

**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI**

**Přirodovědecká fakulta**

**Katedra analytické chemie**



**VÝVOJ METODY PRO STANOVENÍ FLUORIDŮ V NEHTECH**

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

Autor práce:

Zuzana Ropková

Studijní obor:

Chemie

Vedoucí bakalářské práce:

Ing. David Milde, Ph.D.

**Olomouc 2012**

## **SOUHRN**

Tato bakalářská práce je zaměřena na vývoj metody pro stanovení fluoridů v nehtech pomocí iontově-selektivní elektrody. Je rozdělena na dvě části. Teoretická část se zabývá charakteristikou fluoru a jeho významem, výskytem a množstvím v lidském těle. Dále se věnuje nehtům, jako biomarkerům fluoridové expozice a principům dvou metod, kterými se fluoridy v nehtech dají stanovit. Druhá část je experimentální. Jejím obsahem je pracovní postup vyvíjené metody a následná interpretace naměřených dat a výsledků. V závěru práce je uvedeno porovnání obou metod.

## **SUMMARY**

This bachelor thesis is focused on the development of a method for the determination of fluorides in nails using ion-selective electrode. The theoretical part deals with a characteristics of fluorine and its meaning, presence and quantity in the human body. It also discusses the nails, as biomarkers of fluoride exposure and principles of two methods by which the fluorides in the nails can be determined. The second, experimental part describes the laboratory procedure of the new method and subsequent interpretation of acquired values and results. In the conclusion a comparison of both methods is stated.

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou v seznamu použité literatury.

Souhlasím s tím, že práce je prezenčně zpřístupněna v knihovně Katedry analytické chemie, Přírodovědecké fakulty, Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci dne .....

.....

Děkuji Ing. Davidu Mildemu, Ph.D. za věcné připomínky a odborné rady, poskytnutí studijních materiálů pro vypracování bakalářské práce a čas, který mi věnoval při konzultacích.

## OBSAH

1	ÚVOD.....	1
2	TEORETICKÁ ČÁST .....	2
2.1	Charakteristika fluoru a jeho sloučenin .....	2
2.2	Fluoridy v lidském těle .....	4
2.3	Vliv fluoridů na lidské zdraví .....	8
2.4	Fluoridy v nehtech .....	11
2.5	Metody stanovení fluoridů v nehtech .....	13
2.6	Stanovení fluoridů iontově-selektivní elektrodou.....	19
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	23
3.1	Chemikálie .....	23
3.2	Přístroje a pomůcky .....	23
3.3	Pracovní postup.....	23
4	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	26
4.1	Stanovení fluoridů v nehtech .....	26
4.2	Stanovení meze detekce .....	28
5	ZÁVĚR.....	30
6	SEZNAM LITERATURY.....	31
7	PŘÍLOHY .....	33

# 1 ÚVOD

Je známo, že zubní kaz provází lidstvo od samého počátku a řadí se mezi nejfrekventovanější onemocnění. Po objevení antikariézních účinků fluoru byl výskyt zubního kazu výrazně snížen, existují však studie z poslední doby dokazující situaci opačnou.

Stále častěji je pozorována zvýšená kazivost zubů u dětí i dospělých. Odborníci pokládají vinu současné krizi ve zdravotnictví a nedostatečné prevenci. Problém se týká hlavně nižších sociálních skupin, přistěhovalců a školních dětí, zvláště pak v rozvojových zemích. V roce 2001 v Číně byla shledána 84 % prevalence zubního kazu u dětí ve věku 5 až 6 let. O pět let později byl zjištěn 97,1 % výskyt zubního kazu u dětí ve věku 6 let ve Filipínách a ve stejném roce v Norsku u 12-ti letých 59,8 %. <sup>1</sup> V České republice má dětská populace v průměru střední stupeň kazivosti (rok 2010). <sup>2</sup>

V některých případech je léčba zubního kazu posílena používáním lokálních přípravků s vysokým obsahem fluoru. Aplikace těchto preparátů je velmi efektivní. Na druhé straně se však objevují důkazy o zvýšeném výskytu zubní fluorózy. Oba extrémy fluoridového příjmu, ať už nadměrného či nedostatečného, mohou způsobit vážná onemocnění, a proto se množství fluoridů v těle stává častějším předmětem zájmu zubních lékařů.

Pro stanovení fluoru v těle se obvykle používají rutinní materiály jako je krev nebo moč. V rámci výzkumu ukazatelů fluoridové expozice se hledají vhodnější materiály, které by svými vlastnostmi vyhovovaly širšímu použití. Prozatím se jedná o epidemiologické studie, ne ambulantní praxi. Vhodnou alternativou se zdají být nehty a vlasy. Zvláště pro malé děti mohou mít tyto látky význam díky bezproblémovému odběru vzorku.

V odborné literatuře je pro stanovení fluoridů v biologických vzorcích popsáno více metod. Konkrétně pro nehty je v experimentálních studiích používána metoda hexamethyldisiloxanové (HMDS) difúze.

Cílem této bakalářské práce bylo vypracovat rešerši o fluoridech a metodách jejich stanovení v nehtech, a zároveň vyvinout novou metodu jejich stanovení včetně optimalizace podmínek a posouzení experimentálních výsledků. Metoda se od porovnávané metody HMDS difúze liší v přípravě vzorků, jež je založena na rozkladu nehtů kyselinou dusičnou v mikrovlnném mineralizátoru a následně obdobném potenciometrickém stanovení. Za jistých okolností by tato metoda mohla stanovení fluoridů v nehtech usnadnit.

## 2 TEORETICKÁ ČÁST

V teoretické části je stručně pojednáno o fluoru, jeho výskytu v životním prostředí a v lidském těle. Dále je představen jako prvek nezbytný pro ochranu před zubním kazem a zároveň nebezpečný pro vznik fluorózy. V další části je pojednáno o nehtech, potenciálních ukazatelích fluoridové expozice, a metody stanovení fluoridů v těchto vzorcích.

### 2.1 Charakteristika fluoru a jeho sloučenin

Z hlediska biologického významu je fluor stopový prvek, vyskytující se v lidském těle především v kostech a zubech. Fluor je znám díky svým antikariézním účinkům na zubní tkáň, které se nedají nahradit žádným jiným prvkem. Běžně se nachází ve všech složkách životního prostředí a je prvkem velmi reaktivním. Jeho nejčastějšími sloučeninami jsou fluoridy, ať už anorganického či organického původu.<sup>3,4</sup>

#### 2.1.1 Prvek fluor

Fluor patří mezi tzv. halové prvky (halogeny). Za běžné teploty je to zelenožlutý silně zapáchající jedovatý plyn. Je nejelektronegativnějším prvkem periodické tabulky a vyznačuje se extrémní reaktivitou. V přírodě se proto nachází pouze ve sloučeninách, a to ve formě fluoridů v oxidačním čísle -I. Významnými minerály jsou kazivec  $\text{CaF}_2$ , kryolit  $\text{Na}_3\text{AlF}_6$  a fluorapatit  $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{F}$ . Fluor reaguje často velmi prudce, s vodíkem je reakce doprovázena dokonce výbuchem. Přímou nereaguje s mědí a niklem, ale ani s dusíkem. S kyslíkem tvoří nestabilní difluorid dikyslíku a díky jeho silným oxidačním vlastnostem převádí mnohé sloučeniny na fluoridy. Organické látky při reakci s tímto plynem většinou shoří.<sup>3,5</sup>

