ผลของยาสีฟันฟลูออไรด์ที่มีแคลเซียมฟอสเฟตและยาสีฟันฟลูออไรด์ 1,000 ส่วนในล้านส่วนต่อความแข็งผิวเคลือบฟันผุ

Effect of fluoride toothpaste containing calcium phosphate and toothpaste containing 1,000 ppm fluoride on surface microhardness of enamel caries

วรัญญู อ่อนสี[1] อรอุมา อังวราวงศ์[2] วรานุช ปิติพัฒน์[3] และธิดารัตน์ อังวราวงศ์[4]

[1]หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต วิชาเอกทันตกรรมสำหรับเด็ก คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น, Warunyoo.ons@kkumail.com

[2]แขนงวิชาทันตกรรมสำหรับเด็ก สาขาวิชาทันตกรรมป้องกัน คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

[3]แขนงวิชาทันตสาธารณสุข สาขาวิชาทันตกรรมป้องกัน คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

[4]สาขาทันตกรรมประดิษฐ์ คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

บทคัดย่อ

การศึกษาในห้องปฏิบัติการนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบผลของยาสีฟันฟลูออไรด์ที่มีแคลเซียมฟอสเฟตและยาสีฟันฟลูออไรด์ 1,000 ส่วนในล้านส่วนต่อความแข็งผิวระดับจุลภาคของเคลือบฟันผุในฟันกรามน้อยของมนุษย์จำนวน 30 ซี่ ซึ่งถูกแบ่งออกเป็น 3 กลุ่มกลุ่มละ 10 ซี่ ได้แก่ กลุ่มที่ 1 คือ กลุ่มควบคุม กลุ่มที่ 2 คือกลุ่มยาสีฟันฟลูออไรด์ 1,000 ส่วนในล้านส่วน และ กลุ่มที่ 3 คือกลุ่มยาสีฟันฟลูออไรด์ที่มีแคลเซียมฟอสเฟต โดยชิ้นงานจะถูกสร้างรอยผุจำลองในชั้นเคลือบฟันและถูกแช่ในสารละลายยาสีฟันในกลุ่มทดลองเป็นเวลา 2 นาทีวันละ 2 ครั้งในระหว่างที่ผ่านวัฏจักรความเป็นกรดด่างเป็นระยะเวลา 10 วัน ยกเว้นกลุ่มควบคุม ทำการวัดค่าความแข็งผิวระดับจุลภาคแบบวิคเกอร์ เป็นค่าความแข็งผิวระดับจุลภาคพื้นฐาน ค่าความแข็งผิวระดับจุลภาคหลังจากสร้างรอยผุจำลองและค่าความแข็งผิวระดับจุลภาคหลังจากผ่านวัฏจักรความเป็นกรดด่าง จากนั้นคำนวนค่าความแข็งผิวระดับจุลภาคที่เปลี่ยนแปลงไป เมื่อเปรียบเทียบค่ามัธยฐานของความแข็งผิวระดับจุลภาคที่เปลี่ยนแปลงไปทั้ง 3 กลุ่มด้วยสถิติ ครัสคัล-วอลลิส ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ผลการศึกษาพบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่าง 3 กลุ่ม ($p < 0.001$) เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มทีละคู่ด้วยสถิติแมนวิทนีย์ ยู ที่ระดับนัยสำคัญ 0.0167 พบว่า ทุกคู่มีค่ามัธยฐานของความแข็งผิวระดับจุลภาคที่เปลี่ยนแปลงไปแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$) สรุปว่า ยาสีฟันฟลูออไรด์ 1,000 ส่วนในล้านส่วนมีความแข็งผิวระดับจุลภาคที่เปลี่ยนแปลงมากกว่ายาสีฟันฟลูออไรด์ที่มีแคลเซียมฟอสเฟต

คำสำคัญ: ความแข็งผิว, ซีพีพี-เอซีพี, ยาสีฟันฟลูออไรด์

ABSTRACT

This laboratory study aimed to compare the effect of fluoride toothpaste containing calcium phosphate and toothpaste containing 1,000 ppm fluoride on surface microhardness of enamel caries. Human premolar specimens (n=30) were randomly assigned to 3 groups (n=10): control (group 1), toothpaste containing 1,000 ppm fluoride (group 2), and toothpaste containing calcium phosphate (group 3). Artificial enamel caries specimens were immersed in dentifrice slurry twice a day for 2 minutes during a 10-day pH-cycling in treatment groups, except for the control group. Vicker's microhardness measurements were obtained at baseline followed by after artificial caries formation and after pH-cycling. The surface hardness recovery was calculated. The median of surface hardness recovery of 3 groups were analyzed by Kruskal-Wallis at significant level 0.05 (α= 0.05), results showed statistical differences in surface hardness recovery were found among 3 groups ($p < 0.001$). The surface hardness recovery of each pair was compared by Mann-Whitney U test at significant level 0.0167 (α=0.0167) and it was found that there were significant differences for all pairs ($p < 0.001$). In conclusion, toothpaste containing 1,000 ppm fluoride had higher surface hardness recovery than toothpaste containing calcium phosphate.

Keywords: CPP-ACP, Fluoride Toothpaste, Surface Microhardness

1. บทนำ

ปัจจุบันโรคฟันผุยังคงเป็นปัญหาด้านทันตสาธารณสุขที่สำคัญในประเทศไทย จากผลการสำรวจสภาวะสุขภาพช่องปากแห่งชาติครั้งล่าสุด พบว่ากลุ่มเด็กและวัยรุ่นมีความชุกของโรคฟันผุร้อยละ 52.9-75.6 (กรมอนามัย, 2561) โรคฟันผุนั้นจะเปลี่ยนแปลงตลอดเวลา เป็นกระบวนการขาดความสมดุลระหว่างปัจจัยที่ทำให้เกิดโรคและปัจจัยป้องกัน ซึ่งกระบวนการเกิดโรคจะเริ่มจากการเกิดการสูญเสียแร่ธาตุในระดับอะตอม จากนั้นพัฒนาเป็นรอยโรคจุดขาว (white spot lesion) ซึ่งเป็นรอยโรคที่มีการสูญเสียแร่ธาตุใต้ผิวเคลือบฟันโดยบริเวณผิวเคลือบฟันยังสมบูรณ์ ฟันผุระยะเริ่มต้นยังไม่เกิดเป็นโพรงฟันสามารถทำให้เกิดการหยุดหรือผันกลับของรอยโรคได้ด้วยการส่งเสริมการคืนกลับแร่ธาตุ (Featherstone, 2008)

