

## 扫描电镜研究牙齿釉质的制样方法

张文定 欧阳连

(中国科学院古脊椎动物与古人类研究所)

釉质是动物体内最硬的组织,它被覆于几乎所有的哺乳动物牙齿冠面,由于它的硬度很高,大大提高了牙齿对食物的粉碎和咀嚼机能。多年来,人们利用各种仪器和方法对釉质的组织学结构和化学成分作了大量的分析和研究,为探讨釉质的发育,进化以及治疗牙齿疾病等方面的应用奠定了基础。

扫描电镜用于牙齿微观结构的研究,扩展了人们对釉质结构的了解,越来越多的古生物学家和口腔医学专家认为釉质在动物的分类和系统发育研究中具有重要作用。扫描电镜由于其制样方法比较简单,放大倍数高、立体感强,可以直接观察样品表面结构等优点而更适合脊椎动物化石材料的研究工作。在国外,研究现生和化石脊椎动物牙齿微观结构的文章日趋增加,国内这方面的工作也已起步。为了促进这一研究工作的深入,本文较详细地介绍了用扫描电镜研究釉质结构的制样方法。

如果研究的样品是牙齿碎片、小牙齿或是牙齿的某个切面,则必须先作包埋。最理想的包埋剂是甲基丙烯酸甲脂一类无色透明树脂,它的渗透性、制成胶块后的透明度和韧性都比较好,当样品研究之后,如需复原,还可以用丙酮把树脂溶去,再得到样品。其它的树脂,如 618 或 6101 树脂也可以用作包埋剂,但透明度不及甲基丙烯酸甲脂,且埋在胶块中的样品不易取出。如果只需观察牙齿釉柱的截面图形,那么就无需包埋和切割,直接在牙齿表面某处磨一个几平方毫米的平面,经过进一步的处理后,就可以观察到釉柱的图形。这种方法可使珍贵的牙齿标本免遭破坏。

包埋好的样品块固化之后,即可按研究目的进行切割。如:当研究人牙的釉质排列结构时,由于釉柱在空间的排列是三维变化的,所以必须作三个方向的切割,即牙齿的纵切,横切和垂直釉柱的截面。

将切好的样品在磨片机上研磨,经粗磨(M20 号金刚砂),细磨(M7 号金刚砂)和抛光三道工序。磨好的样品磨面要在实体镜下检查,不允许样品表面有擦痕。如研究的样品很小,或者当研究釉柱截面结构时,则不宜使用磨片机,可以用一块磨砂玻璃,把金刚砂放在玻璃板上,用手拿着样品在玻璃板上轻磨,一边磨,一边在显微镜下检查,以便控制磨的深度和方向(对于现代人牙,其表面有 10 至 30 微米厚的无结构层,因此样品需磨 30 至 40 微米深才能观察到规则的釉柱图形)。总之,不管用机器磨还是用手磨,一定要注意磨面不能倾斜,否则看到的结构将不是正切面的结构(如圆柱的截面将由于斜切变成椭圆形),会人为地造成研究结果的紊乱。

磨好的样品放在超声波清洗槽中,用乙醇、丙酮或水作清洗剂除去表面沾污物——金刚砂或抛光剂等颗粒,清洗时间约为 5 分钟。未用胶包埋的牙齿或风化较厉害的牙齿慎用超声波清洗,以防牙齿破碎。

用稀酸对清洗后的样品作表面处理,以便蚀刻出表面细微结构。蚀刻时,把稀酸倒入培养皿或小烧杯中,用镊子轻轻夹住样品浸入稀酸溶液中,轻轻晃动样品,同时计时。蚀刻过程要分步进行,即蚀刻 10—20 秒左右,在显微镜下检查一次,直到蚀刻合适为止。

蚀刻好的样品用水彻底冲洗之后,不可再触摸其表面,放入干燥器中,在室温下或适当加温干燥,注意避免灰尘落在样品表面。

将干燥后的样品放入真空镀膜机内,镀大约 300 至 400 Å 厚的金膜,用导电胶粘在样品台上之后,就可以送入扫描电镜中观察。在观察时,要注意调整样品表面与人射电子束之间的夹角,避免因角度反差不同,出现结构上的假象。

在上述的制样方法中,关键的一步是对样品磨面的蚀刻处理。蚀刻的时间、酸溶液的浓度,所处理的样品本身组织结构和石化程度等因素的不同都应在蚀刻时加以考虑,如控制不好,不但看不到样品的真正结构,甚至可能损坏样品。