Fluor je odvozen od latinského slova *fluere*, tj. téci, dodnes je například fluorid vápenatý  $\text{CaF}_2$  využíván jako tavidlo. Poprvé byl fluor izolován elektrolýzou chlazené směsi fluoridů, a to v roce 1886. I v současnosti se získává výhradně elektrolyticky, nejčastěji elektrolýzou taveniny fluoridu draselného a fluorovodíku. Podle potřebného množství se fluor dodává buď v tlakových lahvích, nebo se připravuje až v laboratoři v malých elektrolýzách.<sup>3,5,6</sup>

Fluor se v minulosti hojně využíval pro výrobu tzv. freonů, chlorfluorových derivátů uhlovodíků, např. dichlordifluormethanu  $\text{CCl}_2\text{F}_2$ . Nyní je jejich výroba v mnoha státech zakázána, díky negativnímu vlivu na ozonovou vrstvu atmosféry. Fluorované sloučeniny



se využívají k výrobě mazacích olejů, pohonných hmot, elektrosoučástí a uplatňují se v chemii polymerů (teflon). Neméně významné jsou i anorganické sloučeniny, např. anorganické fluoridy pro výrobu hliníku či kyseliny fluorovodíkové. Fluor se rovněž využívá jako silné oxidační a fluorační činidlo.<sup>6</sup>

### **2.1.2 Výskyt fluoridů v životním prostředí**

Fluoridy mohou být do životního prostředí uvolňovány jak přirozenou cestou, tak při průmyslovém zpracování některých látek. V půdě se fluoridy vyskytují v již zmíněných minerálech a jsou součástí většiny typů půd. Ionty fluoru jsou také emitovány vulkanickou činností a vypařováním mořské vody. Hlavním průmyslovým zdrojem fluoridů je výroba hliníku, při které se používá kryolit pro snížení teploty tání bauxitu. Dále se s fluorem setkáme při výrobě některých kovů, skla, keramiky, hnojiv, lepidel apod. Za antropogenní zdroj považujeme i fluoridovanou pitnou vodu. Fluoridy ve formě plynů nebo pevných částic se vyskytují také v atmosféře, kde mohou setrvat delší dobu, např. fluorid sírový i několik set let. Ve vzduchu jsou fluoridy přenášeny pomocí větru na velké vzdálenosti, deštěm hydrolyzují a vrací se na zem. Ve vodných prostředích jsou fluoridy závislé na pH. V kyselém prostředí se tvoří kyselina fluorovodíková a fluoridy jsou pak obtížně získávány.<sup>7</sup>

V povrchových vodách koncentrace fluoridů kolísají na základě vlivu geologického podloží a jiných zdrojů emisí. Obecně se pohybují v rozsahu 0,01 – 0,3 mg/l. V mořské vodě je jejich koncentrace vyšší, a to 1,4 – 1,5 mg/l. Zdroje pitné vody obsahují fluoridy, ať už ve větším či menším množství. Záměrně fluoridované pitné vody obsahují 0,7 – 1,2 mg/l fluoridů. U nefluoridované vody je koncentrace různá, v závislosti na lokalitě vodního zdroje. Za nejvhodnější koncentraci fluoridů v pitné vodě je považována hodnota 1 mg/l. Podle našeho zákona je obsah fluoridů v pitné vodě limitován nejvyšší mezní hodnotou 1,5 mg/l.<sup>7,8</sup>

### **2.1.3 Fluoridy v potravinách**

Všechny potraviny obsahují alespoň stopová množství fluoridů. Nejvíce jich je obsaženo v čaji. Celkové koncentraci fluoridů v čaji přispívají rozpustné fluoridy z čajových lístků a z pitné vody a také doba vyluhování. Mezi další zdroje bohaté na fluor patří mořské ryby, hovězí maso či některé druhy zeleniny. Zejména ryby konzervované, které se pojídají i s kůží, mají vysoký obsah fluoru. Množství fluoridů ve vybraných potravinách, nápojích

a minerálních vodách je uveden níže (Tab. I). Nutno podotknout, že obsah fluoridů v nápojích a jídlech je ovlivněn fluoridy obsaženými ve vodě použité k jejich přípravě.<sup>7,9</sup>

**Tabulka I.** Obsah fluoridů v potravinách, nápojích a minerálních vodách

<b>Potraviny</b> <sup>10,11</sup>	<b>Koncentrace fluoridů v mg/kg</b>	<b>Minerální vody a nápoje</b> <sup>2,11,12</sup>	<b>Koncentrace fluoridů v mg/l</b>
Černý čaj	30-441	Vincentka	3,08
Želatina	130-160	Hanácká kyselka	1,36-1,91
Sardinky v konzervě	61	Poděbradka	1,06
Hovězí maso bez kosti	14-42	Dobrá voda	0,67
Špenát vařený	0,703	Rajec	0,1
Hrách vařený	0,57	Horský pramen	0,113
Chléb celozrnný	0,285	Českomoravská voda	0,068
Hlávkový salát	0,133	Aqua Belle	0,154
Máslo	0,038	Grapefruitový džus	6,8
-	-	Coca-cola	0,82-0,98

## **2.2 Fluoridy v lidském těle**

Fluoridy snadno pronikají buněčnými membránami a lze je nalézt ve všech lidských orgánech. K jejich vstřebání dochází především v gastrointestinálním traktu a dále jsou distribuovány krví do celého těla. Fluoridy se akumulují převážně v tvrdých tkáních, a jejich celkové množství v těle je závislé zejména na obsahu fluoridů v pitné vodě, kterou člověk pravidelně konzumuje.<sup>7</sup>

### **2.2.1 Denní příjem fluoru**

V celkovém příjmu fluoru jsou mezi jedinci značné individuální rozdíly. Obsah fluoru v těle je ovlivněn v první řadě množstvím fluoridů v pitné vodě a v potravinách, dále v prostředcích na čištění zubů, nutričních doplňcích a případně profesionálními expozicemi. Denní dávka fluoridů není přesně známa, za optimum se považuje 0,05 – 0,07 mg/kg

hmotnosti člověka na den. Příjem fluoridů u dětí a dospělých většinou nepřevyší 2 mg denně. Celkové množství fluoru v těle je přibližně 7 g.<sup>9,13</sup>

Odhadovaný dostatečný a zároveň bezpečný denní příjem fluoridů pro děti a dospělé je uveden v tabulce (Tab. II). Data byla stanovena v USA organizací ESADDI (Estimated Safe and Adequate Daily Dietary Intake).<sup>14</sup>