การใช้ยาสีฟันฟลูออไรด์เป็นมาตรการป้องกันฟันผุได้อย่างมีประสิทธิภาพและใช้อย่างแพร่หลาย (Zero, Marinho, & Phantumvanit, 2012) จากการศึกษาของ Cochrane ในปี ค.ศ. 2019 ซึ่งทบทวนวรรณกรรมอย่างเป็นระบบจำนวน 96 การศึกษาในฟันแท้ของเด็กและวัยรุ่น พบว่ายาสีฟันฟลูออไรด์ที่มีความเข้มข้นของฟลูออไรด์ 1,000-1,250 ส่วนในล้านส่วน ช่วยลดการเพิ่มขึ้นของฟันผุเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ยาสีฟันที่ไม่มีส่วนผสมของฟลูออไรด์ (Walsh, Worthington, Glenny, Marinho, & Jeroncic, 2019)

ปัจจุบันได้มีเทคโนโลยีใหม่ที่ช่วยพัฒนาประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ที่ใช้ในการดูแลช่องปาก ซึ่งมีแนวคิดช่วยเสริมประสิทธิภาพในการป้องกันฟันผุมากยิ่งขึ้น ทำให้มีการนำเสนอผลิตภัณฑ์ดูแลช่องปากเป็นทางเลือกแก่ผู้บริโภคมากกว่าในอดีต แคลเซียมฟอสเฟตถูกนำมาเติมในผลิตภัณฑ์ที่ใช้ดูแลช่องปาก ตัวอย่างของสารที่มีส่วนช่วยในการคืนกลับแร่ธาตุนอกจากฟลูออไรด์ได้แก่ เคซีอีนฟอสโฟเพพไทด์ อะมอร์ฟัสแคลเซียมฟอสเฟต (CPP-ACP) ซึ่งมีคุณสมบัติในการคืนกลับแร่ธาตุใต้ผิวฟันในชั้นเคลือบฟันและยับยั้งการสูญเสียแร่ธาตุ (Cochrane, Cai, Huq, Burrow, & Reynolds, 2010) เมื่อมีฟลูออไรด์ แคลเซียมและฟอสเฟต ซีพีพีสามารถทำปฏิกิริยาได้เป็น เคซีอีนฟอสโฟ

เพพไทด์ อะมอร์ฟัสแคลเซียมฟลูออไรด์ฟอสเฟต (CPP-ACFP) ซึ่งจะป้องกันไม่ให้เกิดการสะสมแร่ธาตุอย่างรวดเร็วบนพื้นผิวของรอยโรคฟันผุ โดยการค่อย ๆ ปลดปล่อย แคลเซียม ฟลูออไรด์ และฟอสเฟตไอออน (Cross, Huq, & Reynolds, 2007) ซึ่งกลไกในการส่งเสริมการคืนกลับแร่ธาตุของซีพีพี-เอซีพี เกิดจาก ซีพีพี-เอซีพี สามารถปลดปล่อยแคลเซียมและฟอสเฟตไอออนเมื่อค่าความเป็นกรดด่างลดลง หรือเมื่อมีแคลเซียมและฟอสเฟตที่อยู่ในรูปอิสระในสารละลายลดลง แคลเซียมและฟอสเฟตในรูปอิสระที่ออกมาจะมีการรวมตัวกันในรูปสารประกอบที่ไม่มีประจุเป็น $CaHPO_4^0$ และเมื่อมีฟลูออไรด์จะได้สารประกอบที่ไม่มีประจุเป็น $CaH_2FPO_4^0$ และ HF^0 ด้วยรูปของสารประกอบที่ไม่มีประจุทำให้ไม่ถูกขัดขวางจากประจุของผิวฟัน และสามารถแพร่เข้าสู่รอยโรคใต้ผิวฟัน โดยระหว่างที่แพร่เข้าสู่ผิวฟันสารประกอบจะเกิดการแตกตัวได้แคลเซียมและฟอสเฟตไอออน ส่งผลให้เกิดการสร้างผลึกไฮดรอกซีอะพาไทต์ และเมื่อมีฟลูออไรด์จะสามารถเกิดเป็นผลึกฟลูออโรอะพาไทต์ (Cochrane & Reynolds, 2009)

จากการทบทวนวรรณกรรม มีการทดลองแบบสุ่มและมีกลุ่มควบคุมที่ใช้ผลิตภัณฑ์ดูแลช่องปากที่มีซีพีพี-เอซีพี ร้อยละ 2 ร่วมกับยาสีฟันฟลูออไรด์ 1,100 ส่วนในล้านส่วนในการป้องกันการสูญเสียแร่ธาตุ ผลการศึกษาพบว่ามีผลส่งเสริมการคืนกลับแร่ธาตุได้ดีกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ยาสีฟันฟลูออไรด์ 1,100 ส่วนในล้านส่วนเพียงอย่างเดียว (Reynolds et al., 2008; Sinfiteli et al., 2017) ขณะที่บางการศึกษาให้ผลขัดแย้ง โดยพบว่าการใช้ผลิตภัณฑ์ดูแลช่องปากที่มีซีพีพี-เอซีพี ร่วมกับยาสีฟันฟลูออไรด์ให้ผลในการคืนกลับแร่ธาตุไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้ใช้ผลิตภัณฑ์ที่ช่วยในการส่งเสริมการคืนกลับแร่ธาตุ (Pinto de Souza et al., 2018; Pulido et al., 2008)

จึงเป็นที่มาของการศึกษาในครั้งนี้ เพื่อศึกษาผลของการใช้ยาสีฟันฟลูออไรด์ที่มีส่วนประกอบของแคลเซียมฟอสเฟต และยาสีฟันฟลูออไรด์ที่มีปริมาณฟลูออไรด์ 1,000 ส่วนในล้านส่วนต่อความแข็งผิวของเคลือบฟันในฟันผุระยะเริ่มต้นว่ามีความแตกต่างกันหรือไม่ เพื่อเป็นหนึ่งในปัจจัยในการตัดสินใจเลือกใช้ยาสีฟันเพื่อส่งเสริมการคืนกลับแร่ธาตุในการป้องกันฟันผุในระยะเริ่มต้น

