

EEN EENVOUDIGE METHODE TER BEPALING VAN DE
REMMENDE WERKING VAN BEPAALDE STOFFEN OP
DE ZUURVORMING IN DE MONDHOLTE

J. WESTSTRATE, O. BIRMAN en B. KANTOROWICZ,

De zuurvorming in de mondholte wordt beschouwd als een belangrijke factor in de etiologie van de cariës omdat de aantasting van het tandglazuur hiervan het gevolg kan zijn. De zuren ontstaan door splitsing van acidogene koolhydraten door enzymen die afkomstig zijn van in de mondholte aanwezige bacteriën. De afbraak verloopt zo vlug, dat plaatselijk reeds enkele minuten na het gebruik van koolhydraten de pH zeer sterk kan dalen ¹⁾. Voor de aantasting van het hydroxylapatiet wordt een pH lager dan 5 gevaarlijk geacht ²⁾.

Ter voorkoming van een plaatselijk te lage pH zou men mondverzorgingsmiddelen kunnen gebruiken waaraan stoffen zijn toegevoegd, die een remmende werking op de zuurvorming uitoefenen. Hiervoor komen in aanmerking antiënzymatische, bacteriostatische of bactericide stoffen. Verbindingen die enige tijd aan de plaque en aan het mondslijmvlies hechten en die geen ongewenste bijverschijnselen veroorzaken verdienen de voorkeur omdat ze een langduriger vermindering van de zuurvorming zullen bewerkstelligen ³⁾.

Er zijn verschillende werkwijzen bekend om vast te stellen of in mondcosmetica verwerkte stoffen een remmende invloed uitoefenen op de groei van de in de mondholte aanwezige micro-organismen en op hun zuurproductie. Men heeft ook getracht de duur van deze werking vast te stellen. Daarbij heeft men gebruik gemaakt van het tellen van de zuurvormende bacteriën, van microscopische studies van plaquemateriaal, van de meting van het pH-verloop op het tandoppervlak, van fermentatietests enz. ⁴⁾, ⁵⁾, ⁶⁾ en ⁷⁾. Deze onderzoeken zijn veelal niet eenvoudig uitvoerbaar.

Het doel van het in het navolgende beschreven onderzoek was een eenvoudige methode te vinden, waarmee men kan nagaan of door toepassing van een mondreinigingsmiddel de zuurvorming in de mondholte kan worden verminderd, hoe sterk deze reductie is en hoelang de werking blijft bestaan. Als criterium werd genomen de snelheid waarmee de ti-

treerbare hoeveelheid zuur in een mengsel van speeksel met glucose tijdens incubatie toeneemt. De gevonden methode werd tenslotte getoetst door de werking van een mondwater dat een bactericide stof bevat bij een aantal proefpersonen te bepalen.

Werkwijze

Per proefpersoon werd 6 ml niet gestimuleerd speeksel verzameld in een klein bekerglas. Voor bepaalde onderzoeken werd dit „individueel” speeksel gebruikt. Voor andere proeven was meer speeksel nodig; dit werd verkregen door speeksel van tenminste 6 proefpersonen direct na levering te vermengen („verzamelspeeksel”).

Een glucoseoplossing werd bereid door oplossen van 2,5% zuivere glucose in gedistilleerd water. Deze oplossing werd door 2 × koken gesteriliseerd en dan door een paar druppels NaOH-oplossing gebracht op pH 8.

Het te onderzoeken speekselmonster werd telkens gemengd met – steeds vers bereide – glucoseoplossing in de verhouding 1:4. Het mengsel werd gedurende 1 minuut gehomogeniseerd met een trilroerder en daarna door filtratie van grove verontreinigingen bevrijd. Vervolgens werden vier dunwandige glazen proefbuisjes – ± 9 cm lang, 1 cm \varnothing , inhoud ± 7 ml – met het mengsel gevuld en goed gesloten. Op grond van vroeger opgedane ervaringen werd een luchtbel boven de vloeistof zo goed mogelijk vermeden⁸⁾.