**Tabulka II.** Optimální denní příjem fluoridů (převzato z cit.<sup>14</sup>)

Věk	Množství fluoridů v mg/den
0-0,5 let	0,1-0,5
0,5-1 let	0,2-1
1-3 let	0,5-1,5
4-6 let	1-2,5
7-15 let	1,5-2,5
Dospělí	1,5-4

## 2.2.2 Metabolismus fluoridů

### Absorpce

Účinnost absorpce jakékoli látky je závislá na její rozpustnosti v daném prostředí. Mezi dobře rozpustné fluoridy ve vodě patří fluorid sodný, který významně přispívá ke zvýšení absorpce fluoridů v těle. Ke vstřebávání fluoridů požitých v potravě dochází především v žaludku a střevech. Kyselé prostředí žaludku vyvolává vznik kyseliny fluorovodíkové, která se snadno vstřebává do žaludeční sliznice. Jakmile se pak kyselina dostane na sliznici méně kyselou, disociuje za vzniku fluoridů. Z potravin se v zažívacím traktu absorbuje asi 80 % fluoridů a z pitné vody až 97 %.<sup>7,15,16</sup>

Absorpci snižují nebo zvyšují různě rozpustné fluoridy obsažené ve stravě. Například výrazné snížení podporují fluoridy ve spojení s vápníkem, hořčíkem či hliníkem. Dochází ke vzniku málo rozpustných sloučenin, které se poté vylučují močí nebo stolicí. Naopak zvýšení absorpce umožňují sulfáty, fosfáty a molybden. Biologická dostupnost rozpustných fluoridů může být redukována tím, že je látka požitá současně s jinou potravinou, například s mlékem. Malá množství fluoridů mohou být vstřebávána i v ústech. Přes dýchací ústrojí jsou fluoridy

ve formě pevných částic či v plynném stavu absorbovány téměř všechny. Informace o absorpci fluoridů kůží jsou známy pouze v akutních případech potřísnění kyselinou fluorovodíkovou.<sup>7,16</sup>

### **Distribuce**

Krevním oběhem jsou fluoridy rychle distribuovány do tělních tekutin a následně do tkání. Shromažďují se především v kalcifikovaných tkáních, jako jsou kosti a zuby. Jsou to jediné ionty, které jsou schopny ukládat se do těchto tkání průběžně, tzn., že se koncentrace fluoridů stále zvyšují, až do určitého věku jedince a poté je jejich koncentrace konstantní. Ve studiích se uvádí, že maximální koncentrace fluoru v kostech je dosaženo přibližně ve věku 50 let. Inkorporací fluoridů do tvrdých tkání se jejich chemické složení mění jen nepatrně. Stoupne hladina hořčíku a klesne obsah uhličitánů a citrátů.<sup>7,15</sup>

Koncentrace fluoridů v měkkých tkáních se zvyšují pouze dočasně v závislosti na vystavení organismu nárazovým expozicím. V období těhotenství se fluor z matky na dítě přenáší placentou. V měkkých tkáních se fluoridy obecně neakumulují a jejich množství je srovnatelné s obsahem fluoridů v krvi.<sup>7</sup>

### **Vylučování**

Fluoridy jsou primárně vylučovány močí a v menším měřítku také stolicí, mlékem, potem a slinami. Rychlost vylučování fluoridů u dětí a dospívajících je nižší než u dospělých jedinců. Příčinou je spotřeba fluoridů na stavbu kostí a zubů v období jejich vývoje.<sup>7</sup>

Hladina fluoridů v moči je závislá na mnoha faktorech. Závisí na expozici, rozsahu a rychlosti ukládání fluoridů v kalcifikovaných tkáních, věku, pH a tvorbě moči a na funkci ledvin. Pokud jsou ledviny vážně poškozené, je exkrece fluoridů pomalejší. Naopak zvýšené množství vylučovaných fluoridů bylo pozorováno u lidí, jejichž profese přímo souvisela s výskytem fluoridů a u lidí žijících v oblastech s endemickou fluorózou.<sup>7,9</sup>

### **2.2.3 Výskyt fluoridů**

Fluoridy jsou přítomny pravděpodobně ve všech lidských orgánech, tkáních a tekutinách. Až 99 % celkového obsahu fluoridů v lidském organismu je obsaženo v kalcifikovaných tkáních a zbytek je obsažen v krvi a měkkých tkáních.<sup>7</sup>

## **Kosti**

V kostech je koncentrace fluoridů závislá na věku, pohlaví, typu kosti a specifické expozici daného jedince. Během vývoje organismu se fluoridy do kostí začleňují velmi rychle, s rostoucím věkem se však příjem fluoridů do kostí snižuje. Na rozdíl od zubů, mohou kosti fluoridy zpětně uvolňovat. Jedná se o velmi pomalý proces resorpce, k němuž dochází v průběhu mnoha let. U dospělých lidí, kteří pili vodu s obsahem fluoridů 0,97 mg/l po dobu 14 – 18 let, byla průměrná koncentrace fluoridů v kosti kyčelní 1090 µg/g.<sup>7,9,15,16</sup>

## **Zuby**

Ve sklovině ani v dentinu nejsou fluoridy rozloženy rovnoměrně. Na povrchu skloviny je koncentrace iontů fluoridu vyšší než uvnitř. V povrchové sklovině bylo množství fluoridů stanoveno na 1,4 – 2,1 g/kg. Tyto hodnoty byly experimentálně získány u dospělých lidí, kteří žili v oblastech s fluoridovanou pitnou vodou s koncentrací 1 mg/l. S rostoucím věkem jedince hladina fluoridů ve sklovině stoupá. V dentinu je koncentrace fluoridů asi 2 – 3 krát vyšší než ve sklovině, příčinou je systematické omývání jeho povrchu krví.<sup>7,15</sup>

## **Měkké tkáně**

Do měkkých tkání vniká fluor během několika minut po absorpci v žaludku. Nejvyšší koncentrace fluoridů je v ledvinách a je dokonce větší než v plazmě. Vysoké koncentrace jsou rovněž v aortě a brzlíku. V ostatních tkáních je koncentrace fluoridů nižší a je shodná s koncentrací fluoridů v krvi.<sup>7,9</sup>

## **Krev a plazma**

V krvi je fluor obsažen v anorganické a organické formě. V celé krvi byla koncentrace fluoridů stanovena v rozmezí 20 – 60 µg/l, kdy výsledky byly rovněž zpracovány u lidí, kteří pili fluoridovanou vodu. Téměř všechen fluor v plazmě je ionizován a není vázán na žádné makromolekuly. Jenom v plazmě se množství fluoridů pohybuje mezi 7,6 – 28,5 µg/l. Zcela objasněn zatím nebyl význam menšinových organických fluoridů, víme ale, že se vážou na plazmové proteiny a nedají se detekovat elektrodou.<sup>7,9,15</sup>