2. วัตถุประสงค์การวิจัย

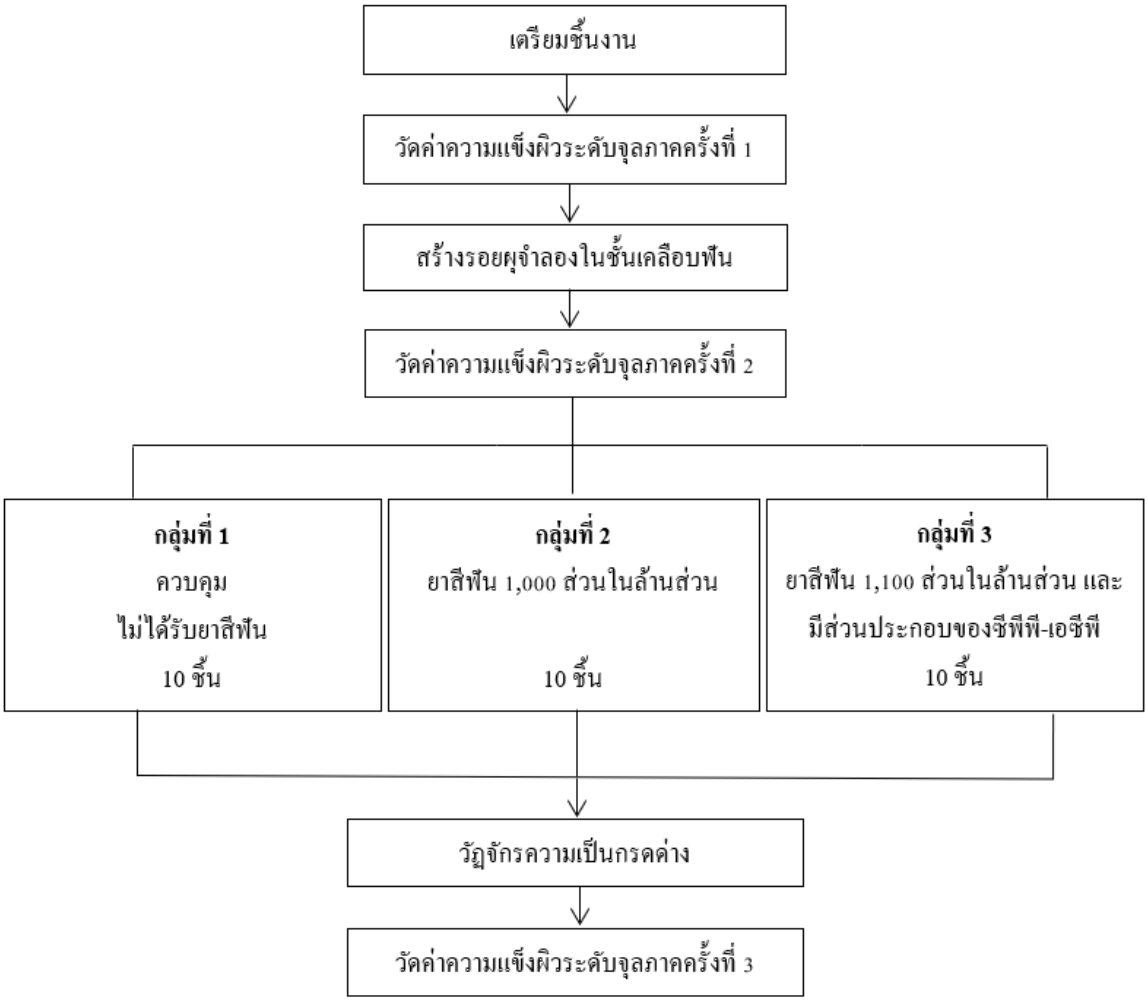
เพื่อศึกษาเปรียบเทียบค่าความแข็งผิวระดับจุลภาคที่เปลี่ยนแปลงไปของรอยผุจำลองในบริเวณผิวเคลือบฟันก่อนและหลังการใช้ยาสีฟันฟลูออไรด์ที่มีส่วนประกอบของแคลเซียมฟอสเฟต กับยาสีฟันฟลูออไรด์ที่มีส่วนประกอบของฟลูออไรด์ 1,000 ส่วนในล้านส่วน

3. การดำเนินการวิจัย

การศึกษานี้เป็นการวิจัยในห้องปฏิบัติการ โดยมีแผนผังดำเนินการวิจัยดังแสดงในรูปที่ 1 ซึ่งก่อนเริ่มทำการศึกษาได้ผ่านการพิจารณาจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น หมายเลขสำคัญของโครงการ HE632060

กลุ่มตัวอย่าง คือ ฟันกรามน้อยของมนุษย์ จำนวน 30 ซี่ มีเกณฑ์การคัดเลือกกลุ่มตัวอย่างในการศึกษา โดยมีเกณฑ์การคัดเข้า คือ ฟันกรามน้อยของมนุษย์ที่ถูกถอนด้วยเหตุผลการจัดฟันที่มีสภาพฟันสมบูรณ์ ซึ่งถูกเก็บรักษาในสารละลายไทมอลร้อยละ 0.1 (0.1 % thymol) ที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลาไม่เกิน 6 เดือน และเกณฑ์การคัดออก คือ ฟันกรามน้อยที่มีรอยโรคฟันผุ มีความผิดปกติของเคลือบฟัน มีรอยสึก รอยร้าว แตก หรือมีวัสดุบูรณะ หรือ เป็นฟันที่ได้รับการรักษารากฟันมาก่อน

ฟันที่เป็นไปตามเกณฑ์การศึกษา จะถูกทำความสะอาด กำจัดคราบหินปูนและเอ็นยึดปริทันต์ และตัดแบ่งส่วนตัวฟันออกจากรากฟันด้วยเครื่องตัดฟันความเร็วต่ำ (Mecatome T180, Brié-et-Angonnes, France) จะได้เป็นชิ้นงาน นำชิ้นงานที่ตัดมายึดด้วยอิพอกซีเรซิน (epoxy resin) ในท่อพีวีซีขนาด 18 มิลลิเมตร โดยให้ส่วนของเคลือบฟันด้านแก้มโผล่พ้นจากท่อพีวีซีประมาณ 1 มิลลิเมตร และขนานกับฐานของท่อพีวีซี กำหนดพื้นที่สี่เหลี่ยมจัตุรัสขนาด 3x3 มิลลิเมตรบนกึ่งกลางผิวเคลือบฟันด้านแก้ม ขัดบริเวณที่กำหนดด้วยกระดาษทรายน้ำ เรียงจากเบอร์ 800 1,000 2,000 และ 4,000 ตามลำดับด้วยเครื่องขัดผิววัสดุชนิดจานหมุน (Ecomet®3, Buehler, USA) ที่ความเร็วรอบ 40 รอบต่อนาที ในแต่ละครั้งของการขัดกระดาษทรายน้ำจะใช้เวลา 1 นาทีต่อเบอร์ จากนั้นเคลือบผิวฟันด้วยน้ำยาทาเล็บสีแดง ยกเว้นบริเวณพื้นที่สี่เหลี่ยมจัตุรัสขนาด 3x3 มิลลิเมตรบนกึ่งกลางผิวเคลือบฟันด้านแก้มที่กำหนด ดังแสดงในรูปที่ 2



รูปที่ 1 แผนผังดำเนินงานวิจัย

Figure 1 experimental procedure

รูปที่ 2 ชิ้นงานตัวอย่างที่เตรียม

Figure 2 sample preparation

การแบ่งกลุ่มทดลอง

ชิ้นงาน 30 ชิ้นจะถูกสุ่มเข้ากลุ่มการทดลองโดยใช้การสุ่มตัวอย่างแบบง่าย (simple random sampling) แบ่งทั้งหมดเป็น 3 กลุ่ม จำนวนกลุ่มละ 10 ชิ้น ได้แก่