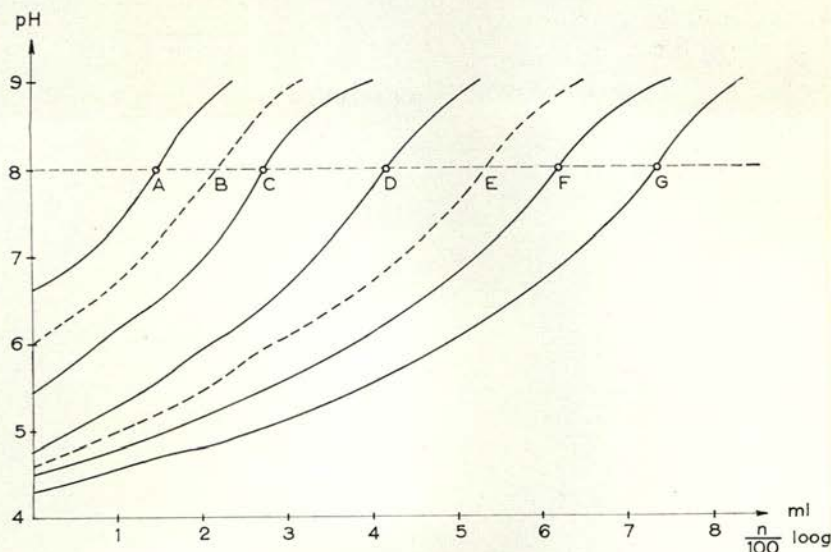
De genummerde buisjes werden daarna bij 37° C geïncubeerd. Om ze snel en gelijkmatig op deze temperatuur te brengen werden ze gezet in een met water van 37° C gevuld bekerglas. Het geheel werd dan in een broedstoof van deze temperatuur geplaatst. De inhoud van de buisjes bereikt op deze wijze in ca. 10 minuten de gewenste temperatuur. Van de inhoud van nummer 1 werd daarom pas na 15 minuten verblijf in de broedstoof de pH en de titratieaciditeit bepaald en deze als „beginwaarde” beschouwd. Nummer 2 werd een uur daarna onderzocht, nummer 3 twee uur en nummer 4 drie uur later. De gevonden hoeveelheid zuur werd omgerekend op microgramequivalenten per milliliter speeksel ($\mu\text{gacq/ml}$).

De resultaten werden grafisch uitgezet en verder uitgewerkt.

Oriënterende proeven

De titratie werd aanvankelijk elektrometrisch uitgevoerd m.b.v. een pH-meter. Omdat er voor meerdere bepalingen grotere hoeveelheden speeksel nodig zijn werd hierbij gewerkt met „verzamelspeeksel”.

Een typische reeks van krommen, die bij titratie van een bepaald ver-



(Fig. 1.) Elektrometrische titratie van bij 37° C geïncubeerde mengsels van verzamelspeeksel met 2½%-ige glucose 1:4.

A = voor, B, C, D, E, F en G na resp. ½, 1, 2, 2½, 3 en 4 uur incubatie.

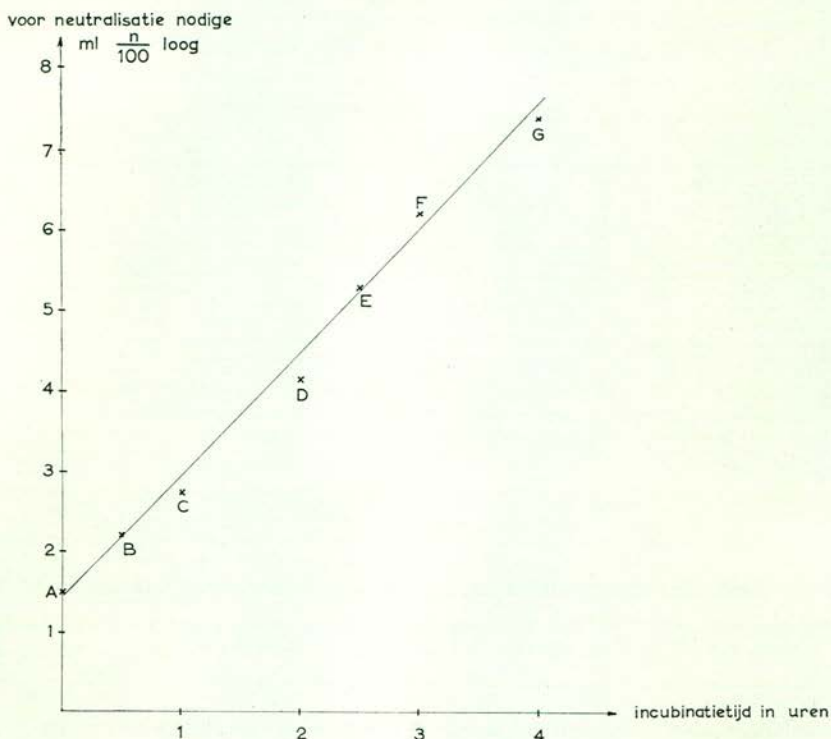
zamelspeeksel-glucosemengsel wordt verkregen bij verschillende incubatietijden vindt men in fig. 1.

