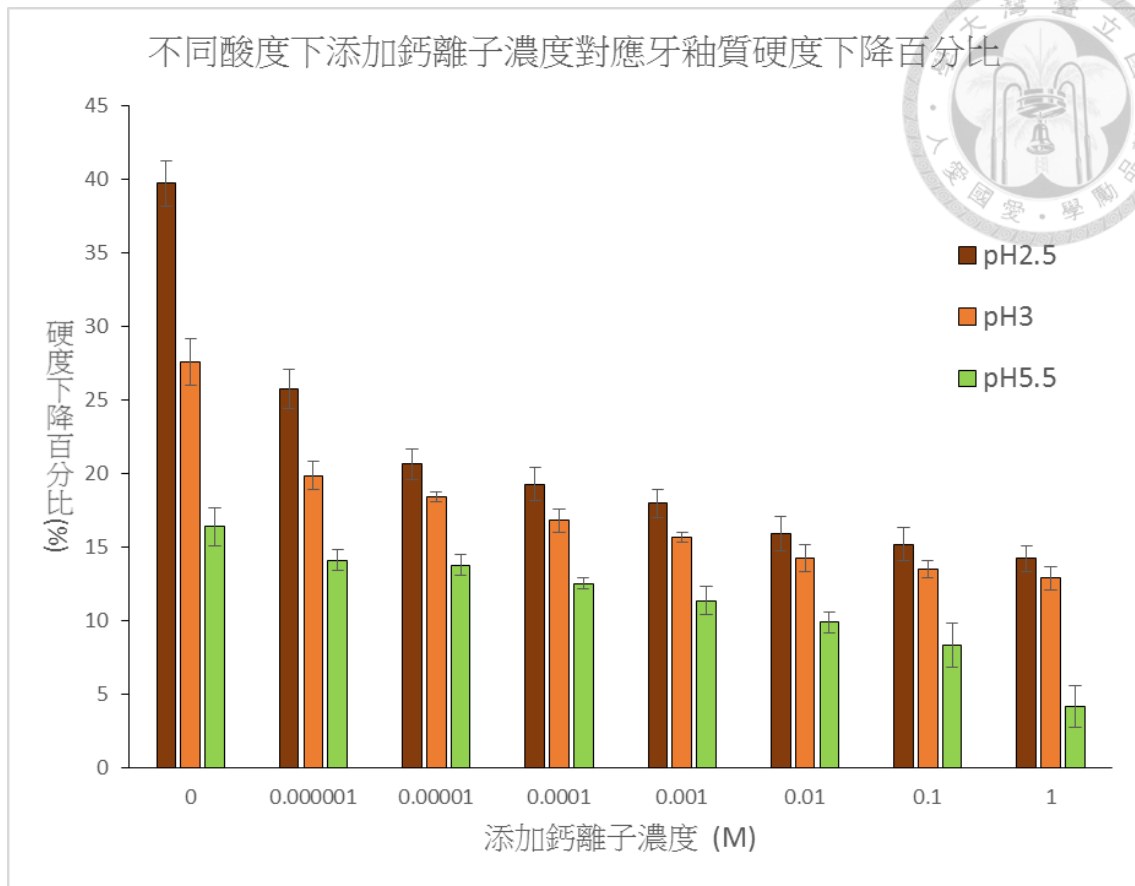


圖 4-2：不同酸度下，添加不同鈣離子濃度，各組牙釉質樣本表面硬度下降百分比 (%)

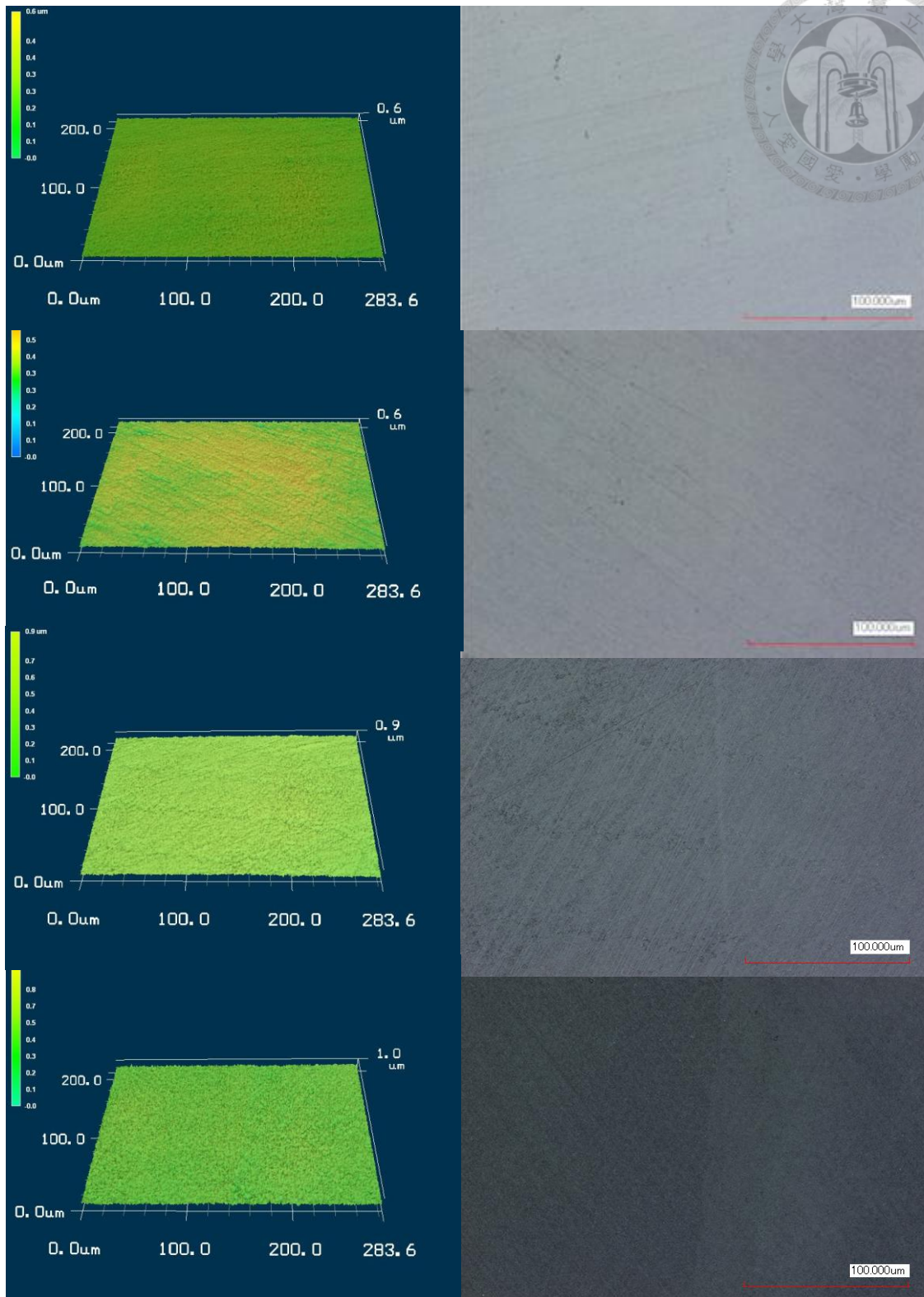


圖 A pH 5.5 不同鈣離子濃度 10^{-6} M 下雷射共軛焦顯微鏡影像與 3D 圖。鈣離子濃度 1 M (A, B)、0.1 M (C, D)、 10^{-5} M (E, F)、 10^{-6} M (G, H)