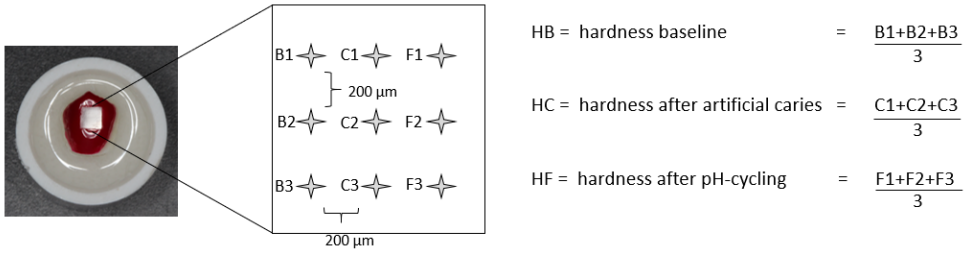
1. กลุ่มควบคุม คือ กลุ่มที่ไม่ได้รับยาสีฟัน

2. กลุ่มยาสีฟันที่มีฟลูออไรด์ 1,000 ส่วนในล้านส่วน คือ ยาสีฟันที่มีส่วนประกอบของฟลูออไรด์ 1,000 ส่วนในล้านส่วน ยี่ห้อคอลเกต ริ้วใสเย็นสดชื่น (Colgate® Double cool stripe, Colgate-Palmolive, Thailand) lot 180320TH111I สารออกฤทธิ์ได้แก่ โซเดียมฟลูออไรด์ ร้อยละ 0.2

3. กลุ่มยาสีฟันฟลูออไรด์ที่มีแคลเซียมฟอสเฟต คือ ยาสีฟันที่มีส่วนประกอบของฟลูออไรด์ 1,100 ส่วนในล้านส่วน และมีส่วนประกอบของ ซีพีพี-เอซีพี ยี่ห้อ MI Paste (MI Paste® ONE RECALDENT™, GC America, USA) lot 190917C สารออกฤทธิ์ได้แก่ โซเดียมฟลูออไรด์ ร้อยละ 0.24 และซีพีพี-เอซีพี ร้อยละ 10

การวัดค่าความแข็งผิวระดับจุลภาคของเคลือบฟัน

กำหนดแถวบนผิวฟันในพื้นที่สี่เหลี่ยมจัตุรัสขนาด 3x3 มิลลิเมตรบนกึ่งกลางของผิวเคลือบฟันด้านแก้มเป็น 3 แถวโดยกำหนดให้แถวที่ 1 ใช้วัดค่าความแข็งผิวระดับจุลภาคของเคลือบฟันเป็นข้อมูลพื้นฐานโดยใช้เครื่องทดสอบความแข็งผิวระดับจุลภาคแบบวิคเกอร์ (Vickers microhardness tester; Future-tech Model FX-800®, Japan) ใช้แรงกด 100 กรัมเป็นเวลา 15 วินาทีทำการทดสอบจำนวน 3 รอยกดในแนวตั้ง เป็นแถวที่ 1 โดยมีระยะห่างระหว่างรอยกด 200 ไมโครเมตร ความกว้างของรอยกดจะถูกคำนวณเป็นค่าความแข็งผิวแบบวิคเกอร์โดยโปรแกรม FT-ARS เวอร์ชั่น 1.15.13, Future-tech, Kanakawa, Japan บันทึกค่าที่ได้ โดยการวัดทั้งหมด 3 ครั้ง จากนั้นนำค่าที่ได้มาหาค่าเฉลี่ยความแข็งผิวระดับจุลภาคของเคลือบฟัน เรียกว่า ค่าความแข็งผิวระดับจุลภาคพื้นฐาน (Hardness baseline, HB) ดังแสดงในรูปที่ 3



รูปที่ 3 การวัดค่าความแข็งผิวระดับจุลภาคของเคลือบฟัน

Figure 3 measurement of enamel surface microhardness

การสร้างรอยผุจำลองในชั้นเคลือบฟัน

นำชิ้นงานทั้งหมดแช่ในสารละลายที่สร้างรอยผุจำลองของชั้นเคลือบฟัน ซึ่งเป็นโพลิเมอร์สังเคราะห์รูปแบบเจล (synthetic polymer gel) ซึ่งดัดแปลงจากการศึกษาของ White (White, 1987) ซึ่งประกอบด้วยกรดแลคติก 0.1 โมลต่อลิตร ไฮดรอกซี่อะพาไทต์ 500 มิลลิกรัมต่อลิตร คาร์โบพอล 20 กรัมต่อลิตร ปรับความเป็นกรดด่างให้ได้เท่ากับ 5.0 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 โมลาร์โดยใช้ปริมาณ 3 มิลลิลิตรต่อชิ้น เป็นระยะเวลา 12 ชั่วโมงในตู้ควบคุมอุณหภูมิและความชื้นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (TK series, Ankara, Turkey) เมื่อครบ 12 ชั่วโมงนำชิ้นงานมาล้างด้วยน้ำปราศจากไอออนเป็นเวลา 20 วินาที และซับให้แห้งด้วยกระดาษทิชชู จากนั้นทำการวัดค่าความแข็งผิวระดับจุลภาคของเคลือบฟันหลังจากสร้างรอยผุจำลองในชั้นเคลือบฟันทั้งหมด 3 รอยกด ในแนวตั้ง เป็นแถวที่ 2 ดังแสดงในรูปที่ 3 บันทึกค่าที่ได้แล้วนำมาหาค่าเฉลี่ยความแข็งผิวระดับจุลภาคของเคลือบฟัน เรียกว่า ค่าความแข็งผิวระดับจุลภาคหลังจากสร้างรอยผุจำลอง (Hardness after artificial caries, HC) ดังแสดงในรูปที่ 2 จากนั้นเก็บรักษาในน้ำลายเทียม โดยน้ำลายเทียมประกอบด้วย โพแทสเซียมคลอไรด์ 0.65 กรัมต่อลิตร แมกนีเซียมคลอไรด์ 0.058 กรัมต่อลิตร แคลเซียมคลอไรด์ 0.165 กรัมต่อลิตร ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.804 กรัมต่อลิตร โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.365 กรัมต่อลิตร โซเดียมเบนโซเอต 2 กรัมต่อลิตร โซเดียมคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส บีพี 7.8 กรัมต่อลิตร เติมน้ำปราศจากไอออนให้ได้ปริมาตร 1 ลิตร ปรับความเป็นกรดด่างให้ได้เท่ากับ 6.73 (Panich & Poolthong, 2009)

การใช้ยาสีฟันและวัฏจักรความเป็นกรดด่าง (pH-cycling)