## **Mléko**

Mateřské mléko je velice chudý zdroj fluoridů. Ani při zvýšené konzumaci fluoridů se jejich obsah v mléce nezvýší. Koncentrace fluoridů v mateřském mléce se pohybují v řádech desítek nanogramů na gram. <sup>7,15</sup>

## **Sliny**

Koncentrace fluoridů ve slinách je jen o málo nižší než v plazmě. Po požití většího množství fluoridů se jejich koncentrace rychle zvýší. Fluor obsažený ve slinách se hromadí v zubním plaku a jeho koncentrace se pohybuje mezi 5 – 50 ppm. <sup>9,17</sup>

## **Moč**

U dospělého člověka se močí vyloučí 40 – 60 % přijaté dávky fluoridů. Fluoridy se močí vylučují velmi rychle a jejich koncentrace je téměř srovnatelná s koncentrací fluoridů v konzumované vodě. Při zpracování analýz moči a pitné vody, byla mezi koncentracemi fluoridů v moči a v pitné vodě zjištěna lineární závislost. Obecně se hladina fluoridů v moči pohybuje v hodnotách 200 – 1000 µg/l. <sup>7,9</sup>

## **Nehty a vlasy**

Tyto materiály se v nedávné době staly předmětem zájmu v oblasti výzkumu vhodných látek fluoridové expozice. <sup>21</sup> Nehty se budeme zabývat později (viz 2.4).

## **2.3 Vliv fluoridů na lidské zdraví**

Onemocnění vzniklá nedostatkem či nadměrným množstvím fluoru v těle, se týkají především zubů a kostí. Ve vhodných koncentracích jsou však pro zdravý vývoj těchto tkání nezbytné. Velmi málo běžné jsou případy akutní otravy fluorem, které mohou vyvolat až zástavu srdce. <sup>7</sup>

### **2.3.1 Vliv na zuby**

Fluoridy mohou mít na zdraví zubů jak pozitivní, tak negativní vliv. Koncentrace fluoridů v pitné vodě je v záporném vztahu k prevalenci zubního kazu, zatímco dentální fluoróza je ve vztahu kladném. Pitná voda by tedy měla obsahovat přijatelné množství

fluoridů, tak aby zuby před kazem chránila a zároveň minimalizovala vznik fluorózy. Za takovou koncentraci je považována hodnota okolo 1 mg/l.<sup>7</sup>

### **Antikariézní účinek fluoru**

Protikazivý efekt fluoru byl poprvé objeven na počátku 20. století zubním lékařem F. McKayem. U svých pacientů si povšiml hnědavých skvrn, které se nacházely na stálých zubech. Zvláštní bylo, že takto postižené zuby byly velmi odolné proti zubnímu kazu. Celá situace byla objasněna až o několik let později, kdy bylo prokázáno, že hnědé skvrnky jsou odrazem zvýšené koncentrace fluoridů v pitné vodě a způsobují fluorózu. S tímto objevem se současně začaly pozorovat pozitivní reakce ve smyslu antikariézního účinku fluoru.<sup>15</sup>

Vysoký účinek fluoridů spočívá v jejich začlenění do krystalické mřížky hydroxyapatitu, který je obsažen ve sklovině. V průběhu náhrady hydroxidových iontů uvnitř molekul hydroxyapatitu se tvoří nové krystaly fluorhydroxyapatitu. Ty jsou oproti původnímu složení skloviny mnohem pevnější a odolnější. Léčba časné kazivé léze skloviny je proto spojena s přípravky obsahujícími fluor, který činí sklovinu rezistentnější. Při používání prostředků s nízkou koncentrací fluoridů, např. zubních past, se tvoří malé krystalky. Aplikace vysoce koncentrovaných fluoridových preparátů naopak způsobují vznik velkých krystalů, které mohou ponechat tkáň až hypomineralizovanou. Jiné fluoridované prostředky jako ústní vody, gely a laky mají rovněž výrazný antikariézní účinek.<sup>9</sup>

### **Dentální fluoróza**

Fluoróza zubů je onemocnění, jehož příčinou je nadměrný příjem fluoridů v období jejich vývoje. Nejčastěji se s ní setkáváme u dětí do 6 až 8 let věku. Charakteristickým znakem je skvrnitě mramorování na povrchu zubu. Vysoké dávky fluoridů způsobují zvýšenou mineralizaci v rámci rozvoje zubu, doprovázenou ztrátou proteinů. Mírné formy dentální fluorózy se vyznačují horizontálními pruhy bílé křídové barvy, těžší průběh nemoci je spojován s nažloutlými až hnědými skvrnami. Inkorporace velkého množství fluoridů zřejmě interferuje s normálním vývojem zubů tak, že se mění buněčná struktura skloviny a buněčný metabolismus. Vystavení organismu nadměrným dávkám fluoridů po ukončení vývoje zubů má pravděpodobně malý vliv na rozsah fluorózy. Studie provedené v USA ohlásily, že zubní fluoróza postihuje až 60 % obyvatelstva, pokud zdroj pitné vody obsahuje koncentraci fluoridů vyšší než 2 mg/l. Při koncentracích dosahujících 6 mg/l je fluorózou

postiženo dokonce 100 % obyvatel. V některých částech světa obsahuje voda vysoké, přirozeně se vyskytující koncentrace fluoru, a je tak zodpovědná až za 65 % endemické fluorózy ve světě. <sup>7,16,18</sup>

### **2.3.2 Vliv na kosti**

#### **Osteoporóza**

Fluor je jedním z mála prvků, ovlivňující tvorbu a pevnost kostní tkáně. Účinky fluoridu sodného byly zkoumány ve studiích pro léčbu osteoporózy, choroby projevující se řídnutím kostní tkáně. Některé epidemiologické studie poukazují na nižší incidenci osteoporózy v oblastech s fluoridovanou pitnou vodou, než v místech s menší koncentrací fluoridů. Horní hranice léčebné dávky fluoridů pro dosažení pozitivních výsledků v léčení osteoporózy je 10 – 200 µg/l. Vyšší hladiny fluoru v plazmě už mohou mít nežádoucí vedlejší účinky. V jiných studiích se uvádí, že podávání malých dávek fluoridů zároveň s vápníkem a vitamínem D vedlo k nárůstu kostní hmoty o 5 – 10 % a k redukci kostních zlomenin. Vysoké dávky fluoru naopak způsobují zvýšený počet zlomených kostí. <sup>7,19</sup>

#### **Skeletální fluoróza**

Kosterní fluoróza vzniká po dlouhodobé expozici zvýšeným koncentracím fluoridů. Vyznačuje se zvýšenou hmotností a hustotou kostí doprovázenou řadou symptomů. Mechanismus fluorózy kostí není stále dostatečně vysvětlen, jednotlivé fáze vývoje tohoto onemocnění však zdokumentovány jsou. V časných stádiích jsou příznaky spojeny s bolestí a ztuhlostí páteře a snížené pohyblivosti kloubů. Klinické stadium ochromující skeletální fluorózy se projevuje sníženou hybností, kostními deformacemi, kalcifikací vazů, atrofií svalů a neurologickými poruchami. Vývoj depozice fluoridů do kostí může kromě délky expozice ovlivnit i věk, stav výživy, funkce ledvin nebo příjem vápníku. Fluoróza se tak může projevit i později. Pacienti s poškozenými ledvinami, mají indispozici k intoxikaci fluoridů vyšší, a to díky snížené schopnosti jejich vylučování. V americké studii se uvádí, že při koncentraci fluoridů v pitné vodě nižší než 4 mg/l nebyl prokázán žádný důkaz skeletální fluorózy. <sup>7,16</sup>