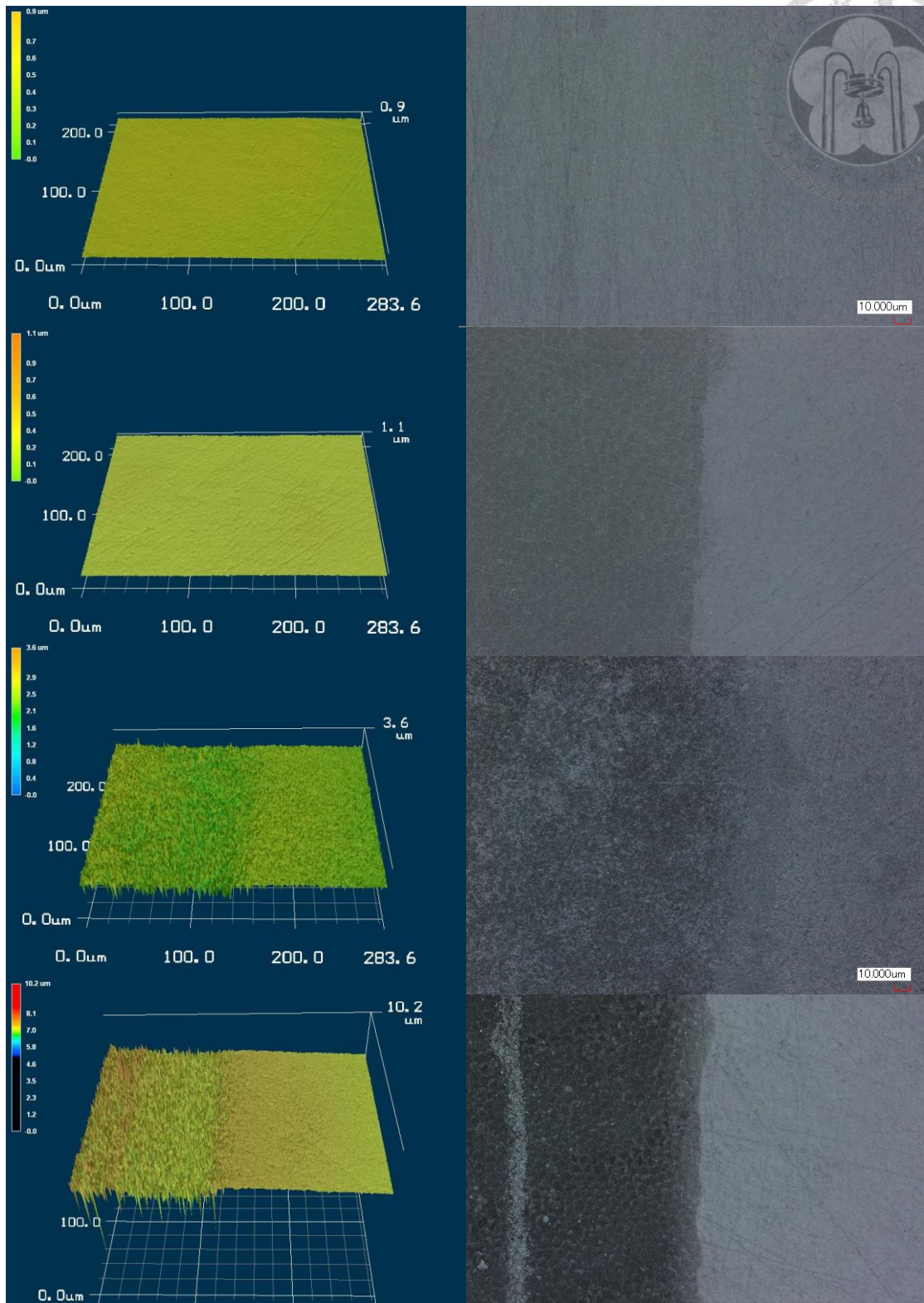


圖 A : pH 3 不同鈣離子濃度 100 B 下雷射共軛焦顯微鏡影像與 3D 圖。鈣離子濃度 1 M (A, B)、0.1 M (C, D)、10⁻⁵ M (E, F)、10⁻⁶ M (G, H)