วัฏจักรความเป็นกรดด่าง (pH-cycling) แต่ละรอบประกอบด้วย การแช่สารละลายดีมินเนอเรอไลเซชั่น (demineralized solution) 3 ชั่วโมง สารละลายรีมินเนอเรอไลเซชั่น (remineralized solution) 2 ชั่วโมง สารละลายดีมินเนอเรอไลเซชั่น 3 ชั่วโมง และสารละลายรีมินเนอเรอไลเซชั่น 15 ชั่วโมง ตามลำดับเป็นเวลา 10 วัน (White & Nancollas, 1990) สารละลายดีมินเนอเรอไลเซชั่น ประกอบไปด้วย แคลเซียมคลอไรด์ 2.2 มิลลิโมล โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 2.2 มิลลิโมล และ กรดอะซิติก 0.05 โมล ปรับค่าความเป็นกรดด่างให้เท่ากับ 5.0 ด้วยโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ 1 โมล ส่วนสารละลายรีมินเนอเรอไลเซชั่น นั้นประกอบไปด้วย แคลเซียมคลอไรด์ 1.5 มิลลิโมล โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.9 มิลลิโมล และโพแทสเซียมคลอไรด์ 0.15 โมล ปรับค่าความเป็นกรดด่างให้เท่ากับ 7.0 ด้วยโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ 1 โมล ดัดแปลงจากการศึกษาของ ten Cate & Duijister (ten Cate & Duijsters, 1982) ชิ้นงานในกลุ่มที่ 2 และ กลุ่มที่ 3 หลังจากแช่สารละลายดีมินเนอเรอไลเซชั่น 3 ชั่วโมง ก่อนจะแช่ในสารละลายรีมินเนอเรอไลเซชั่น ชิ้นงานจะถูกแช่ในสารละลายยาสีฟัน (toothpaste slurry) ปริมาณ 4 มิลลิลิตรต่อชิ้นงาน เป็นเวลา 2 นาที ขณะที่กลุ่มควบคุมจะแช่ในน้ำปราศจากไอออน โดยสารละลายยาสีฟันเตรียมโดยผสมน้ำปราศจากไอออนกับยาสีฟันในอัตราส่วน 3 ต่อ 1 โดยน้ำหนัก เมื่อครบ 2 นาทีทำการล้างฟันด้วยน้ำปราศจากไอออนเป็นเวลา 20 วินาที ชิ้นงานจะได้รับสารละลายยาสีฟันวันละ 2 ครั้งเมื่อครบ 10 วัน ทำการวัดค่าความแข็งผิวระดับจุลภาคของเคลือบฟัน 3 รอยกดในแนวตั้ง เป็นแถวที่ 3 ดังแสดงในรูปที่ 3 บันทึกค่าที่ได้และนำมาหาค่าความแข็งผิวระดับจุลภาคหลังจากผ่านวัฏจักรความเป็นกรดด่าง (Hardness after pH-cycling, HF) จากนั้นนำมาหาค่าความแข็งผิวระดับจุลภาคที่เปลี่ยนแปลงไป (Surface hardness recovery, HR) โดยคำนวณได้จาก

$$\text{Surface hardness recovery (HR)} = \frac{(HF - HC) \times 100}{(HB - HC)}$$

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์ข้อมูลทั้งหมดที่ได้ด้วยโปรมแกรมคำนวณสถิติ IBM SPSS Statistics 23 for Windows ประกอบด้วย

สถิติเชิงพรรณนา แสดง ค่าเฉลี่ย (mean) ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation) มัธยฐาน (median) ค่าต่ำสุด (minimum) ค่าสูงสุด (maximum) และ อินเตอร์ควอไทล์ 1 (Q1) และอินเตอร์ควอไทล์ 3 (Q3) ของค่าความแข็งผิวระดับจุลภาคของเคลือบฟันที่ได้รับการทดสอบ

สถิติเชิงอนุมาน วิเคราะห์การกระจายหรือการแจกแจงของข้อมูล โดยเลือกใช้สถิติชาปิโรวิลล์ (Shapiro-Wilk Test) พบว่าข้อมูลมีการแจกแจงไม่ปกติ จึงทำการเปรียบเทียบค่ามัธยฐานของค่าความแข็งผิวระดับจุลภาคที่เปลี่ยนแปลงไป (HR) ระหว่าง 3 กลุ่มทดลองด้วยสถิติครัสคัล-วอลลิส (Kruskal-Wallis Test) ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 และมีการเปรียบเทียบค่ามัธยฐานทีละคู่ด้วยสถิติแมนวิทนีย์ ยู (Mann-whitney U Test) ที่ระดับนัยสำคัญ 0.0167 โดยมีการปรับค่าเพื่อชดเชย การเปรียบเทียบหลาย ๆ คู่ (multiple comparison)โดยปรับค่านัยสำคัญด้วยวิธีบอนเฟอร์โรนี (Bonferroni adjustment)

4. ผลการวิจัย

ทำการทดลองวัดค่าความแข็งผิวระดับจุลภาคของเคลือบฟันที่แตกต่างกันในสามกลุ่มการศึกษาโดยแสดงค่าเฉลี่ย ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน มัธยฐาน ค่าต่ำสุด ค่าสูงสุด อินเตอร์ควอไทล์ 1 และ 3 (ดังแสดงในตารางที่ 1) จากการวัดค่าความแข็งผิวระดับจุลภาคพื้นฐานของเคลือบฟัน พบว่า ค่าความแข็งผิวระดับจุลภาคพื้นฐาน (HB) ทุกกลุ่ม มีค่าใกล้เคียงกัน (ค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน) คือ กลุ่มควบคุมเท่ากับ 341.23 ± 9.41 กลุ่มที่ 2 เท่ากับ 334.40 ± 5.00 และกลุ่มที่ 3 เท่ากับ 337.16 ± 4.88 หลังจากผ่านวัฏจักรความเป็นกรดด่าง พบว่าค่าความแข็งผิวระดับจุลภาคหลังจากผ่านวัฏจักรความเป็นกรดด่าง (HF) ในกลุ่มควบคุมเท่ากับ 40.90 ± 29.89 กลุ่มที่ 2 มีค่าเท่ากับ 162.54 ± 32.06 และกลุ่มที่ 3 มีค่าเท่ากับ 96.08 ± 71.37 ส่วนค่าความแข็งผิวระดับจุลภาคที่เปลี่ยนแปลงไป (HR) พบว่า กลุ่มที่ 2 มีค่าสูงที่สุด คือ 6.19 ± 5.31 ส่วนกลุ่มที่ 1 ซึ่งเป็นกลุ่มควบคุมมีค่าต่ำสุดคือ -63.98 ± 3.76 ดังแสดงในตารางที่ 1

เมื่อทำการเปรียบเทียบค่าความแข็งผิวระดับจุลภาคพื้นฐาน (HB) และค่าความแข็งผิวระดับจุลภาคหลังจากสร้างรอยผุจำลอง (HC) ระหว่าง 3 กลุ่มด้วยสถิติครัสคัล-วอลลิสที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 พบว่าทั้ง 3 กลุ่มมีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p=0.225, p=0.393 ตามลำดับ) หลังจากผ่านวัฏจักรความเป็นกรดด่าง เปรียบเปรียบเทียบค่าความแข็งผิวระดับจุลภาคที่เปลี่ยนแปลงไป (HR) ทั้ง 3 กลุ่ม พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่าง 3 กลุ่ม (p < 0.001) เมื่อวิเคราะห์เปรียบเทียบค่าความแข็งผิวระดับจุลภาคที่เปลี่ยนแปลงไปทีละคู่ด้วยสถิติแมนวิทนีย์ ยู ที่ระดับนัยสำคัญ 0.0167 โดยปรับค่านัยสำคัญด้วยวิธีบอนเฟอร์โรนี พบว่าทุกคู่มีค่ามัธยฐานของความแข็งผิวระดับจุลภาคที่เปลี่ยนแปลงไปแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p < 0.001) ดังแสดงในรูปที่ 4