Uit fig. 1. kan worden afgeleid:

1. Bij pH 7 tot 8,5 verloopt de titatiekromme tamelijk steil; men kan dus i.p.v. elektrometrisch ook met een geschikte indicator met voldoende nauwkeurigheid titreren. Dit verdient de voorkeur omdat deze titratie gemakkelijker uitvoerbaar is.
2. De afstand tussen de krommen van monsters, die telkens 1 uur in incubatietijd verschillen, is bij een bepaalde pH-waarde gedurende de eerste uren ongeveer even groot.

Wanneer men de titreerbare hoeveelheid zuur uitzet tegen de incubatietijd krijgt men daardoor een nagenoeg rechte lijn (zie fig. 2). De hoeveelheid zuur die bij de proef per uur ontstaat is dus onder de proefomstandigheden nagenoeg constant.

In verband met de eerste van de bovengenoemde conclusies werd gedurende het verdere onderzoek de titratie uitgevoerd met behulp van een microburet gevuld met NaOH 0,03 N en een mengindicator. De mengindicator bestaat uit een met NaOH geneutraliseerde oplossing van 0,05%



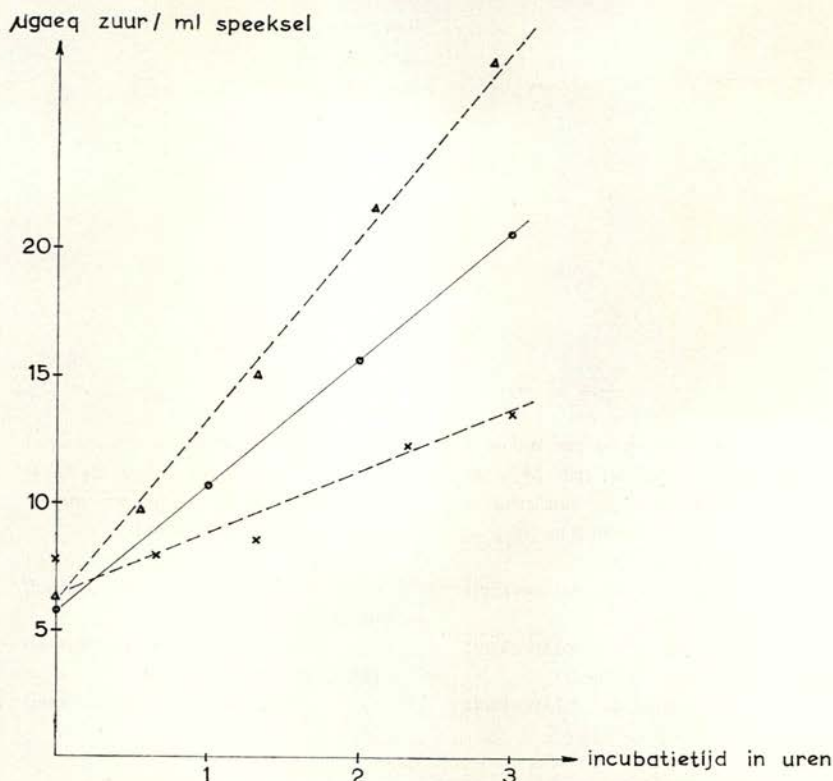
(Fig. 2.) Titratie-aciditeit in een mengsel van verzamelspeeksel met glucose 1:4 bij 37° C als functie van de incubatietijd (afgeleid uit fig. 1 bij pH 8).

thymolblauw en 0,05% cresolrood, die een duidelijke omslag van geel naar paars geeft bij pH 7,8 tot 8. Men gebruikt 3 druppels indicator op 7 ml speeksel-glucosemengsel.

Zuurvormingssnelheid

Titreert men nu mengsels van „verzamelspeeksel” en glucose en zet men het loogverbruik per ml speeksel na 15 minuten verblijf in de broedstoof („beginwaarde”) en resp. 1 uur, 2 en 3 uur later grafisch uit tegen de incubatietijd, dan blijkt dit inderdaad steeds rechte lijnen op te leveren. De helling van de gevonden rechte lijn is een maat voor de specifieke „zuurvormingssnelheid” van het onderzochte speeksel-glucosemengsel. Door steeds met dezelfde speeksel-glucoseverhouding te werken kan men de zuurvormingssnelheid uitdrukken in „ μ gaeq/uur ml speeksel”.