### **2.3.3 Toxické účinky**

Akutní intoxikace fluoridy je velmi vzácná. Pokud se tak stane, klinický průběh otravy se často rozvíjí alarmující rychlostí. Příznaky otravy jsou spojeny se zvracením, průjmem,



malátností, křečemi v končetinách až zástavou srdce. Letální dávka fluoridu sodného pro dospělého člověka je odhadována na 32 – 64 mg/kg tělesné hmotnosti. U dětí byla letalita pozorována po konzumaci 5 – 30 mg/kg. Smrtelná dávka pro jiné fluorované sloučeniny je podobná.<sup>7,20</sup>

Akutní toxicita bývá způsobena převážně konzumací nesprávně fluoridovaných potravin a vody nebo nevhodnou suplementací fluoridovaných přípravků. První pomocí při takové otravě je požití 1% roztoku glukonátu nebo chloridu vápenatého, kdy vápenaté ionty vyváží fluorid do málo rozpustné formy. V nouzi je možné vypít i mléko.<sup>20</sup>

Chronické otravy fluorem byly popsány u pracovníků v kryolitových dolech, v hliníkárnách či továrnách na výrobu hnojiv a u obyvatel žijících v blízkosti těchto objektů. Zcela prozkoumáno ještě nebylo podezření z karcinogenního vlivu fluoridů. V měkkých tkáních byly v jistém prameni rakovinotvorné účinky vyvráceny. Možný rakovinotvorný účinek ale mají na kosti. Pozitivní důkazy o teratogenním působení fluoru zatím prokázány nebyly.<sup>7,9,20</sup>

## **2.4 Fluoridy v nehtech**

I přesto, že se fluoridy v lidském těle nacházejí téměř všude, nejsou všechny tělesné tkáně a tekutiny vhodné pro jejich stanovení. Nejnověji prozkoumanými materiály fluoridové expozice jsou nehty a vlasy. Dosavadní znalosti zatím nedovolují použití těchto látek pro odhad rizika fluorózy, mohou však hrát významnou roli v epidemiologických průzkumech.<sup>21</sup>

### **2.4.1 Biomarkery fluoridové expozice**

Biomarker, neboli biologický ukazatel, je látka, která je objektivně měřitelná a uznávaná jako indikátor normálních biologických či patologických procesů nebo odpovědi na terapeutickou intervenci.<sup>22</sup>

Mezi historicky známé biomarkery fluoridové expozice patří kosti a dentin. Hlavním problémem použití vzorků kostí je jejich obtížné a invazivní odebrání. Oproti vzorkům kostí je dentin získatelný snadněji a jeví se jako jeden z nejlepších indikátorů fluoridové zátěže.<sup>23</sup>

Vůči kalcifikovaným tkáním mají ostatní biologické materiály koncentraci fluoridů výrazně nižší, přesto se v nich fluoridy dají stanovit. Mezi obvyklé materiály patří moč a krev. Močí se u dospělých lidí vyloučí asi polovina celkového množství fluoridů přijatého

organismem a pro odhad obsahu fluoru je vhodnou látkou. Nevýhodou může být její infekčnost a transport vzorků, neboť se musí uchovávat v chladu, podobně jako krev.<sup>19</sup>

Použití možných biomarkerů fluoridové expozice bylo náplní několika studií. V jedné z nich byly plazma, sliny a moč hodnoceny z hlediska vhodných biomarkerů pro aktuální expozici fluoridů a kosti a dentin pro chronický výskyt fluoridů. Tyto biologické materiály mají své přednosti, ale i určitá omezení. Hledal se proto takový biomarker, který by se dal jednodušeji získat, uchovávat a analyzovat. Za přijatelný a dosažitelný biomarker fluoridové expozice byly navrženy nehty.<sup>19,24</sup>

#### **2.4.2 Nehty jako biomarker fluoridové expozice**

Možnost využít nehty jako ukazatele fluoridové koncentrace v těle, byla poprvé popsána Whitfordem a kol. v roce 1999. Nehty jsou dobře dostupné, lze je shromažďovat bezbolestně, snadno se přepravují a skladují a jedná se o neinvazivní materiál.<sup>25,26</sup>

Fluoridy v nehtových ústřížcích byly analyzovány v několika studiích. Studie z roku 1999 poskytla údaj o rozdílu koncentrací v nehtech na rukou a v nehtech na nohou. Bylo zjištěno, že množství fluoridů v nehtech na rukou je v některých případech až o 50 % vyšší. Pro ilustraci bylo analýzou jedné sady vzorků v případě nehtů z rukou dětí stanoveno množství fluoridů na  $2,3 \pm 0,15$  mg/kg a z nehtů nohy na  $1,41 \pm 0,06$  mg/kg. Další experimenty jen potvrdily, že množství fluoridů v nehtech ruky je větší.<sup>24</sup>

V novější studii už takové rozdíly v koncentracích fluoridů v nehtech na rukou a na nohou pozorovány nebyly, přesto je pro stanovení fluoridů v nehtech doporučováno používat nehty ruky. Důvodem je i jejich rychlejší růst a tím nashromáždění většího počtu ústřížků ve stejném časovém úseku. V této studii byly dále hodnoceny různé environmentální a individuální faktory a jejich vliv na koncentraci fluoridů v nehtech. Největší vliv na koncentraci měl obsah fluoridů v pitné vodě a faktor geografické oblasti. Byl hodnocen i vliv věku, pohlaví a tempa růstu nehtů.<sup>25</sup>

Studie přinesla důkazy o značném vlivu fluoridů obsažených v pitné vodě na koncentraci fluoridů v nehtech, což úzce souviselo se zeměpisnou oblastí. Experiment spočíval v rozdělení lidí do skupin podle toho, v jakém místě žijí, tedy jakou vodu konzumují a do skupin podle věku dárce nehtů. Skupiny byly seřazeny vzestupně od A do E, přičemž nejnižší koncentraci fluoridů v pitné vodě představovala skupina A a největší skupina E.