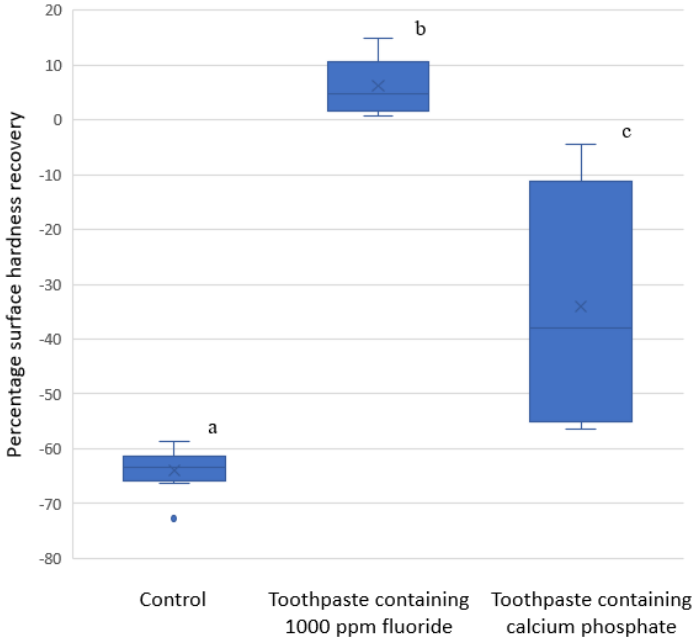
ตารางที่ 1 สถิติเชิงพรรณนาของค่าความแข็งผิวระดับจุลภาคของเคลือบฟัน

Table 1 Descriptive statistics of enamel surface microhardness

Hardness measurement	Statistics	Groups		
		Control	Toothpaste containing 1,000 ppm fluoride	Toothpaste containing calcium phosphate
Hardness baseline (HB)	mean	341.23	334.40	337.16
	standard deviation	9.41	5.00	4.88
	median	341.24 [a]	334.70 [a]	335.14 [a]
	minimum	329.20	326.71	332.55
	maximum	359.54	343.86	346.55
	Q1	331.91	329.81	333.19
	Q3	347.71	337.28	341.43
Hardness after artificial caries (HC)	mean	157.94	152.32	161.00
	standard deviation	18.01	24.86	23.98
	median	147.99 [a]	138.30 [a]	161.69 [a]
	minimum	137.82	124.71	131.88
	maximum	187.25	188.65	191.92
	Q1	144.78	133.39	138.76
	Q3	176.79	178.02	183.08
Hardness after pH-cycling (HF)	mean	40.90	162.54	96.08
	standard deviation	29.89	32.06	71.37
	median	18.23 [a]	143.76 [b]	89.16 [c]
	minimum	18.23	126.38	22.45
	maximum	84.88	210.76	175.57
	Q1	18.23	138.33	28.30
	Q3	76.20	195.07	170.82
Surface hardness recovery (HR)	mean	-63.98	6.19	-34.10
	standard deviation	3.76	5.31	22.83
	median	-63.34 [a]	4.79 [b]	-37.91 [c]
	minimum	-72.75	0.72	-56.38
	maximum	-58.75	14.74	-4.48
	Q1	-65.77	1.52	-55.13
	Q3	-61.42	10.49	-11.21

หมายเหตุ : อักษรตัวยกต่างกันในแนวนอนแสดงว่าในระหว่างกลุ่มมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$)

Note: Different superscript letters in the same row indicate significant differences between groups ($p < 0.01$)



หมายเหตุ : อักษรตัวยกต่างกันแสดงว่าในระหว่างกลุ่มมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$)

Note: Different letters indicate significant differences between groups ($p < 0.01$)

รูปที่ 4 ค่ามัธยฐาน และการกระจายข้อมูลของความแข็งผิวระดับจุลภาคที่เปลี่ยนแปลงไป

Figure 4 Median and distribution of surface hardness recovery

5. การอภิปรายผล

การศึกษาผลของยาสีฟันต่อเคลือบฟันผุในห้องปฏิบัติการ มีการประเมินผลได้หลายวิธีการ เช่น การวัดความลึกของรอยโรคฟันผุ การวัดค่าความแข็งผิวแบบนูบ (knoop hardness) การวัดปริมาณไอออนในสารละลาย เป็นต้น ส่วนการประเมินค่าความแข็งผิวระดับจุลภาคแบบวิกเกอร์นั้น ก็เป็นวิธีที่นิยมใช้ในการวัดคุณสมบัติเชิงกลในฟันมนุษย์ (Gutiérrez-Salazar & Reyes-Gasga, 2003) แม้การวัดวิธีนี้จะเป็นการวัดการคืนกลับแร่ธาตุแบบทางอ้อม แต่วิธีการนี้ มีข้อดี คือ ทำง่าย และต้องการพื้นที่ทดสอบไม่มาก (Chuenarrom, Benjakul, & Daosodsai, 2009) แต่การประเมินค่าความแข็งผิวระดับจุลภาคแบบวิกเกอร์นั้นจะต้องให้ชิ้นงานที่ทดสอบมีลักษณะเป็นพื้นผิวเรียบ และได้ระนาบเดียวกัน (Arends & ten Bosch, 1992)

การศึกษาครั้งนี้เลือกศึกษาเปรียบเทียบระหว่างยาสีฟันฟลูออไรด์ 1,000 ส่วนในล้านส่วนกับยาสีฟันฟลูออไรด์ที่มีแคลเซียมฟอสเฟต เนื่องจากมีการศึกษาที่ยืนยันผลของยาสีฟันฟลูออไรด์ 1,000 ส่วนในล้านส่วนแล้วว่ามีประสิทธิภาพในการป้องกันฟันผุอย่างชัดเจน (Walsh et al., 2019) และมีปริมาณฟลูออไรด์ในยาสีฟันที่มีจำหน่ายทั่วไปในประเทศไทย ส่วนยาสีฟันฟลูออไรด์ที่มีแคลเซียมฟอสเฟตเป็นผลิตภัณฑ์ในรูปแบบใหม่ และเป็นรูปแบบที่ใช้เป็นยาสีฟันในขั้นตอนการแปรงฟันเช่นเดียวกัน จึงเป็นการเปรียบเทียบในรูปแบบของผลิตภัณฑ์ทำความสะอาดฟันที่ช่วยส่งเสริมการคืนกลับแร่ธาตุ