在此,我们用同一浓度的三种酸,1% 的磷酸,1% 的盐酸和 1% 的硝酸,分别对现代人恒齿釉质的釉柱截面结构作了酸蚀刻试验。

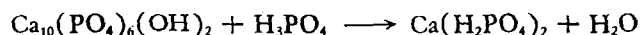
样品取自成人脱落的门齿,前臼齿和臼齿。选择这样牙齿的颊面、牙颈的中部作为磨面(根据现有的对现代人恒齿釉质结构的研究资料,此处釉柱的排列方向几乎垂直于牙齿表面,且不同的人,不同的牙齿,釉柱的截面形状都是“锁孔”形图型),每种酸溶液用三个时间量对样品进行蚀刻,每一个时间量用 2 到 3 个样品,实验结果以电镜照片示之。

图版 I 中图 1、图 4 是酸蚀刻时间为 30 秒的结果。可以看出,由于蚀刻时间较短,表面一层在研磨时被破坏的磷灰石晶体尚未完全溶解,图像显得脏乱,不规则。图 3 的蚀刻时间是 2 分钟,它的图形呈现“蜂巢”状结构,这是明显的蚀刻过度的图形。图 2、图 5、图 6 是三种酸蚀刻时间比较合适的釉柱图形,是典型的现代人的“锁孔”型釉柱结构。从照片来看,图 2、图 6 中的釉柱图形不如图 5 中的规则、均匀。在观察中还发现,图 2 和图 6 中的釉柱结构图型仅占它们样品磨面面积的 20%,而图 5 的图型是样品磨面中较普遍的釉柱图形,约占样品磨面面积的 70%。

分析三种酸对现代人釉柱的蚀刻结果可知,磷酸蚀刻速度较慢,均匀,蚀刻时间的宽容度大(50 秒—100 秒之间,蚀刻出的釉质图形基本不变形),因此适宜作研究釉柱截面结构的蚀刻剂。一般我们所使用的磷酸溶液浓度为 1% 或 0.1M,时间从 50 秒到 100 秒均可。

盐酸和硝酸因蚀刻速度较快等因素不适宜作釉柱截面的蚀刻剂,但在处理釉质的纵切面时,用它们作蚀刻剂也显示出很好的效果,在此就不再多作讨论。

酸对釉质的蚀刻机理和因蚀刻时间的不同而产生多种釉柱图形的解释,目前还未形成统一的看法。我们的初步分析认为,在釉质中占 90% 以上的羟磷灰石晶体与酸的反应可能是以下面的反应方式进行。



羟磷灰石晶体与酸反应生成可溶性盐和水,这种反应可能先起始于耐酸比较弱的部位,即釉柱的中心,然后逐渐向深处、向四周扩展。由于釉柱与柱间质之间的磷灰石结晶

的排列方向不同(见欧阳滢等,未发表),而且柱间质中有机成份和氟的含量可能高于釉柱部份,所以柱间质的耐酸能力高于釉柱,形成了图 2、图 5 中柱间质高于釉柱的图形。当酸蚀刻过程继续进行下去时,釉柱部分因蚀刻的速度快形成孔洞状,而凸起的柱间质因其中的磷灰石成份溶去而变薄,开始收缩、塌陷,象一层保护膜覆盖在下面的柱间质上,使柱间质变厚并提高了它的耐酸能力,这样当蚀刻在某时刻停止时,就看到了图 6 这种釉柱凹进,柱间质凸起的“蜂巢”状结构图形,这种图形不是釉质的真正结构图形,是酸蚀刻过度产生的一种假象。

上述解释只适用于稀酸溶液和较短的蚀刻时间(几分钟之内),对于较浓的酸,由于其蚀刻速度太快,不易控制,我们未予试验。本文所介绍的方法仅是研究牙齿釉质的基础方法,随着研究工作的深入,我们将对各种不同的材料进行试验,逐步加以总结,以建立一套用扫描电镜研究化石样品超微结构的工作方法。

本实验方法曾得到赵资奎,顾玉珉和段雨霞同志的帮助,在此一并表示感谢。

(1988年5月7日收稿)