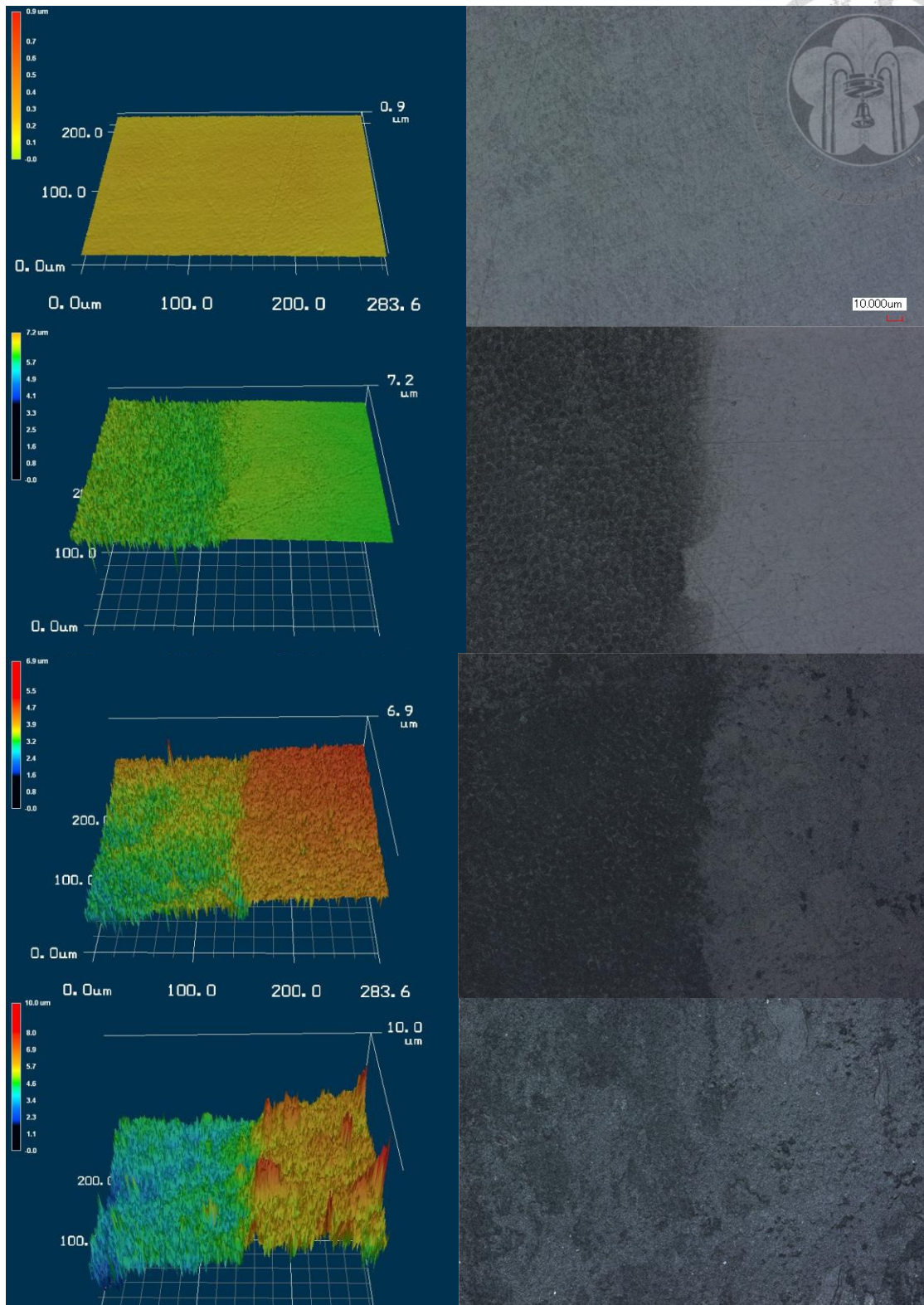


圖 A pH 2.5 不同鈣離子濃度 10^{-6} M 下雷射共軛焦顯微鏡影像與 3D 圖。鈣離子濃度 1 M (A, B)、0.1 M (C, D)、 10^{-5} M (E, F)、 10^{-6} M (G, H)

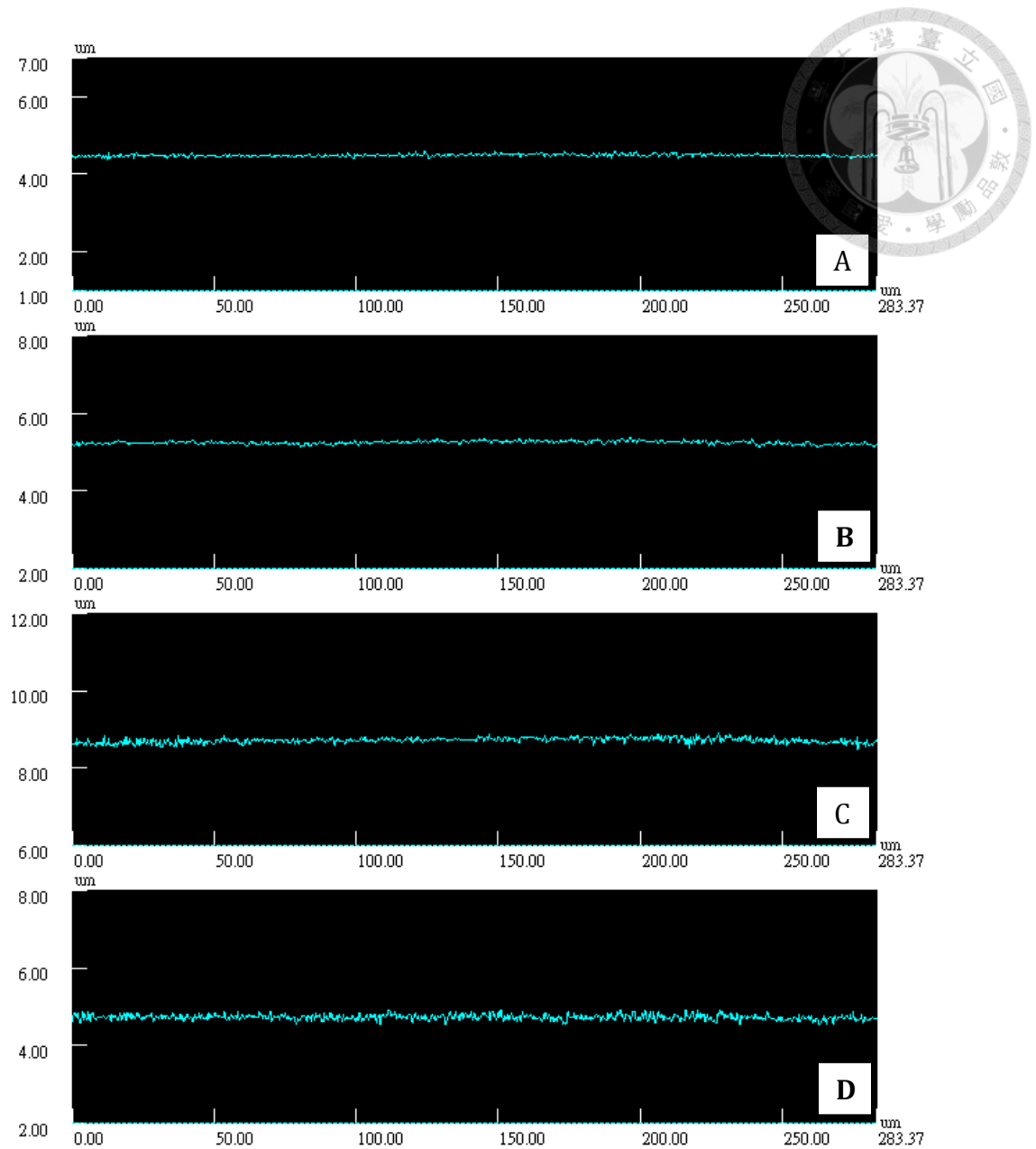


圖 4-6：pH 5.5 不同鈣離子濃度組 1000 倍下雷射共軛焦顯微鏡影像之輪廓分析。A：鈣離子濃度 1 M、B：0.1 M、C： 10^{-5} M、D： 10^{-6} M