Podívejme se například na skupinu D, kdy fluoridová koncentrace ve vodě činila  $0,72 \pm 0,02$  mg/l. Věková skupina dětí od 3 do 7 let vykazovala koncentraci fluoridů v nehtech na  $2,57 \pm 0,32$  mg/kg, skupina mladistvých od 14 do 20 let vykazovala  $3,09 \pm 0,75$  mg/kg, skupina dospělých od 30 do 40 let vykazovala  $8,32 \pm 1,35$  mg/kg a poslední skupina ve věku od 50 do 60 let vykazovala koncentraci fluoridů  $10,2 \pm 2,4$  mg/kg.<sup>25</sup>

Výsledkem analýzy bylo, že koncentrace fluoridů v nehtech na rukou pro skupiny A, B a C byly nejnižší a pro skupiny D a E nejvyšší. Vyšší fluoridovou koncentraci vykazovali starší lidé ve věku 30 – 60 let a celkově byla koncentrace vyšší u žen. Podle studie je vyšší koncentrace fluoru u žen zapříčiněná vyšší tendencí hromadění fluoru v kostech a období po dosažení menopauzy, kdy se fluoridy z kostí uvolňují ve zvýšené míře.<sup>25</sup>

Nevýhodou nehtů může být jejich relativně zdlouhavé shromažďování a získání nízkých navážek. Pro představu má jedna dávka nehtových ústřížků z obou rukou navážku zhruba 0,1 g a dají se získat v 1-2 týdenním intervalu.

## **2.5 Metody stanovení fluoridů v nehtech**

Fluoridy se dají stanovit různými analytickými metodami. Většina z nich je použitelná pro všechny biologické materiály. Obecně jsou pevné vzorky a vzorky se složitou maticí nejdříve podrobeny mineralizaci vázaného fluoru na fluoridové ionty a posléze stanoveny vhodnou měřicí technikou. Výzkumu metod pro stanovení fluoridů v těle se rozsáhle věnoval např. Venkateswarlu (1974, 1975).<sup>20,27</sup>

V této kapitole jsou popsány dva způsoby přípravy vzorků pro následné stanovení fluoridů iontově-selektivní elektrodou, přičemž oba způsoby mohou být aplikovány na vzorky nehtů. První již ověřená metoda HMDS difúze získává fluoridy z pevného vzorku tak, že jsou difundovány a poté zachycovány v tzv. pastích, kde se vyměňují za hydroxidové ionty. Druhý způsob izolace fluoridů využívá chemického rozkladu vzorku v mikrovlnném mineralizátoru.

## 2.5.1 Metoda hexamethyldisiloxanové difúze

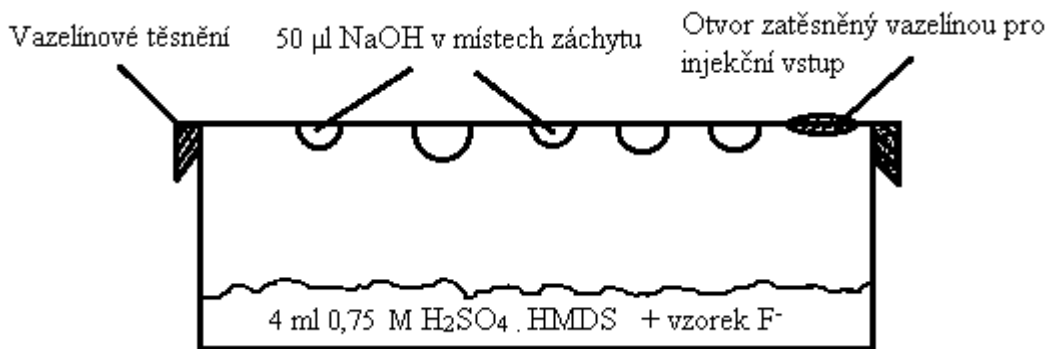
Metoda hexamethyldisiloxanové (HMDS) difúze byla vyvinuta Tavesem v roce 1968 a je považována za velmi uspokojivou pro stanovení fluoridů. Zde si popíšeme metodu HMDS difúze upravenou podle Whitforda a Reynoldse (1979).<sup>20</sup>

Technika spočívá v difúzi fluoridů ze vzorku a následném stanovení iontově-selektivní elektrodou. Analyzovány mohou být vzorky plazmy, moči, žluče, tkáňových homogenátů a mozkomíšního moku. Z tvrdých a polotvrdých materiálů se mohou použít vzorky kostí, skloviny, zubního plaku, zubního prášku atd. Touto metodou se dají kvantitativně stanovit fluoridy z většiny lidských vzorků, včetně nehtů.<sup>20,25</sup>

### 2.5.1.1 Základní proces HMDS difúze<sup>20</sup>

Proces izolace iontů fluoru probíhá v difúzní „nesmáčitelné“ nádobě (např. Petriho misky, Falcon 1007). Do dna nádoby se odměří 2 ml vody bez fluoridů a známé množství vzorku. U kapalných vzorků a standardů musíme znát jejich objem a u pevných jejich hmotnost. Na vnitřní straně nádoby jsou asi v 5 kapkách umístěny tzv. pasti (místa pro záchyt fluoridových iontů), kdy každá past obsahuje 50  $\mu$ l 0,05 M NaOH. Víko nádoby je z vnitřního okraje potřeno vazelínou a pečlivě uzavřeno tak, aby ve vazelíně nezůstaly vzduchové bubliny.

Pomocí injekční stříkačky jsou do roztoku přes malý otvor, předem vypálený v horní části nádoby, přidány 2 ml 1,5 M  $H_2SO_4$  nasycené roztokem hexamethyldisiloxanu. Otvor je poté ihned utěsněn vazelínou. Satureovaná kyselina sírová se předem připraví v dělicí nálevce smícháním asi 10 ml HMDS přidávaným k 500 ml roztoku 1,5 M  $H_2SO_4$ . Roztokem se silně třepe 5 minut. Během difúzního procesu se s roztoky v nádobách jemně míchá v rotační třepačce.



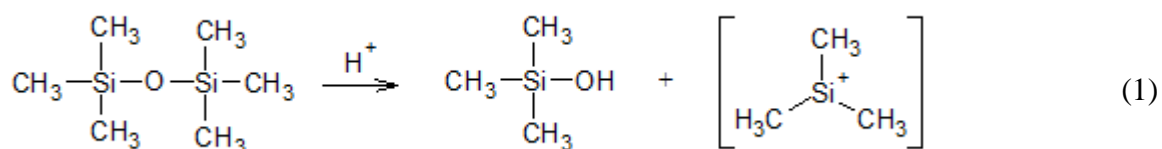
**Obr. 1.** Základní popis HMDS difúze usnadňující izolaci iontů fluoru (převzato z cit. <sup>20</sup>)

Ačkoli je více než 95 % fluoridů z většiny druhů vzorků zachyceno během 3 hodin, může proces difúze pokračovat i přes noc nebo mohou být vzorky připraveny v dopoledních hodinách a analyzovány odpoledne.