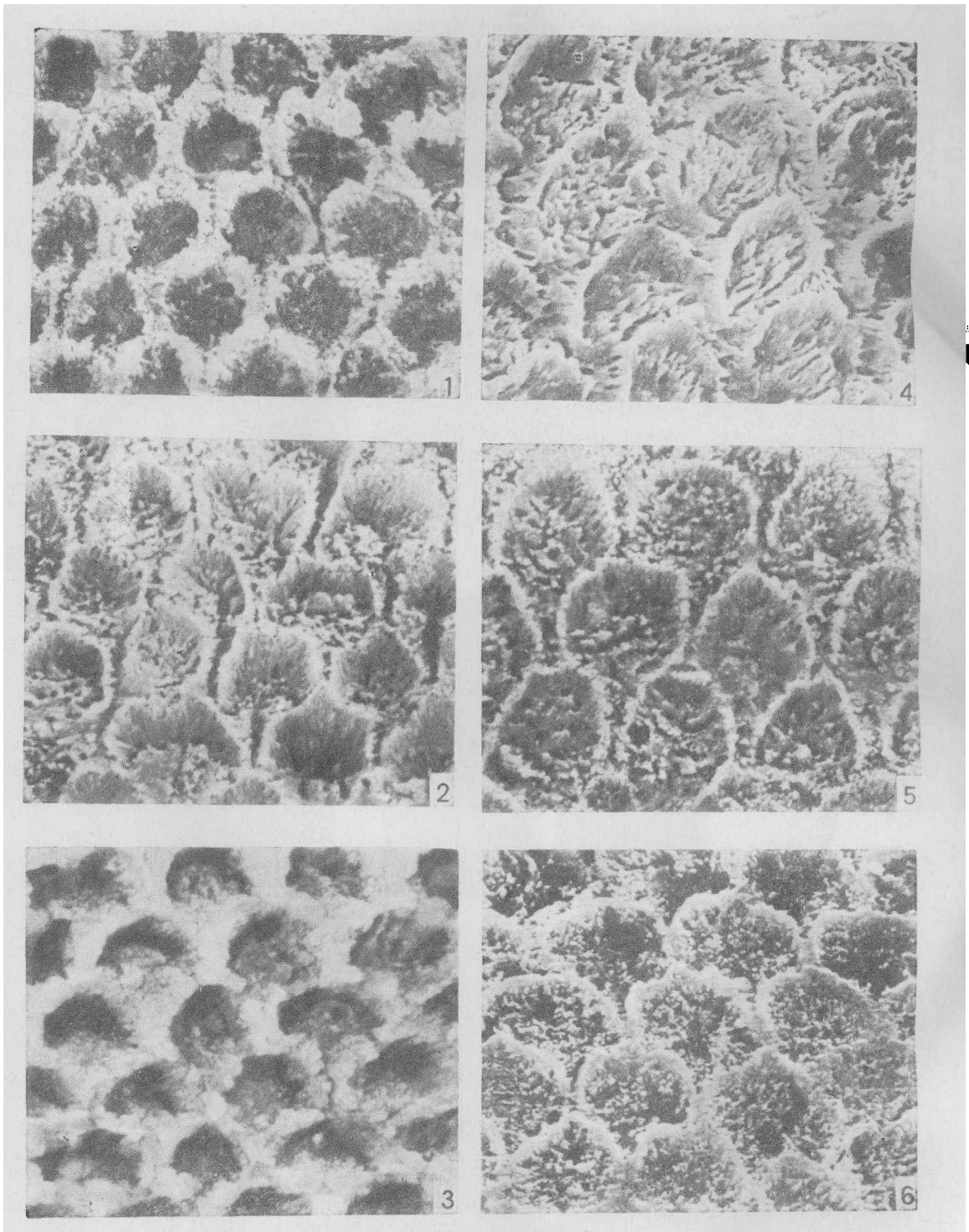
### 参 考 文 献

- Boyde, A., S. J. Jones and P. S. Reynolds, 1978: Quantitative and qualitative studies of enamel etching with acid and EDTA, SEM (II), 991—1002.
- Gantt, D. G., 1979: A method of interpreting enamel prism patterns, SEM(II), 491—496.

## A METHOD OF PREPARATION FOR THE STUDY OF TOOTH ENAMEL WITH SEM

Zhang Wending    Ou Yanglian

(Institute of Vertebrate Paleontology and Paleoanthropology, Academia Sinica)



所有图片均×2600倍。1. 1%盐酸蚀刻30秒；2. 1%盐酸蚀刻60秒；3. 1%盐酸蚀刻2分钟；4. 1%磷酸蚀刻30秒；5. 1%磷酸蚀刻60秒；6. 1%硝酸蚀刻30秒