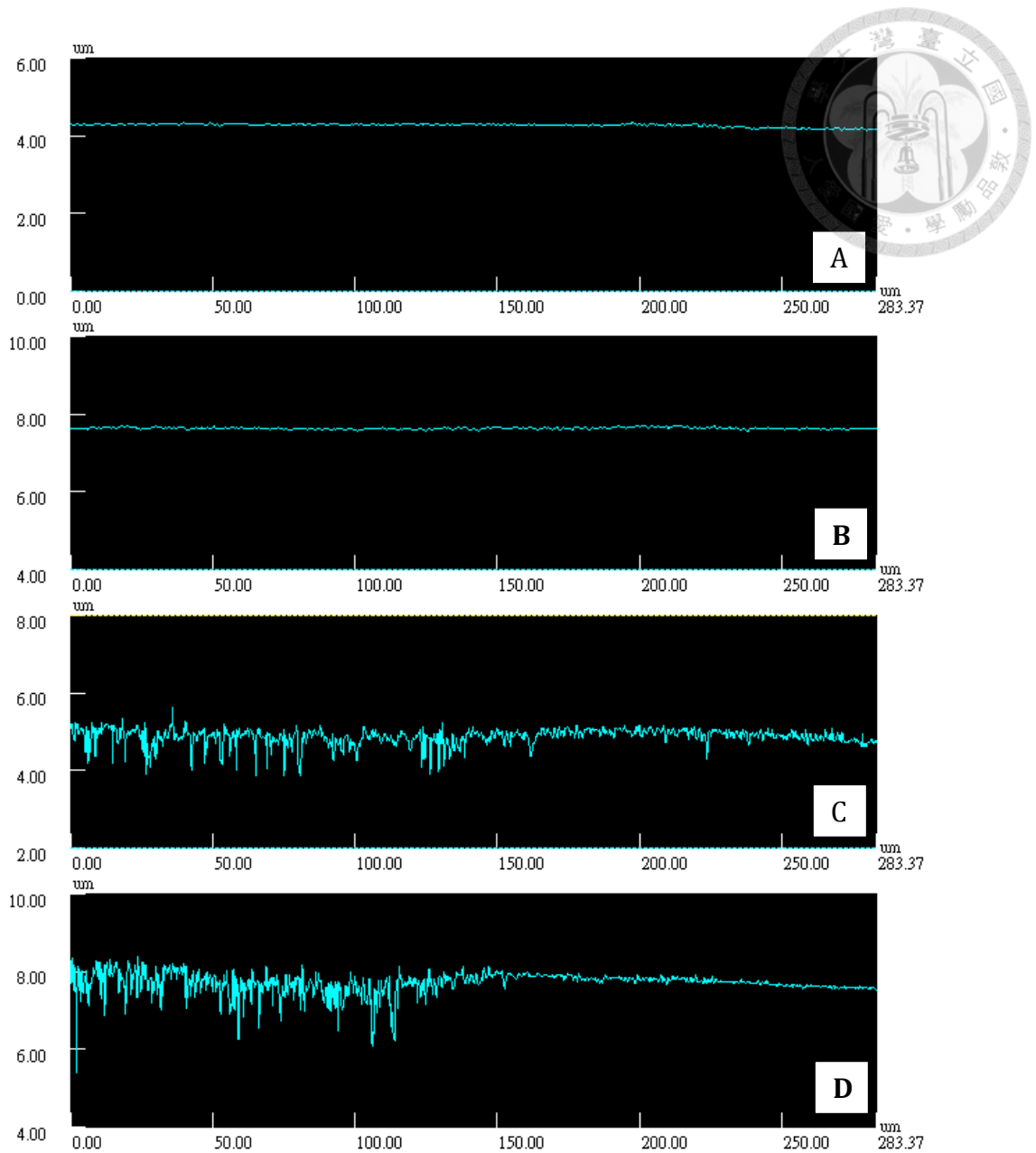


圖 4-7：pH 3 不同鈣離子濃度組 1000 倍下雷射共軛焦顯微鏡影像之輪

廓分析。A：鈣離子濃度 1 M、B：0.1 M、C： 10^{-5} M、D： 10^{-6} M

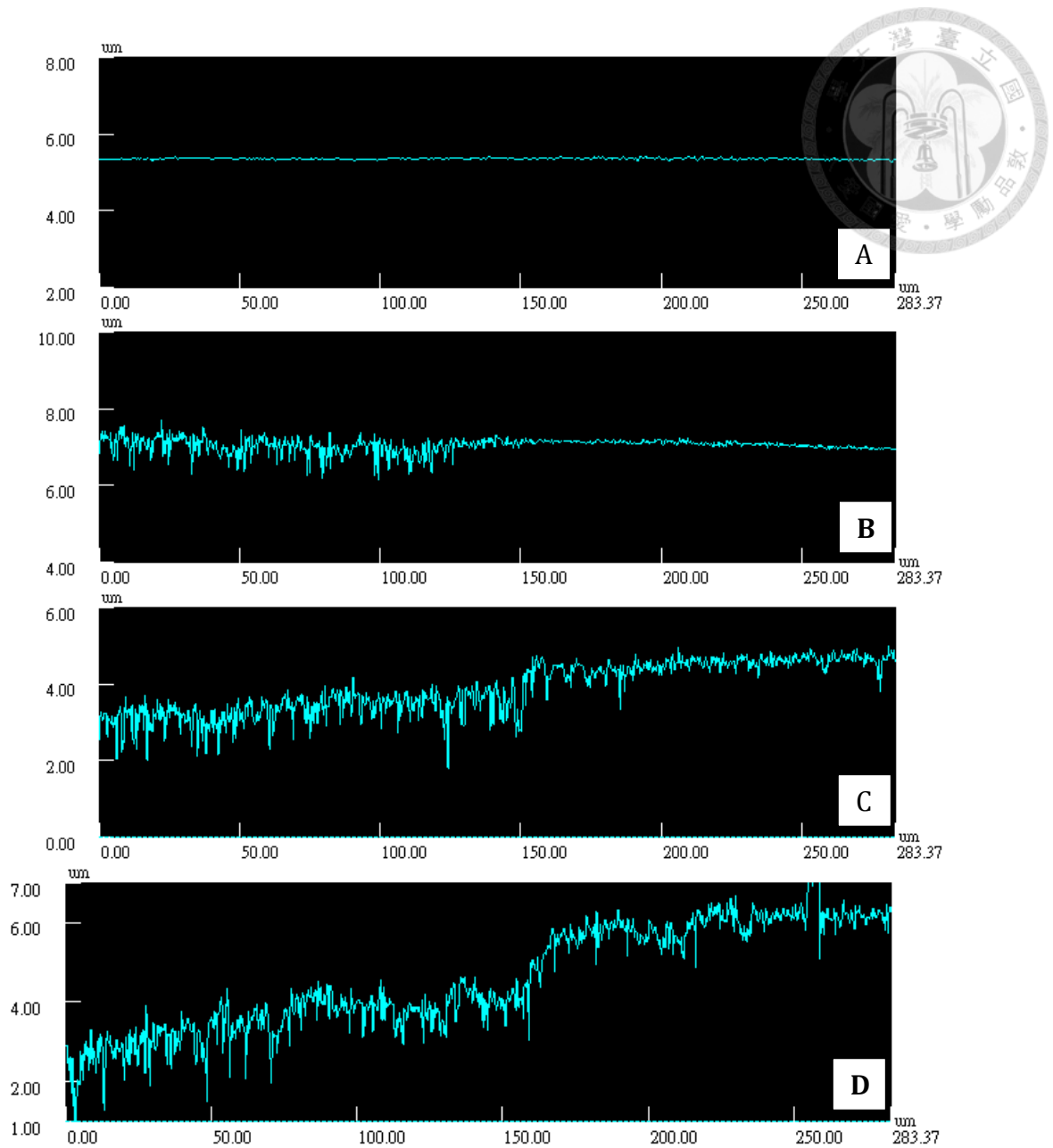


圖 4-8：pH 2.5 不同鈣離子濃度組 1000 倍下雷射共軛焦顯微鏡影像之輪廓分析。A：鈣離子濃度 1 M、B：0.1 M、C： 10^{-5} M、D： 10^{-6} M