Bij 20 dergelijke proeven met verzamelspeeksels van verschillende samenstelling werden bijv. waarden gevonden, waarvan minimum, maximum en gemiddelde te vinden zijn in fig. 3.

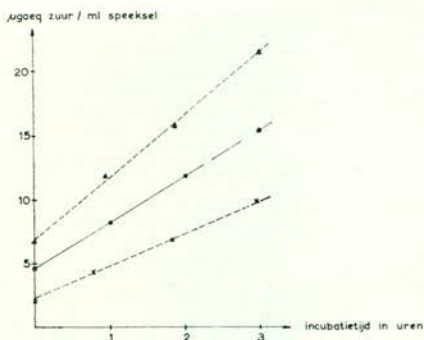


(Fig. 3.) Zuurvorming in menssels van verzamelspeeksel met 2½%-ige glucose 1:4 bij 37° C berekend uit 20 proeven.

- △ maximale zuurvorming (7,2 µgaeq/uur. ml speeksel)
- x minimale „ (2,5 „ / „ „ „)
- o gemiddelde „ (±5,- „ / „ „ „)

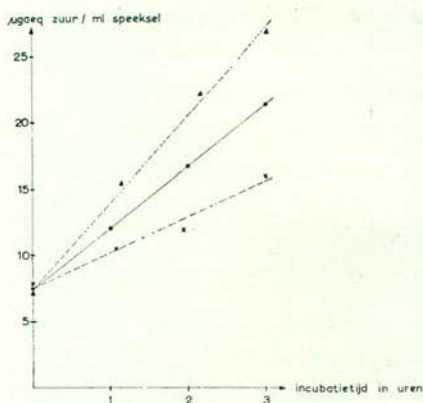
Voert men de proeven uit met „individueel speeksel”, dan blijken de punten in de grafiek, welke het verband geeft tussen de gevormde hoeveelheid zuur en de incubatietijd gedurende de eerste 3 uur eveneens op een rechte lijn te liggen. De helling van deze lijn uitgedrukt in µgaeq/uur. ml speeksel is weer een maat voor de zuurvormingssnelheid van het betreffende speekselmonster.

De zuurvormingssnelheid van het speeksel van een bepaalde persoon wordt beïnvloed door verschillende factoren zoals het tijdstip van de monsternamming, de aard van het tevoren gebruikte voedsel, die sinds de laatste opname van voedsel verlopen tijd, de reiniging van de mondholte na de maaltijd, enz. De invloed van deze factoren kan worden uitgescha-



(Fig. 4.) Zuurvorming in een mengsel van individueel speeksel met 2½%-ige glucose 1:4 bij 37° C bij een *zwakke* zuurvormer (proefpersoon A).

- △ maximale zuurvorming
(4,8 µg aeq/uur. ml speeksel)
- x minimale zuurvorming
(2,5 µg aeq/uur. ml speeksel)
- o gemiddelde zuurvorming
(3,7 µg aeq/uur. ml speeksel)



(Fig. 5.) Zuurvorming in een mengsel van individueel speeksel met 2½%-ige glucose 1:4 bij 37° C bij een *matige* zuurvormer (proefpersoon B).

- △ maximale zuurvorming
(6,6 µg aeq/uur. ml speeksel)
- x minimale zuurvorming
(2,7 µg aeq/uur. ml speeksel)
- o gemiddelde zuurvorming
(4,7 µg aeq/uur. ml speeksel)

keld door de zuurvormingssnelheid van de proefpersoon meerdere keren te bepalen onder zo gelijk mogelijke omstandigheden en het gemiddelde daarvan als maat voor de zuurvorming te nemen.

De helling waaronder de lijn hoeveelheid zuur: incubatietijd verloopt is gedurende een bepaalde periode karakteristiek voor de betreffende persoon.