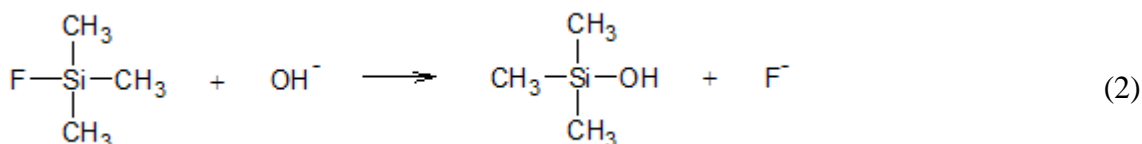
Po skončení několikahodinové difúze se otevře víko nádoby a do pastí s hydroxidem sodným se přidá 25 µl 0,2 M kyseliny octové, aby se vytvořil octanový pufr s pH okolo 4,8. V průběhu difúzního procesu dochází k částečné ztrátě hydroxidu z pastí. Důvodem je osmolarita kyselého roztoku na dně nádoby, jenž je mnohem vyšší než u hydroxidu v pasti. Konečný objem v pasti je proto upraven na 75 µl přidáním vody bez fluoridů. Alternativně může být past vysušena při teplotě 37 °C s následným přidáním známého množství kyseliny octové. Do roztoku na dně nádoby se poté vloží fluoridová ISE a miniaturní kalomelová elektroda pro potenciometrické stanovení.

### 2.5.1.2 Základní princip HMDS difúze <sup>20</sup>

V přítomnosti kyseliny sírové disociují molekuly HMDS za vzniku silanového radikálu:



Fluoridový ion ze vzorku či standardu tvoří se silanovým radikálem trimethylfluorsilan. Tato molekula se pak dostane do alkalické pasti. Fluoridy se vymění za hydroxidové ionty, čímž se fluoridy zachytí do pasti a po reakci zůstane trimethylsilanol. Afinita hydroxidových a fluoridových iontů na silanový radikál je velmi podobná, proto nastane rozsáhlá výměnná reakce:



Množství fluoridů, které lze do pasti získat, je omezeno látkovým množstvím hydroxidových iontů. Například, pokud past obsahovala 50  $\mu\text{l}$  0,05 M NaOH, pak nebude v pasti více než 2,5  $\mu\text{mol}$  fluoridů.

Difúzní HMDS metoda je jednoduchá a relativně rychlá. Během 4 hodin lze připravit 100 vzorků a druhý den je možné je vyhodnotit. Negativní vliv na stanovení může mít oxid uhličitý nebo samotné fluoridy, které způsobují částečnou nebo úplnou neutralizaci zásadité pasti. Oxid uhličitý se při procesu uvolňuje z některých vzorků a reaguje s hydroxidovými ionty, čímž je odstraňuje z pasti a fluoridové ionty se pak nemají za co vyměnit. Řešením, jak odstranit oxid uhličitý, je vykonat před analýzou předběžnou difúzi vzorků před samotnou HMDS difúzí. Ke vzorku se přidá kyselina sírová a směs se nechá stát v otevřené nádobě po dobu 10 minut. K tomu můžeme využít již připravenou saturovanou kyselinu sírovou, ze které však musíme odstranit HMDS. To lze provést tak, že ke kyselině přidáme stejný objem destilované vody a roztok zahříváme tak dlouho, až se vrátí do původního objemu. Během procesu se veškerý obsah HMDS vypaří. Jinou možnou chybou při stanovení je kontaminace antikoagulanty používanými zejména u vzorků plasmy nebo krve.

### 2.5.1.3 Metoda v praxi

Metoda HMDS difúze dle Whitforda byla pro stanovení fluoridů v nehtech využita v několika experimentálních studiích. Obvykle byly nehtové ústřížky nejprve očištěny deionizovanou vodou a zubním kartáčkem a poté byly ponechány v ultrazvukové lázni s deionizovanou vodou po dobu 10 minut. Následně byly sušeny při teplotě 60  $^{\circ}\text{C}$  a zváženy.

Pro stanovení pak byly postupným ředěním připraveny dvě sady standardů. Přičemž jedna sada byla ponechána difúzi stejně jako vzorky a druhá ne. Srovnání naměřených hodnot napětí prokázvalo, že fluoridy v difundovaných standardech byly kompletně zachyceny a analyzovány. Naměřené hodnoty potenciálů v difundovaných standardech a vzorcích byly převedeny na koncentraci fluoridů pomocí kalibrační křivky.<sup>19,24,25</sup>

## **2.5.2 Metoda mikrovlnného rozkladu s kyselinou dusičnou**

Metoda mikrovlnného rozkladu s kyselinou dusičnou spočívá v chemickém rozkladu vzorku a v následném stanovení fluoridů pomocí ISE, stejně jako u předchozí metody. Obecně si popíšeme základy rozkladu látek a dále rozklad na mokré cestě, podporovaný mikrovlnným zářením.<sup>28</sup>

### **2.5.2.1 Rozklad<sup>28</sup>**

Chemický rozklad látek je proces, při kterém dochází k absolutní destrukci původní sloučeniny. Rozloženou látku už nelze získat zpátky, jedná se o nevratný děj. Cílem rozkladu látek je získat vzorek, který bude mít vhodnou chemickou formu pro následující stanovení. Analýza takovýchto vzorků je výhodná díky jejich homogenitě, jednotnější matici a snadné manipulaci. Z hlediska materiálu můžeme rozkládat anorganické, organické i směsné sloučeniny.

Rozkladnými činidly jsou jak kyseliny, tak zásady. Patří sem například kyselina sírová, chloristá, dusičná nebo chlorovodíková. Kyseliny se využívají pro rozklad anorganických i organických sloučenin. V roztocích hydroxidů alkalických kovů se dobře rozkládají některé kovy a jejich slitiny. K radikálnějšímu rozkladu tavením se používají činidla tavící opět buď alkalická, nebo kyselá. Rozklad látek bývá často podporován tepelnou energií a zvýšeným tlakem.

### **Mokrý rozklad podporovaný mikrovlnným zářením**

Podíváme-li se na organické látky tak jednou z možností jejich rozkladu je provést rozklad na mokré cestě. Tento způsob patří k velmi rozšířeným a dodnes používaným laboratorním postupům. Na látku působíme rozkladným činidlem a zároveň vzorek

zahříváme. Činidlem je nejčastěji kyselina dusičná a tepla lze dosáhnout klasickým ohřevem nebo mikrovlnným zářením za normálního, zvýšeného či vysokého tlaku.

Vysoce efektivní jsou rozklady spojené s teplem generovaným mikrovlnným zářením, neboť výrazně zkracuje dobu rozkladu, snižuje množství rozkladných činidel, dochází k prakticky úplnému rozkladu matrice vzorku atd. Teplo se tak rychle generuje přímo uvnitř vzorku, přičemž materiál rozkladných nádob se chová jako izolant.

Mokrý rozklad ať už při normálním nebo zvýšeném tlaku probíhá ve třech stupních: karbonizace, oxidace a následný rozklad látky. Efektivnější je rozklad při vyšších tlacích, kdy dojde ke zvýšení oxidačních schopností kyseliny a dosažení potřebné teploty. Pro tlakový (uzavřený) rozklad podporovaný mikrovlnným zářením se navážky vzorků pohybují v rozmezí od 0,1 až po 2 g a doba rozkladu je 15 až 45 minut podle typu vzorku.