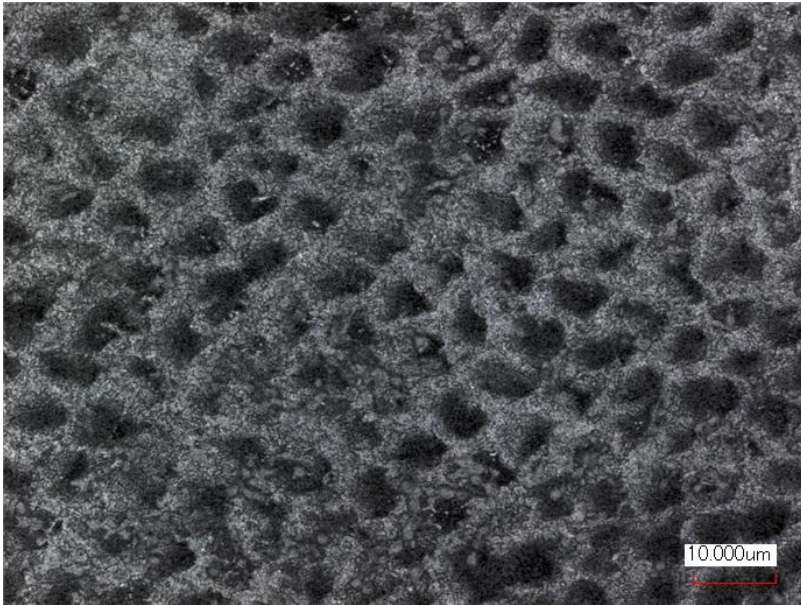


圖 4-9：pH 3 鈣離子濃度 10^{-5} M 組 3000 倍下雷射共軛焦顯微鏡影像

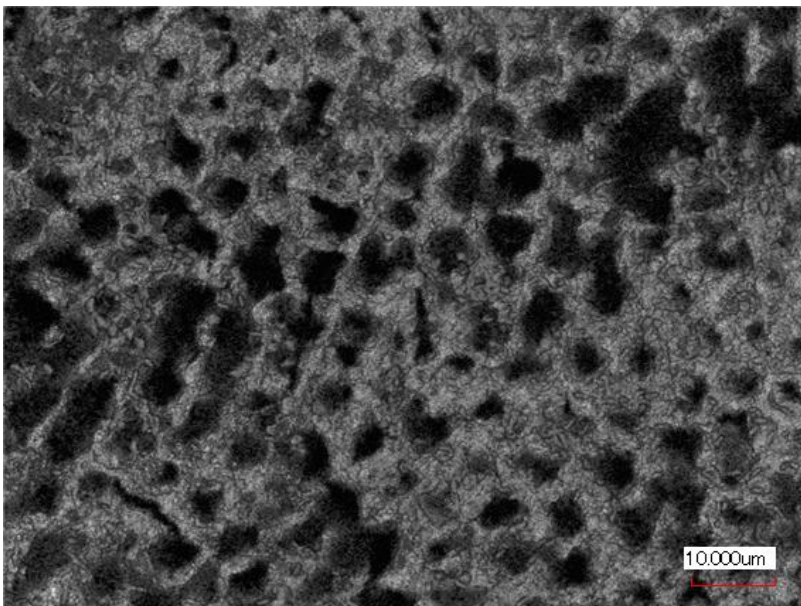


圖 4-10：pH 2.5 鈣離子濃度 10^{-5} M 組 3000 倍下雷射共軛焦顯微鏡影像

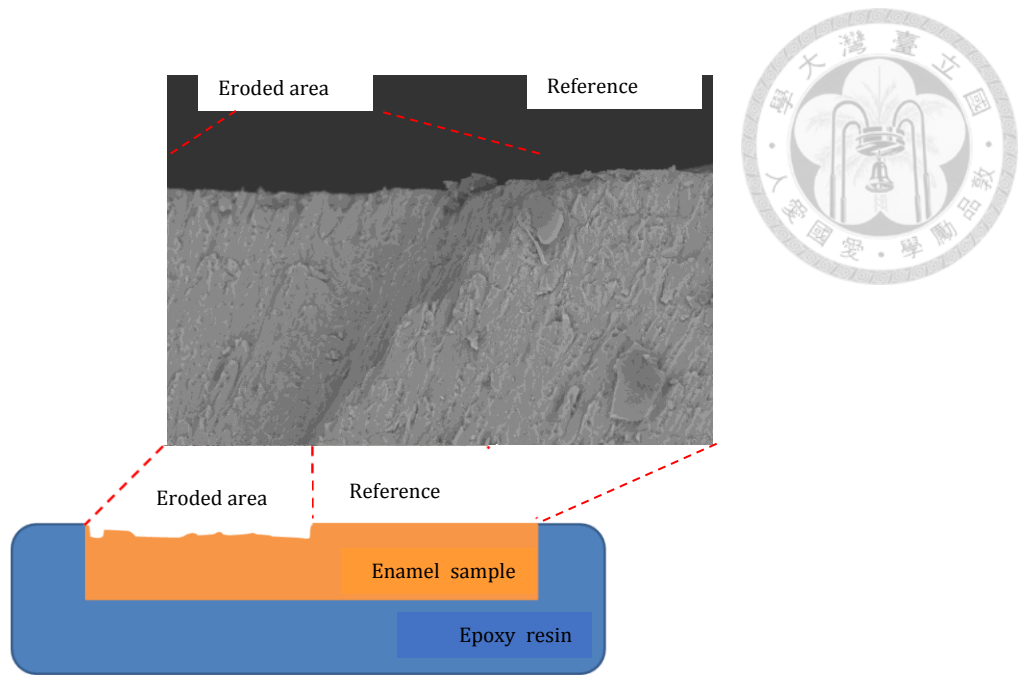


圖 4-11：pH 2.5 鈣離子濃度 10^{-6} M 組牙釉質樣本縱切面放大 600 倍下
電子掃描顯微影像

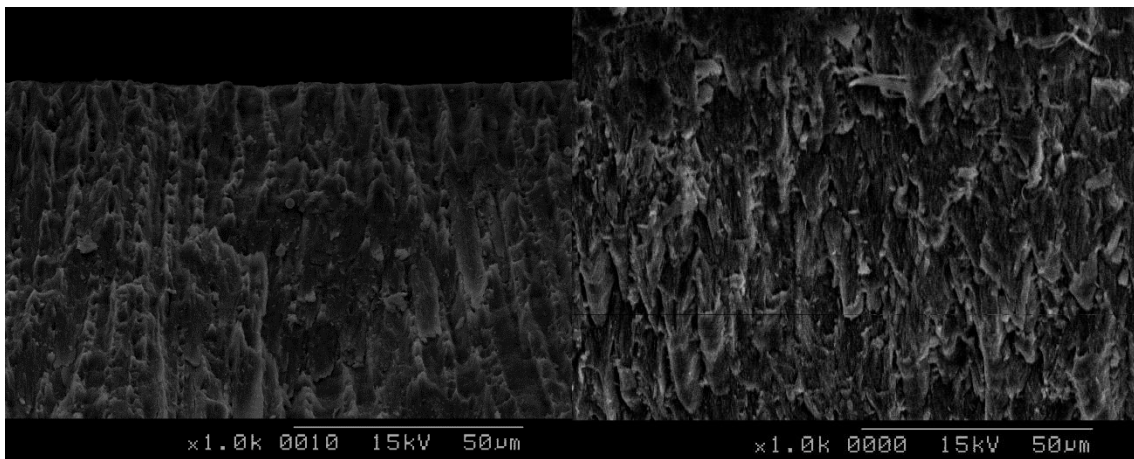


圖 4-12：pH 2.5 鈣離子濃度 10^{-6} M 組牙釉質樣本縱切面放大 1000 倍下
電子掃描顯微影像。A：實驗區。B：對照區

第九章：表次



表 4-1: pH 5.5 下牙釉質樣本各組所析出磷離子濃度(P)之平均值(mean)與標準差 (SD)

組別n=3		pH5.5 10 ⁻⁶ M	pH5.5 10 ⁻⁵ M	pH5.5 10 ⁻⁴ M	pH5.5 10 ⁻³ M	pH5.5 0.01M	pH5.5 0.1M	pH5.5 1M
P (ppb)	Mean	176.21 ^a	151.3 ^{ab}	115.69 ^{bc}	108.1 ^c	89.78 ^c	30.94 ^d	0.00 ^e
	SD	13.39	11.58	12.44	12.96	13.35	18.66	0.00

表 4-2: pH 3 下牙釉質樣本各組所析出磷離子濃度(P)之平均值(mean)與標準差 (SD)

組別n=3		pH3 10 ⁻⁶ M	pH3 10 ⁻⁵ M	pH3 10 ⁻⁴ M	pH3 10 ⁻³ M	pH3 0.01M	pH3 0.1M	pH3 1M
P (ppb)	Mean	284.25 ^a	264.78 ^a	241.55 ^{ab}	187.86 ^{bc}	129.62 ^{cd}	106.03 ^d	0.00 ^e
	SD	15.33	19.38	17.65	42.61	10.77	13.42	0.00

表 4-3: pH 2.5 下牙釉質樣本各組所析出磷離子濃度(P)之平均值(mean)與標準差 (SD)

組別n=3		pH2.5 10 ⁻⁶ M	pH2.5 10 ⁻⁵ M	pH2.5 10 ⁻⁴ M	pH2.5 10 ⁻³ M	pH2.5 0.01M	pH2.5 0.1M	pH2.5 1M