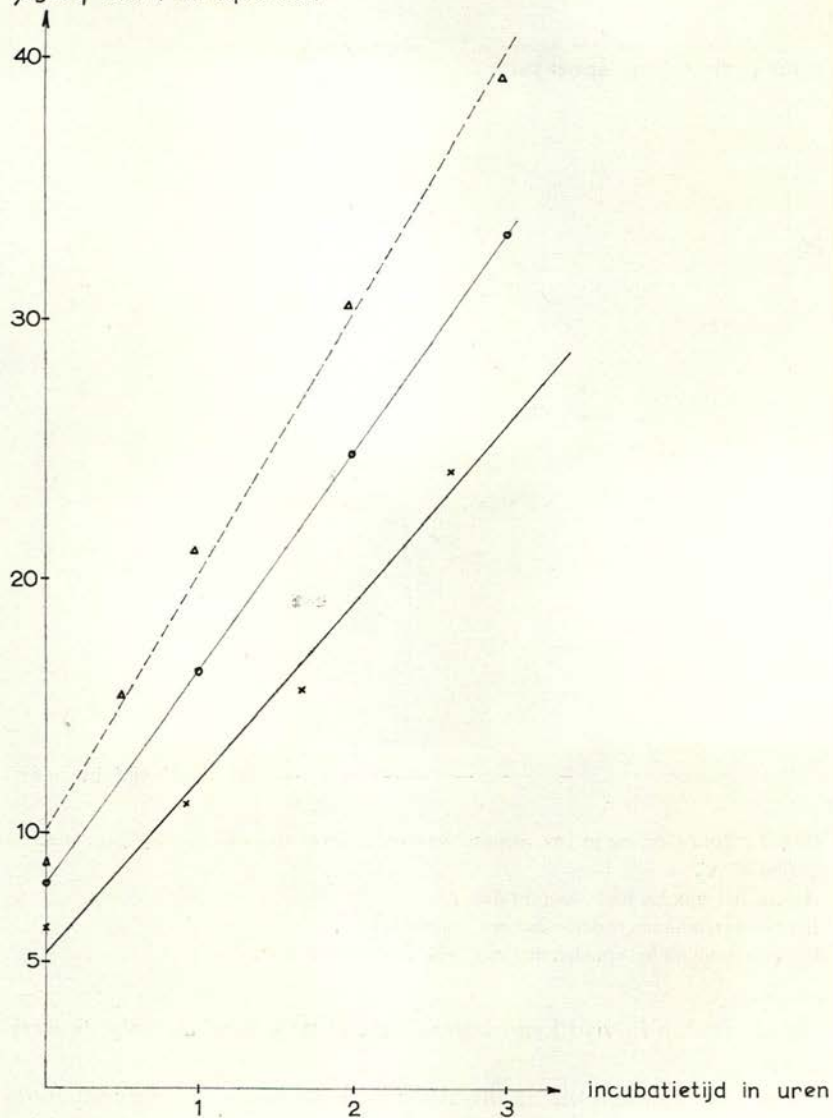
Vergelijkt men de gemiddelde zuurvormingssnelheid van verschillende proefpersonen onderling, dan vertonen sommigen een zwakke, anderen een matige en weer anderen een sterke zuurproductie per uur.

Op grond van de gevonden gegevens kan men dus de proefpersonen verdelen in „zwakke”, „matige” of „sterke” zuurvormers. De figuren 4, 5 en 6 geven hiervan voorbeelden. Men ziet dat de proefpersoon C een ruim twee maal zo grote zuurvormingssnelheid heeft als A.

Reductie van de zuurvormingssnelheid na gebruik van mondcosmetica

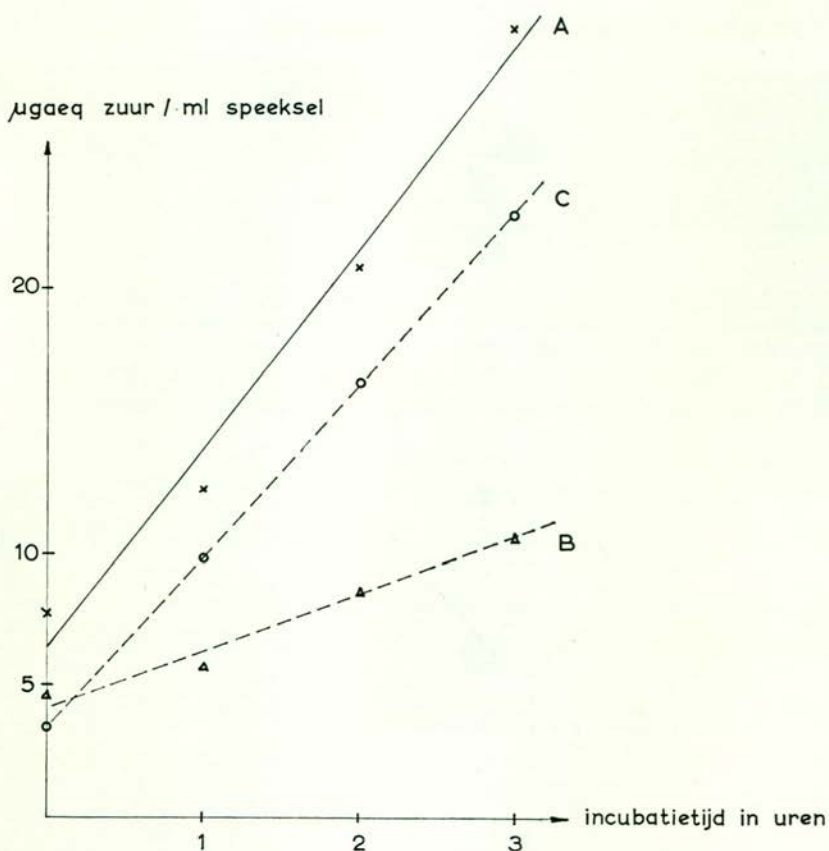
Nu men op de bovenomschreven wijze de „zuurvormingssnelheid” van het speeksel van een bepaalde persoon kan karakteriseren, werd nagegaan of men met behulp hiervan de werking van aan mondcosmetica toege-