ผลการศึกษาครั้งนี้ พบว่าค่าความแข็งผิวระดับจุลภาคภายหลังจากผ่านวัฏจักรความเป็นกรดด่างในกลุ่มยาสีฟันฟลูออไรด์ 1,000 ส่วนในล้านส่วนแตกต่างจากกลุ่มควบคุม เนื่องจากกลุ่มควบคุมไม่ได้รับสารที่ช่วยในการส่งเสริมการคืนกลับแร่ธาตุขณะที่ผ่านวัฏจักรความเป็นกรดด่าง สอดคล้องกับการศึกษาของ Sinfiteli และคณะ ซึ่งเป็นการทดลองที่มีวัฏจักรความเป็นกรดด่างและใช้ยาสีฟันฟลูออไรด์ 1,100 ส่วนในล้านส่วนเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ใช้น้ำลายเทียม พบว่ายาสีฟันฟลูออไรด์ 1,100 ส่วนในล้านส่วนมีค่าความแข็งผิวสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยฟลูออไรด์ช่วยลดความพรุน และลดการละลายของเคลือบฟันระหว่างที่สัมผัสกรด (Sinfiteli et al., 2017) กลุ่มยาสีฟันฟลูออไรด์ที่มีแคลเซียมฟอสเฟตแสดงถึงความสามารถในการส่งเสริมการคืนกลับแร่ธาตุในฟันผุระยะเริ่มต้นได้ดีกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม สอดคล้องกับการศึกษาของ Sinfiteli และคณะ และการศึกษาของ Thierens และคณะ ที่มีการศึกษาผลของผลิตภัณฑ์ดูแลช่องปากที่มีฟลูออไรด์และซีพีพีเอซีพี ซึ่งพบว่ามีประสิทธิภาพในการป้องกันการสูญเสียแร่ธาตุเมื่อผ่านวัฏจักรความเป็นกรดด่างเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (Sinfiteli et al., 2017; Thierens et al., 2019) เมื่อมีซีพีพี-เอซีพีบริเวณรอยโรคใต้ผิวฟัน จะมีการปลดปล่อยพันธะหลวม ๆ ของ แคลเซียมและฟอสเฟตไอออน ซึ่งสามารถไปสะสมในช่องว่างของผลึกเกิดการสร้างเป็นไฮดรอกซีอะพาไทต์ และเมื่อมีฟลูออไรด์สามารถสร้างเป็นผลึกฟลูออร์อะพาไทต์ (Cochrane, Saranathan, Cai, Cross, & Reynolds, 2008)

จากผลการศึกษาครั้งนี้พบว่ากลุ่มยาสีฟันฟลูออไรด์ 1,000 ส่วนในล้านส่วนมีค่าความแข็งผิวระดับจุลภาคที่เปลี่ยนแปลงไปดีกว่ายาสีฟันฟลูออไรด์ที่มีแคลเซียมฟอสเฟต สอดคล้องกับการศึกษาของ Neto และคณะที่พบว่ากลุ่มยาสีฟันฟลูออไรด์ให้ผลในการคืนกลับแร่ธาตุดีกว่าผลิตภัณฑ์ส่งเสริมการคืนกลับแร่ธาตุที่มีฟลูออไรด์และแคลเซียมฟอสเฟต (Neto, Maeda, Tursi, & Serra, 2009) ซึ่งยาสีฟันฟลูออไรด์ที่มีซีพีพี-เอซีพีให้ผลในการคืนกลับแร่ธาตุน้อยกว่าสาเหตุอาจจะมาจากการมีฟลูออไรด์ในยาสีฟันที่มีซีพีพี-เอซีพี ฟลูออไรด์ไอออนอาจทำปฏิกิริยากับเอซีพีในเคซิอีนคอมเพล็กซ์และตกตะกอนเป็นแคลเซียมฟลูออไรด์ ทำให้การออกฤทธิ์ของสารดังกล่าวไม่มีประสิทธิภาพ (Azarpazhooh & Limeback, 2008) นอกจากนี้คราบจุลินทรีย์และไบโอฟิล์มอาจมีบทบาทสำคัญในการส่งเสริมการคืนกลับแร่ธาตุของซีพีพีเอซีพี (Reynolds et al., 2008) โดยซีพีพี-เอซีพีมีความสามารถในการจับกับผิวของเซลล์แบคทีเรียในคราบจุลินทรีย์ที่ผิวฟันและช่วยเพิ่มปริมาณของแคลเซียม ฟอสเฟตในคราบจุลินทรีย์ ซึ่งทำหน้าที่เป็นแหล่งสะสมแคลเซียมและฟอสเฟตไอออนที่สามารถแพร่เข้าสู่ใต้ผิวเคลือบฟันและส่งเสริมการคืนกลับแร่ธาตุ (Reynolds, Cai, Shen, & Walker, 2003) ดังนั้นการมีคราบจุลินทรีย์อาจเป็นกลไกสำคัญในการส่งเสริมการคืนกลับแร่ธาตุของซีพีพี-เอซีพี ขณะที่วัฏจักรความเป็นกรดด่างที่ใช้ในการศึกษาสามารถจำลองสภาวะในช่องปากได้อย่างจำกัดและไม่สามารถจำลองสภาวะที่มีคราบจุลินทรีย์ อีกปัจจัยที่อาจเกี่ยวข้องได้แก่ การใช้ซีพีพี-เอซีพีในรูปแบบยาสีฟันมีระยะเวลาในการสัมผัสของสารละลายยาสีฟันกับรอยโรคฟันผุสั้น อาจจะไม่เพียงพอในการสะสมของแคลเซียมและฟอสเฟตในการส่งเสริมการคืนกลับแร่ธาตุในรอยโรคฟันผุ ซึ่งอาจให้ผลที่แตกต่างจากรูปแบบผลิตภัณฑ์อื่น ๆ เช่น ยาอม หมากฝรั่ง ที่มีระยะเวลาในการสัมผัสที่นานกว่า (Pinto de Souza et al., 2018)

6. บทสรุปและข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาในห้องปฏิบัติการสรุปได้ว่ายาสีฟันฟลูออไรด์ 1,000 ส่วนในล้านส่วนและยาสีฟันฟลูออไรด์แคลเซียมฟอสเฟตสามารถส่งเสริมการคืนกลับแร่ธาตุในฟันผุระยะเริ่มต้น โดยยาสีฟันฟลูออไรด์ 1,000 ส่วนในล้านส่วนมีประสิทธิภาพในการในการส่งเสริมการคืนกลับแร่ธาตุในรอยผุจำลองของชั้นเคลือบฟันดีกว่ากว่ายาสีฟันฟลูออไรด์ที่มีแคลเซียมฟอสเฟต

เนื่องจากการศึกษานี้เป็นการศึกษาในห้องปฏิบัติการ อาจมีปัจจัยบางอย่างที่ไม่สามารถจำลองสภาวะในช่องปากได้อย่างสมบูรณ์ การศึกษาในอนาคตอาจออกแบบการทดลองในห้องปฏิบัติการรูปแบบอื่น เช่น รูปแบบที่มีไบโอฟิล์ม นอกจากนี้ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมถึงประสิทธิภาพของยาสีฟันฟลูออไรด์ที่มีแคลเซียมฟอสเฟตในรูปแบบการศึกษา *in situ* หรือ การศึกษาทางคลินิกที่มีการติดตามผลในระยะยาวเพื่อเป็นข้อมูลเพิ่มเติมในการแนะนำเลือกใช้ผลิตภัณฑ์อย่างเหมาะสม