P (ppb)	Mean	293.82 ^a	281.13 ^a	265.84 ^{ab}	247.96 ^{ab}	198.6 ^{bc}	169.04 ^c	16.05 ^d
	SD	22.76	17.71	24.85	30.74	23.44	19.15	18.02

表 4-4 : pH 5.5 下牙釉質樣本各組表面硬度下降百分比 (Hard) 之平均值 (mean) 與標準差 (SD)

組別n=3		pH5.5 0M	pH5.5 10 ⁻⁶ M	pH5.5 10 ⁻⁵ M	pH5.5 10 ⁻⁴ M	pH5.5 10 ⁻³ M	pH5.5 0.01M	pH5.5 0.1M	pH5.5 1M
Hard (%)	Mean	16.39 ^a	14.10 ^{ab}	13.76 ^{ab}	12.49 ^{abc}	11.33 ^{bc}	9.87 ^{bc}	8.30 ^c	4.10 ^d
	SD	1.66	0.51	0.47	0.15	0.94	0.49	2.34	2.00

表 4-5：pH 3 下牙釉質樣本各組表面硬度下降百分比 (Hard) 之平均值 (mean) 與標準差 (SD)

組別n=3		pH3 0M	pH3 10 ⁻⁶ M	pH3 10 ⁻⁵ M	pH3 10 ⁻⁴ M	pH3 10 ⁻³ M	pH3 0.01M	pH3 0.1M	pH3 1M
Hard	Mean	27.54 ^a	19.85 ^b	18.40 ^{bc}	16.78 ^{bcd}	15.63 ^{cde}	14.24 ^{de}	13.51 ^{de}	12.87 ^e
(%)	SD	2.50	0.91	0.11	0.63	0.13	0.85	0.34	0.62


表 4-6：pH 2.5 下牙釉質樣本各組表面硬度下降百分比 (Hard) 之平均值 (mean) 與標準差 (SD)

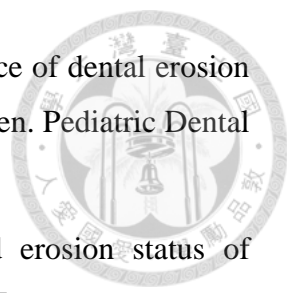
組別n=3		pH2.5 0M	pH2.5 10 ⁻⁶ M	pH2.5 10 ⁻⁵ M	pH2.5 10 ⁻⁴ M	pH2.5 10 ⁻³ M	pH2.5 0.01M	pH2.5 0.1M	pH2.5 1M
Hard	Mean	39.73 ^a	25.75 ^b	20.62 ^{bc}	19.26 ^{cd}	17.94 ^{cd}	15.90 ^{cd}	15.18 ^{cd}	14.21 ^d
(%)	SD	2.40	1.77	1.07	1.31	0.99	1.32	1.33	0.76