μgaeq zuur / ml speeksel



(Fig. 6.) Zuurvorming in een mengsel van individueel speeksel met 2½%-ige glucose 1:4 bij 37° C bij een sterke zuurvormer (proefpersoon C).

- △ maximale zuurvorming (10,1 μgaeq /uur. ml speeksel)
- x minimale " (6,9 " / " " ")
- o gemiddelde " (8,4 " / " " ")



(Fig. 7.) Zuurvorming in een mengsel van individueel speeksel met 2½%-ige glucose 1:4 bij 37° C.

A vóór het spoelen met „mondwater”,

B 15 minuten na het spoelen met een „mondwater”,

C 15 minuten na het spoelen met een „placebo”-mondwater.

voegde stoffen in vivo kan onderzoeken. Hierbij werd als volgt te werk gegaan:

Een deel van een uit de literatuur bekende tegen bacteriën en fungi werkzame stof met een breed spectrum*) werd in 1000 delen 20%-ige ethylalkohol opgelost. Ter aromatisering werden een paar druppels etherische oliën toegevoegd, waardoor een soort „mondwater” werd bereid.

Ter controle werd een „placebo”-mondwater bereid van 20%-ige alko-

*) 1,3 - bis (β ethylhexyl) - 5 - methyl - 5 - aminohexahydropyrimidine.

hol met dezelfde combinatie en hoeveelheid van etherische oliën maar zonder de antibacteriële stof.

Op bepaalde tijden van de dag werden monsters van 6 ml speeksel genomen van een proefpersoon. Daarna spoelde deze 1 minuut lang zorgvuldig met 5 ml van het „mondwater”, resp. met 5 ml van het „placebo”-mondwater. 15 minuten later werd opnieuw 6 ml speeksel geleverd.

Behandelt men de speekselmonsters zoals in het voorafgaande beschreven (incuberen, titreren), dan vindt men opvallende verschillen in de per uur per ml gevormde hoeveelheid zuur. Dit blijkt uit fig. 7.

De zuurvormingssnelheid van het speeksel van deze proefpersoon was dus 15 minuten na het spoelen met het „mondwater” gedaald van 7,5 $\mu\text{gaeq/uur. ml}$ speeksel tot 2,1 $\mu\text{gaeq/uur. ml}$ speeksel, d.w.z. tot 38% van de oorspronkelijke waarde. Maar ook het spoelen met het „placebo”-mondwater had een reductie van de zuurvormingssnelheid tot gevolg, nl. tot 6,5 $\mu\text{gaeq/uur. ml}$ speeksel of wel door het spoelen met het placebo-mondwater was de zuurvormingssnelheid gedaald tot 87%. De antibacteriële stof in het mondwater is dus voor het verschil verantwoordelijk van $\pm 59\%$.