กิตติกรรมประกาศ

ในงานวิจัยครั้งนี้ผู้วิจัยไม่มีผลประโยชน์ทับซ้อนกับบริษัทผู้ผลิตผลิตภัณฑ์ งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษา จากคณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ขอขอบคุณคุณสานิต บัวนิล คุณปรดา เพชรสุก เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการวิจัย คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่ให้การช่วยเหลือในการทำวิจัย และขอขอบคุณคณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่ให้การสนับสนุนเครื่องมือและสถานที่ในการทำวิจัย

เอกสารอ้างอิง

Arends, J., & ten Bosch, J. J. (1992). Demineralization and Remineralization Evaluation Techniques. *J Dent Res, 71*(3_suppl), 924-928. doi:10.1177/002203459207100S27

Azarpazhooh, A., & Limeback, H. (2008). Clinical efficacy of casein derivatives: a systematic review of the literature. *J Am Dent Assoc, 139*(7), 915-924; quiz 994-915. doi:10.14219/jada.archive.2008.0278

Chuenarrom, C., Benjakul, P., & Daosodsai, P. (2009). Effect of indentation load and time on knoop and vickers microhardness tests for enamel and dentin. *Mat Res, 12*(4), 473-476.

Cochrane, N. J., Cai, F., Huq, N. L., Burrow, M. F., & Reynolds, E. C. (2010). New approaches to enhanced remineralization of tooth enamel. *J Dent Res, 89*(11), 1187-1197. doi:10.1177/0022034510376046

Cochrane, N. J., & Reynolds, E. C. (2009). 10 - Casein phosphopeptides in oral health. In M. Wilson (Ed.), *Food Constituents and Oral Health* (pp. 185-224): Woodhead Publishing.

Cochrane, N. J., Saranathan, S., Cai, F., Cross, K. J., & Reynolds, E. C. (2008). Enamel subsurface lesion remineralisation with casein phosphopeptide stabilised solutions of calcium, phosphate and fluoride. *Caries Res, 42*(2), 88-97. doi:10.1159/000113161

Cross, K. J., Huq, N. L., & Reynolds, E. C. (2007). Casein phosphopeptides in oral health--chemistry and clinical applications. *Curr Pharm Des, 13*(8), 793-800.

Featherstone, J. D. (2008). Dental caries: a dynamic disease process. *Aust Dent J, 53*(3), 286-291. doi:10.1111/j.1834-7819.2008.00064.x

Gutiérrez-Salazar, M. d. P., & Reyes-Gasga, J. (2003). Microhardness and chemical composition of human tooth. *Mat Res, 6*(3), 367-373.

Neto, F. C., Maeda, F., Turssi, C., & Serra, M. (2009). Potential agents to control enamel caries-like lesions. *Journal of dentistry, 37*, 786-790. doi:10.1016/j.jdent.2009.06.008

Panich, M., & Poolthong, S. (2009). The effect of casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate and a cola soft drink on in vitro enamel hardness. *J Am Dent Assoc, 140*(4), 455-460. doi:10.14219/jada.archive.2009.0195

Pinto de Souza, S. C. T., Araújo, K. C., Barbosa, J. R., Cancio, V., Rocha, A. A., & Tostes, M. A. (2018). Effect of dentifrice containing fTCP, CPP-ACP and fluoride in the prevention of enamel demineralization. *Acta Odontol Scand, 76*(3), 188-194. doi:10.1080/00016357.2017.1401658

Pulido, M. T., Wefel, J. S., Hernandez, M. M., Denehy, G. E., Guzman-Armstrong, S., Chalmers, J. M., & Qian, F. (2008). The inhibitory effect of MI paste, fluoride and a combination of both on the progression of artificial caries-like lesions in enamel. *Oper Dent, 33*(5), 550-555. doi:10.2341/07-136

Reynolds, E. C., Cai, F., Cochrane, N. J., Shen, P., Walker, G. D., Morgan, M. V., & Reynolds, C. (2008). Fluoride and casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate. *J Dent Res, 87*(4), 344-348. doi:10.1177/154405910808700420

Reynolds, E. C., Cai, F., Shen, P., & Walker, G. D. (2003). Retention in plaque and remineralization of enamel lesions by various forms of calcium in a mouthrinse or sugar-free chewing gum. *J Dent Res, 82*(3), 206-211. doi:10.1177/154405910308200311

Sinfiteli, P. d. P., Coutinho, T. C. L., Oliveira, P. R. A. d., Vasques, W. F., Azevedo, L. M., Pereira, A. M. B., & Tostes, M. A. (2017). Effect of fluoride dentifrice and casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate cream with and without fluoride in preventing enamel demineralization in a pH cyclic study. *J Appl Oral Sci, 25*(6), 604-611. doi:10.1590/1678-7757-2016-0559

ten Cate, J. M., & Duijsters, P. P. (1982). Alternating demineralization and remineralization of artificial enamel lesions. *Caries Res, 16*(3), 201-210. doi:10.1159/000260599

Thierens, L. A. M., Moerman, S., Elst, C. V., Vercruysse, C., Maes, P., Temmerman, L., . . . Pauw, G. A. M. (2019). The in vitro remineralizing effect of CPP-ACP and CPP-ACPF after 6 and 12 weeks on initial caries lesion. *J Appl Oral Sci, 27*, e20180589. doi:10.1590/1678-7757-2018-0589

Walsh, T., Worthington, H. V., Glenny, A. M., Marinho, V. C. C., & Jeroncic, A. (2019). Fluoride toothpastes of different concentrations for preventing dental caries. *Cochrane Database of Systematic Reviews*(3). doi:10.1002/14651858.CD007868.pub3

White, D. J. (1987). Use of synthetic polymer gels for artificial carious lesion preparation. *Caries Res, 21*(3), 228-242. doi:10.1159/000261026

White, D. J., & Nancollas, G. H. (1990). Physical and chemical considerations of the role of firmly and loosely bound fluoride in caries prevention. *J Dent Res, 69 Spec No*, 587-594; discussion 634-586. doi:10.1177/00220345900690s116

Zero, D. T., Marinho, V. C., & Phantumvanit, P. (2012). Effective use of self-care fluoride administration in Asia. *Adv Dent Res, 24*(1), 16-21. doi:10.1177/0022034511431262

สำนักทันตสาธารณสุข กรมอนามัย กระทรวงสาธารณสุข. (2561). รายงานผลการสำรวจสภาวะสุขภาพช่องปากแห่งชาติ ครั้งที่ 8 ประเทศไทย พ.ศ. 2560.