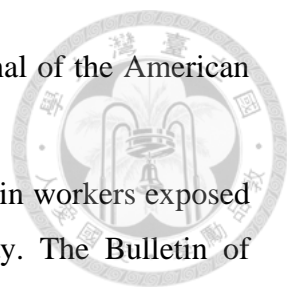
參考文獻

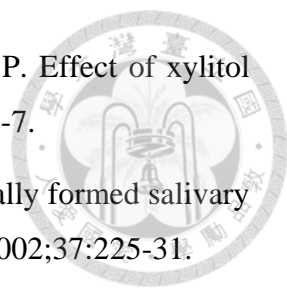


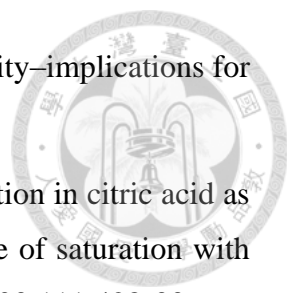
1. Nanci A. Ten Cate's Oral Histology-Pageburst on Vital Source: Development, Structure, and Function: Elsevier Health Sciences; 2007.
2. Busch S, Schwarz U, Kniep R. Morphogenesis and structure of human teeth in relation to biomimetically grown fluorapatite-gelatine composites. *Chemistry of materials*. 2001;13:3260-71.
3. Dana JD, Brush GJ, Dana ES. *The system of mineralogy*: Wiley; 1885.
4. Sakae T. Variations in Dental Enamel Crystallites and Micro-Structure. *Journal of Oral Biosciences*. 2006;48:85-93.
5. Larsen S. Solubility of hydroxyapatite. *Nature* 1966; 605.
6. LeGeros RZ. Calcium phosphates in oral biology and medicine. *Monographs in oral science*. 1990;15:1-201.
7. Lussi A, Schlueter N, Rakhmatullina E, Ganss C. Dental erosion--an overview with emphasis on chemical and histopathological aspects. *Caries research*. 2011;45 Suppl 1:2-12.
8. He LH, Swain MV. Understanding the mechanical behaviour of human enamel from its structural and compositional characteristics. *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials*. 2008;1:18-29.
9. Risnes S. Rationale for consistency in the use of enamel surface terms: perikymata and imbrications. *European Journal of Oral Sciences*. 1984;92:1-5.
10. Kodaka T, Debari K, Yamada M, Kuroiwa M. Correlation between microhardness and mineral content in sound human enamel. *Caries research*. 1992;26:139-41.
11. Meredith N, Sherriff M, Setchell D, Swanson S. Measurement of the microhardness and Young's modulus of human enamel and dentine using an indentation technique. *Archives of Oral Biology*. 1996;41:539-45.
12. Xu H, Smith D, Jahanmir S, Romberg E, Kelly J, Thompson V, Rekow E. Indentation damage and mechanical properties of human enamel and dentin. *Journal of Dental Research*. 1998;77:472-80.

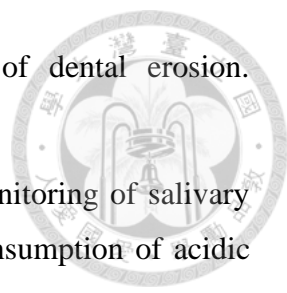
- 
13. Gutiérrez-Salazar MdP, Reyes-Gasga J. Microhardness and chemical composition of human tooth. *Materials Research*. 2003;6:367-73.
 14. Craig RP, Peyton FA. The micro-hardness of enamel and dentin. *Journal of Dental Research*. 1958;37 661-8.
 15. Collys K, Slop D, Cleymaet R, Coomans D, Michotte Y. Load dependency and reliability of microhardness measurements on acid-etched enamel surfaces. *Dental Materials*. 1992;8:332-5.
 16. Chuenarrom C, Benjakul P, Daosodsai P. Effect of indentation load and time on knoop and vickers microhardness tests for enamel and dentin. *Materials Research*. 2009;12:473-6.
 17. Weatherell J, Robinson C, Hallsworth A. Variations in the chemical composition of human enamel. *J Dent Res*. 1974;53:180-92.
 18. He B, Huang S, Zhang C, Jing J, Hao Y, Xiao L, Zhou X. Mineral densities and elemental content in different layers of healthy human enamel with varying teeth age. *Arch Oral Biol*. 2011;56:997-1004.
 19. Cuy JL, Mann AB, Livi KJ, Teaford MF, Weihs TP. Nanoindentation mapping of the mechanical properties of human molar tooth enamel. *Archives of Oral Biology*. 2002;47:281-91.
 20. Darby E. Dental erosion and the gouty diathesis. Are they associated? *Dental Cosmos*. 1892;34:629-40.
 21. Jaeggi T, Lussi A. Prevalence, incidence and distribution of erosion. *Monographs in Oral Science*. 2006;20:44.
 22. Mantonanaki M, Koletsi-Kounari H, Mamai-Homata E, Papaioannou W. Dental erosion prevalence and associated risk indicators among preschool children in Athens, Greece. *Clinical oral investigations*. 2013;17:585-93.
 23. Moimaz S, Araujo P, Chiba F, Garbin C, Saliba N. Prevalence of deciduous tooth erosion in childhood. *International journal of dental hygiene*. 2013;11:226-30.
 24. Sjøvik JB, Tveit AB, Storesund T, Mulic A. Dental erosion: a widespread condition nowadays? A cross-sectional study among a group of adolescents in Norway. *Acta Odontologica Scandinavica*. 2014;72:523-9.

- 
25. Nakane A, Sasaki Y, Miwa Z, Kitasako Y, Tagami J. Prevalence of dental erosion and related factors in the deciduous dentition of Japanese children. *Pediatric Dental Journal*. 2014;24:97-105.
26. Zhang S, Chau AM, Lo EC, Chu C-H. Dental caries and erosion status of 12-year-old Hong Kong children. *BMC public health*. 2014;14:7.
27. Cavadini C, Siega-Riz AM, Popkin BM. US adolescent food intake trends from 1965 to 1996. *Archives of disease in childhood*. 2000;83:18-24.
28. Attin T, Meyer K, Hellwig E, Buchalla W, Lennon AM. Effect of mineral supplements to citric acid on enamel erosion. *Archives of Oral Biology*. 2003;48:753-9.
29. Bundesverband der Deutschen Getränke-Industrie. "Statistik'01" des Bundesverbandes der deutschen Getränke-industrie e.V. Berlin, Germany; 2002.
30. Austin R, Stenhagen K, Hove L, Dunne S, Moazzez R, Bartlett D, Tveit A. A qualitative and quantitative investigation into the effect of fluoride formulations on enamel erosion and erosion-abrasion in vitro. *Journal of dentistry*. 2011;39:648-55.
31. Lussi A, Jaeggi T. Erosion--diagnosis and risk factors. *Clinical oral investigations*. 2008;12 Suppl 1:S5-13.
32. Jensdottir T, Arnadottir I, Thorsdottir I, Bardow A, Gudmundsson K, Theodors A, Holbrook W. Relationship between dental erosion, soft drink consumption, and gastroesophageal reflux among Icelanders. *Clinical oral investigations*. 2004;8:91-6.
33. Holbrook W, Furuholm J, Gudmundsson K, Theodors A, Meurman J. Gastric reflux is a significant causative factor of tooth erosion. *Journal of dental research*. 2009;88:422-6.
34. Kitasako Y, Sasaki Y, Takagaki T, Sadr A, Tagami J. Age-specific prevalence of erosive tooth wear by acidic diet and gastroesophageal reflux in Japan. *Journal of dentistry*. 2015;43:418-23.
35. Corrêa FOB, Sampaio JEC, Rossa Jr C, Orrico SRP. Influence of natural fruit juices in removing the smear layer from root surfaces-an in vitro study. *Journal of the Canadian Dental Association*. 2004:697-702.