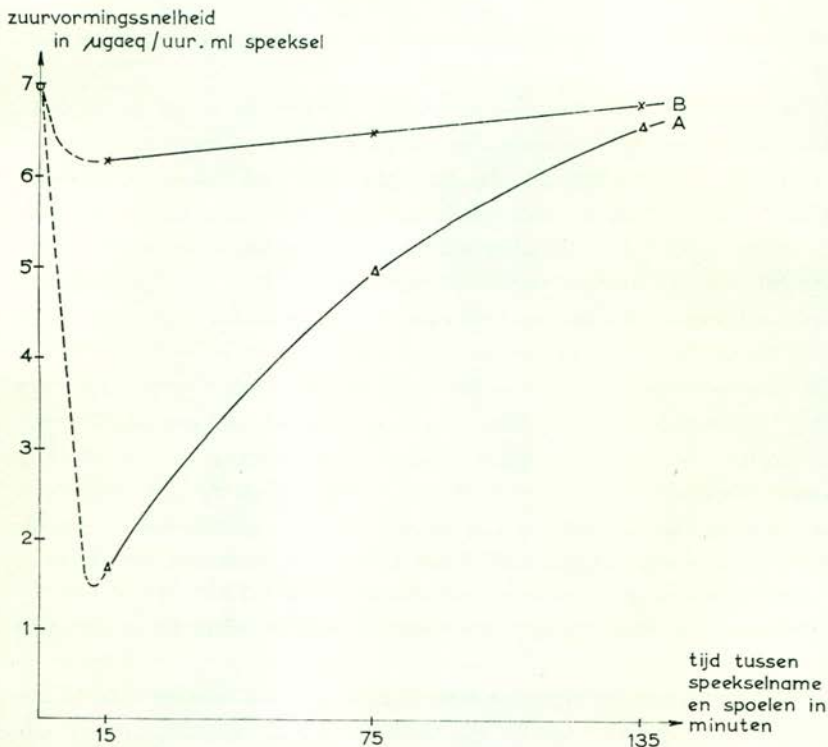
Ook bij andere proefpersonen werd een overeenkomstige reductie geconstateerd. Op grond van de resultaten kan worden gesteld, dat de totale reductie, door de antibacteriële stof bereikt 15 minuten na spoelen met dit „mondwater”, $\pm 60\%$ bedraagt.

Bij een aantal met dezelfde proefpersonen uitgevoerde proeven werd een standaarddeviatie van de resultaten gevonden van 9,5%. De proeven zijn dus behoorlijk reproduceerbaar.

Het ligt voor de hand deze methode te gebruiken om na te gaan *hoelang* door spoelen met een mondwater de zuurvormingssnelheid van het speeksel kan worden beperkt. Om dit vast te stellen werd een aantal proeven genomen met verschillende proefpersonen, waaronder „zwakke”, „matige” en „sterke” zuurvormers, waarbij als volgt te werk werd gegaan:

De proefpersonen leverden eerst 6 ml speeksel. Onmiddellijk daarna spoelden zij 1 minuut lang zorgvuldig met het mondwater of het placebo-mondwater. Na 15 minuten leverden zij weer 6 ml speeksel. De speeksellevering werd 1 uur, 2 uur en 3 uur daarna herhaald. Het resultaat van deze metingen bij een bepaalde proefpersoon wordt weergegeven in fig. 8.

15 minuten na het spoelen met het „mondwater” was de zuurvormingssnelheid sterk gedaald. Daarna nam deze langzaam weer toe om na ruim twee uur weer het normale niveau te bereiken.



(Fig. 8.) Gemiddelde zuurvormingssnelheid in mensgels van individueel speeksel met 2½%-ige glucose 1:4 bij 37° C.

A na spoelen met een „mondwater”,

B na spoelen met een „placebo-mondwater”.

Maar ook na het spoelen met het placebo-mondwater trad een zekere reductie van de zuurvormingssnelheid op. Om een indruk te krijgen van de anti-acidogene werking van de werkzame stof moet men dus de werking van het placebo-mondwater aftrekken van die van het „mondwater”.

Voert men dezelfde serie proeven uit met andere proefpersonen, dan vertoont zich in wezen steeds hetzelfde beeld.

Er kan daarom worden geconstateerd, dat de antibacteriële stof die bij deze proef werd gebruikt, 15 minuten na toepassing een reductie van de zuurvormingssnelheid tot gevolg had van ± 63%, maar dat hij na ongeveer twee uur geen werking meer uitoefent.

Met behulp van de boven beschreven eenvoudige en gemakkelijk uitvoerbare methode kan men dus komen tot een grafiek waaruit men direct kan aflezen hoe sterk een antibacteriële stof in een mondreinigingsmiddel werkt en hoe lang deze werking blijft bestaan.

Discussie:

Verschillende onderzoekers hebben reeds getracht de zuurvorming in de mondholte te karakteriseren d.m.v. incubatieproeven met speeksel-glucosemengsels. De resultaten zijn daarbij tot dusver weinig bevredigend geweest. Hiervoor zijn verschillende oorzaken aan te geven, zoals het toepassen van een te lange incubatietijd, een verkeerde speeksel-glucoseverhouding, een minder geschikte indicator e.d.

Bij onze methode hebben wij deze bezwaren zo goed mogelijk onderzocht. Zij is dus als een aanvulling en verbetering van andere methodes te beschouwen. Wij kozen een bijzonder geschikt indicatormengsel en werkten met een speeksel-glucoseverhouding, die volgens andere onderzoekingen binnen het voor dergelijke proeven optimale gebied valt ⁹⁾. Wij konden vaststellen, dat de titratieaciditeit van de speeksel-glucosemengsels onder onze proefomstandigheden evenredig is aan de incubatietijd. Dit betekent, dat de door ons bepaalde zuurvormingssnelheid een maat is voor die in de mond op het tijdstip van de monstername.

Men maakt dus als het ware bij een bepaalde persoon een momentopname van de toestand in de mondholte en kan daardoor de tendens tot zuurvorming vergelijken op verschillende tijdstippen, vóór en na gebruik van mondcosmetica enz. Ook kan men in dit opzicht verschillende personen onderling vergelijken.

Het is duidelijk dat met de hier beschreven methode slechts één van de factoren onderzocht wordt die de pH van het mondholtespeeksel bepalen, nl. het vermogen tot bacteriële produktie van zuur bij aanwezigheid van glucose.

Het was niet te verwachten en is ook niet zonder meer duidelijk waarom de zuurvormingssnelheid onder de proefomstandigheden constant is. Dit kan veroorzaakt worden doordat de bacteriën door het milieu te weinig kans krijgen zich te vermenigvuldigen. Ook is het mogelijk, dat per tijds-eenheid evenveel bacteriën sterven als er gevormd worden, zodat het totale aantal constant blijft. In ieder geval tonen de gegeven voorbeelden (onderscheid tussen sterke en zwakke zuurvorming, bepaling van de activiteit van een bactericide stof in een mondwater en de duur van deze activiteit), dat de methode goed bruikbaar is voor het toetsen van mondcosmetica op hun remmende werking op de zuurvorming.

Samenvatting:

In de beschreven mengsels van speeksel met glucose blijkt gedurende de eerste uren van de incubatie bij 37° C de geproduceerde hoeveelheid zuur evenredig te zijn aan de reactietijd. De zuurvormingssnelheid is dus gedurende deze periode constant en kan als maat dienen om de zuurvorming in de mondholte te karakteriseren.

M.b.v. deze methode kan men onderscheid maken tussen personen met sterke, matige en geringe produktie van zuur uit koolhydraten. Ook kan men er de invloed mee nagaan van antibacteriële stoffen op de zuurvorming in de mondholte, alsmede de tijd gedurende welke zij actief zijn. De bruikbaarheid van de methode wordt aan de hand van enige voorbeelden geïllustreerd.

Summary:

A SIMPLE METHOD FOR THE DETERMINATION OF THE INHIBITORY EFFECT OF CERTAIN SUBSTANCES ON THE ACID FORMATION IN THE ORAL CAVITY

It was found that in 1:4 mixtures of saliva with a 2½ per cent glucose solution, the quantity of acid produced during the first hours of incubation at 37° C is proportional to the reaction time. Hence, the rate of acid formation during this period is constant and, expressed in terms of microgram equivalents/hour/ml of saliva, can be used as a measure to characterize the acid formation in the oral cavity.

The method can be used to make a distinction between persons having a high, moderate or low production of acid from carbohydrates. It may also be used to investigate the effect of anti-bacterial substances on acid formation in the oral cavity and the time during which these substances are active.

The suitability of the method is illustrated with some examples.

Literatuur:

1. FOSDICK, L.S., J.A.D.A., 37: 419, 1948
2. STEPHAN, R.M., *ibid*, 27: 718, 1940
3. FOSDICK, L.S., Science Digest, maart 1952, pag. 52
4. VINSON, L.J., en BENNETT, A.G., J. Am. Pharm. Ass., 47: 635, 1958
5. OSTROLENK M., en WEISS, W., *ibid*, 48: 219, 1959
6. RAPP, G.W., Illinois Dent. Journal, 31: 290, 1962
7. BAYONA GONZALEZ, A., Rev. A.D. MEXICANA, 20: 301, 1962 (Dent. Abstr., 8: 471, 1963)
8. KANTOROWICZ, B., en BIRMAN, O., J. Dent. Res., 32: 601, 1953
9. KLEINBERG, I., *ibid*, 40: 1087, 1961.