- 
36. Mandel L. Dental erosion due to wine consumption. *The Journal of the American Dental Association*. 2005;136:71-5.
37. Suyama Y, Takaku S, Okawa Y, Matsukubo T. Dental erosion in workers exposed to sulfuric acid in lead storage battery manufacturing facility. *The Bulletin of Tokyo Dental College*. 2010;51:77-83.
38. Buczkowska-Radlińska J, Łagocka R, Kaczmarek W, Górski M, Nowicka A. Prevalence of dental erosion in adolescent competitive swimmers exposed to gas-chlorinated swimming pool water. *Clinical oral investigations*. 2013;17:579-83.
39. Rakhmatullina E, Bossen A, Höschele C, Wang X, Beyeler B, Meier C, Lussi A. Application of the specular and diffuse reflection analysis for in vitro diagnostics of dental erosion: correlation with enamel softening, roughness, and calcium release. *Journal of biomedical optics*. 2011;16:107002--12.
40. Brevik S, Lussi A, Rakhmatullina E. A new optical detection method to assess the erosion inhibition by in vitro salivary pellicle layer. *Journal of dentistry*. 2013;41:428-35.
41. Chew H, Zakian C, Pretty I, Ellwood R. Measuring Initial Enamel Erosion with Quantitative Light-Induced Fluorescence and Optical Coherence Tomography: An in vitro Validation Study. *Caries research*. 2014;48:254-62.
42. Magalhães AC, Wiegand A, Rios D, Honório HM, Buzalaf MAR. Insights into preventive measures for dental erosion. *Journal of Applied Oral Science*. 2009;17:75-86.
43. Scaramucci T, Hara AT, Zero DT, Ferreira SS, Aoki IV, Sobral MAP. Development of an orange juice surrogate for the study of dental erosion. *Brazilian dental journal*. 2011;22:473-8.
44. Buzalaf MAR, Pessan JP, Honório HM, Ten Cate JM. Mechanisms of action of fluoride for caries control. *Monographs in oral science*. 2011:97-114.
45. Magalhaes AC, Wiegand A, Rios D, Hannas A, Attin T, Buzalaf MAR. Chlorhexidine and green tea extract reduce dentin erosion and abrasion in situ. *Journal of dentistry*. 2009;37:994-8.

- 
46. Chunmuang S, Jitpukdeebodintra S, Chuenarrom C, Benjakul P. Effect of xylitol and fluoride on enamel erosion in vitro. *J Oral Sci.* 2007;49:293-7.
 47. Nekrashevych Y, Stösser L. Protective influence of experimentally formed salivary pellicle on enamel erosion. An in vitro study. *Caries research.* 2002;37:225-31.
 48. Lussi TJA. Toothbrush abrasion of erosively altered enamel after intraoral exposure to saliva: an in situ study. *Caries research.* 1999;33:455-61.
 49. Voronets J, Jaeggi T, Buergin W, Lussi A. Controlled toothbrush abrasion of softened human enamel. *Caries research.* 2007;42:286-90.
 50. Schlueter N, Hardt M, Lussi A, Engelmann F, Klimek J, Ganss C. Tin-containing fluoride solutions as anti-erosive agents in enamel: an in vitro tin-uptake, tissue-loss, and scanning electron micrograph study. *European journal of oral sciences.* 2009;117:427-34.
 51. Wiegand A, Attin T. Design of erosion/abrasion studies--insights and rational concepts. *Caries research.* 2011;45 Suppl 1:53-9.
 52. Rios D, Honório HM, Magalhães AC, Silva SMBd, Delbem ACB, Machado MAdAM, Buzalaf MAR. Scanning electron microscopic study of the in situ effect of salivary stimulation on erosion and abrasion in human and bovine enamel. *Brazilian oral research.* 2008;22:132-8.
 53. Lippert F, Parker DM, Jandt KD. In situ remineralisation of surface softened human enamel studied with AFM nanoindentation. *Surface Science.* 2004;553:105-14.
 54. Chen ZF, Darvell BW, Leung VW. Hydroxyapatite solubility in simple inorganic solutions. *Arch Oral Biol.* 2004;49:359-67.
 55. Dawes C. What is the critical pH and why does a tooth dissolve in acid? *Journal-Canadian Dental Association.* 2003;69:722-5.
 56. Leung V-H, Darvell B. Artificial salivas for in vitro studies of dental materials. *Journal of dentistry.* 1997;25:475-84.
 57. Anderson P, Hector M, Rampersad M. Critical pH in resting and stimulated whole saliva in groups of children and adults. *International Journal of Paediatric Dentistry.* 2001;11:266-73.

- 
58. Marsh PD. Dental plaque as a biofilm and a microbial community—implications for health and disease. *BMC Oral health*. 2006;6:S14.
59. Barbour ME, Parker DM, Allen GC, Jandt KD. Enamel dissolution in citric acid as a function of calcium and phosphate concentrations and degree of saturation with respect to hydroxyapatite. *European journal of oral sciences*. 2003;111:428-33.
60. Nyvad M. Enamel erosion by some soft drinks and orange juices relative to their pH, buffering effect and contents of calcium phosphate. *Caries research*. 1999;33:81-7.
61. Wang Y-L, Chang C-C, Chi C-W, Chang H-H, Chiang Y-C, Chuang Y-C, Chang H-H, Huang G-F, Liao Y-S, Lin C-P. Erosive potential of soft drinks on human enamel: An in vitro study. *Journal of the Formosan Medical Association*. 2014;113:850-6.
62. West N, Hughes J, Addy M. The effect of pH on the erosion of dentine and enamel by dietary acids in vitro. *Journal of Oral Rehabilitation*. 2001;28:860-4.
63. Reussner G, Coccodrilli Jr G, Thiessen Jr R. Effects of phosphates in acid-containing beverages on tooth erosion. *Journal of dental research*. 1974;54:365-70.
64. Păruș M, Lăcătușu Ș, Dănilă I, Bârlean L, Păduraru C. Evaluation of calcium concentration in solution-in vitro study of fluoride action on dental enamel. *evaluation*. 2004;12:80-5.
65. Margolis H, Moreno E. Kinetics of hydroxyapatite dissolution in acetic, lactic, and phosphoric acid solutions. *Calcified tissue international*. 1992;50:137-43.
66. Feldman M, Barnett C. Relationships between the acidity and osmolality of popular beverages and reported postprandial heartburn. *Gastroenterology*. 1995;108:125-31.
67. Margolis H, Zhang Y, Lee C, Kent R, Moreno E. Kinetics of enamel demineralization in vitro. *Journal of dental research*. 1999;78:1326-35.
68. Barbour M, Parker D, Allen G, Jandt K. Human enamel erosion in constant composition citric acid solutions as a function of degree of saturation with respect to hydroxyapatite. *Journal of oral rehabilitation*. 2005;32:16-21.

- 
69. Meurman J, Gate J. Pathogenesis and modifying factors of dental erosion. *European Journal of Oral Sciences*. 1996;104:199-206.
70. Millward A, Shaw L, Harrington E, Smith A. Continuous monitoring of salivary flow rate and pH at the surface of the dentition following consumption of acidic beverages. *Caries research*. 1997;31:44-9.
71. Hughes J, West N, Parker D, Newcombe R, Addy M. Development and evaluation of a low erosive blackcurrant juice drink in vitro and in situ¹. Comparison with orange juice. *Journal of dentistry*. 1999;27:285-9.
72. Scaramucci T, Hara AT, Zero DT, Ferreira SS, Aoki IV, Sobral MAP. In vitro evaluation of the erosive potential of orange juice modified by food additives in enamel and dentine. *Journal of dentistry*. 2011;39:841-8.
73. Hannig C, Hannig M, Attin T. Enzymes in the acquired enamel pellicle. *European journal of oral sciences*. 2005;113:2-13.