Výhodou rozkladu je i zlepšení hygieny práce a snížení kontaminace vzorku. Naopak nevýhodou je zvýšení rizika bezpečnosti práce, používání relativně nízkých navážek a nemožnost dodatečného či postupného přidávání činidel.

### **Kyselina dusičná jako rozkladné činidlo**

Kyselina dusičná se používá hlavně pro rozklad organických sloučenin a její obvyklá koncentrace je 65 – 69 %. Kyselina dusičná je silná a má výrazné oxidační účinky. Je snadno dostupná ve vysoké čistotě, což má velký význam pro stopovou analýzu. Ve vodě vytváří dobře rozpustné dusičnany. Pro zvýšení oxidační schopnosti se mnohdy používá ve směsi s jinými kyselinami nebo peroxidem vodíku. Teplota varu 67% kyseliny dusičné je 121,7 °C, což pro rozklad za normálního tlaku není dostačující. K destrukci organického vzorku dochází až při teplotě 280 °C, je tedy potřeba vyššího tlaku.

### **2.5.2.2 Úprava mineralizátu po mikrovlnném rozkladu**

Po rozkladu je vzorek nutno nechat odpařit do sucha. Důvodem je přítomnost kyseliny dusičné snižující pH roztoku k hodnotám, při kterých množství fluoridů nelze kvantitativně stanovit. Vodíkové ionty tvoří s fluoridy málo disociovanou kyselinu fluorovodíkovou a takto vázané fluoridy se nedají jako ionty stanovit. Vzorek je tedy převeden do odpařovacího kelímku a odpařen na minimální objem, přičemž se ze vzorku odstraní přebytečné množství kyseliny.



## 2.6 Stanovení fluoridů iontově-selektivní elektrodou

Fluoridy se dají stanovit mnoha způsoby podle množství a formy v jaké se nacházejí. Různé sloučeniny fluoru mají i různé chemické vlastnosti a na základě toho vybíráme vhodnou metodu. Dají se stanovit metodou kapalinové chromatografie, spektrofotometrií, polarografií, volumetrií, gravimetrií či potenciometrií.<sup>11</sup>

### 2.6.1 Potenciometrie

Jedná se o elektrochemickou metodu, založenou na měření elektromotorického napětí (EMN) galvanického článku, složeného z indikační (měrné) a referentní (srovnávací) elektrody. EMN představuje rozdíl potenciálů mezi oběma elektrodami. Potenciál indikační elektrody závisí na koncentraci měřené látky v roztoku a potenciál referentní elektrody je na rozdíl od indikační elektrody konstantní a nezávisí na koncentraci sledované složky. Potenciometrii dělíme na dvě metody, na přímou a nepřímou. Pokud je koncentrace analytu stanovena přímo z naměřené hodnoty napětí, jedná se o přímou potenciometrii. Nepřímá metoda je založená na tzv. potenciometrické titraci, kdy měříme napětí článku v závislosti na objemu přidávaného titračního činidla a obsah stanovované látky se určí z jeho spotřeby. U přímého stanovení se používají převážně iontově-selektivní elektrody a koncentrace měřené látky se zjistí z hodnot EMN metodou kalibrační křivky nebo metodou standardního přídatku.<sup>29</sup>

### 2.6.2 Ionově-selektivní elektrody

Ionově-selektivní elektrody (ISE) představují potenciometrická čidla schopná sledovat pouze určité ionty v roztoku. Aktivní částí ISE je elektrochemická membrána, která odděluje vnitřní roztok elektrody od měřeného vnějšího roztoku. Následkem průchodu iontů přes fázové rozhraní *měřený roztok / membrána* se na obou stranách membrány vytváří potenciálové rozdíly vnitřních elektrických potenciálů. Rozdíl těchto potenciálů závisí na aktivitě procházejícího iontu. Pokud přes membránu pronikají pouze určité ionty, nazýváme tuto membránu semipermeabilní a vzniklý potenciál jako Donnanův. Vlastní iontově-selektivní čidlo představuje ISE s vnitřním roztokem a se zabudovanou vnitřní referentní elektrodou. Vnitřní elektrolyt zajišťuje na vnitřní straně membrány konstantní potenciál a pomocí vnitřní referentní elektrody je ISE připojena k měřicímu zařízení.<sup>29,30</sup>

### Selektivita ISE

Potenciál ISE neovlivňuje pouze koncentrace jednoho typu iontů, ale ve větší či menší míře také interferující ionty, které jsou přítomny v měřeném roztoku. Membránový potenciál ISE (pro 25 °C) popisuje *Nikolského-Eismanova rovnice*:

$$\Delta E = K - 0,0592 \log \left( [X] + \sum_i \left( k_i [i]^{\frac{z_X}{z_i}} \right) \right) \quad (3)$$

kde K je konstanta, kterou je třeba pro danou elektrodu (membránu) zjistit,  $z_X$  je nábojové číslo iontu X, který selektivně difunduje membránou, i je interferující iont,  $z_i$  je nábojové číslo interferujícího iontu a  $k_i$  je koeficient selektivity.<sup>30,31</sup>

V rovnici vystupuje tzv. koeficient selektivity, který vyjadřuje velikost vlivu interferujícího iontu na potenciál ISE a k dané elektrodě jej uvádí každý výrobce. V ideálním případě, kdy se koeficient selektivity rovná nule, stačí potenciál ISE vyjádřit *Nernstovou rovnicí*:

$$\Delta E = K + \frac{RT}{zF} \ln a_x \quad (4)$$

kde K představuje konstantní člen zahrnující veličiny nezávislé na aktivitě sledovaného iontu, R je univerzální plynová konstanta ( $8,314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ ), T je absolutní teplota (K), z je náboj iontu, F je Faradayova konstanta ( $96485,3 \text{ C mol}^{-1}$ ) a  $a_x$  je aktivita měřeného roztoku.<sup>29,30,32</sup>

### Mez detekce

Znalost meze detekce elektrody je důležitá pro přípravu vzorků k analýze. Je totiž možné vyhodnocovat jen vzorky o takovém množství fluoridů, které je elektroda schopna detekovat. Konkrétně u fluoridů, je citlivost potenciometrického stanovení zhoršena tím, že se vzorky před měřením zředí na ještě menší koncentraci přidávkem tlumícího roztoku TISAB (Total Ionic Strength Adjustment Buffer). Vzhledem k tomuto problému se snažíme minimalizovat objem veškerých vzorků a standardů.<sup>20</sup>

Mez detekce elektrody lze určit z kalibračního grafu. Při proměřování závislosti EMN na koncentraci sledované složky získáme kalibrační křivku, jejíž průběh vykazuje tři významné části. Prostřední část grafu přísluší přímce, jež udává závislost koncentrace sledovaného iontu na potenciálu elektrody odpovídající Nernstově rovnici. Tato závislost je však lineární jen do určité míry, kterou představují horní a dolní mez detekce. Při vysokých koncentracích nastává situace, kdy se ionty zaplní všechna místa v membráně a elektroda již

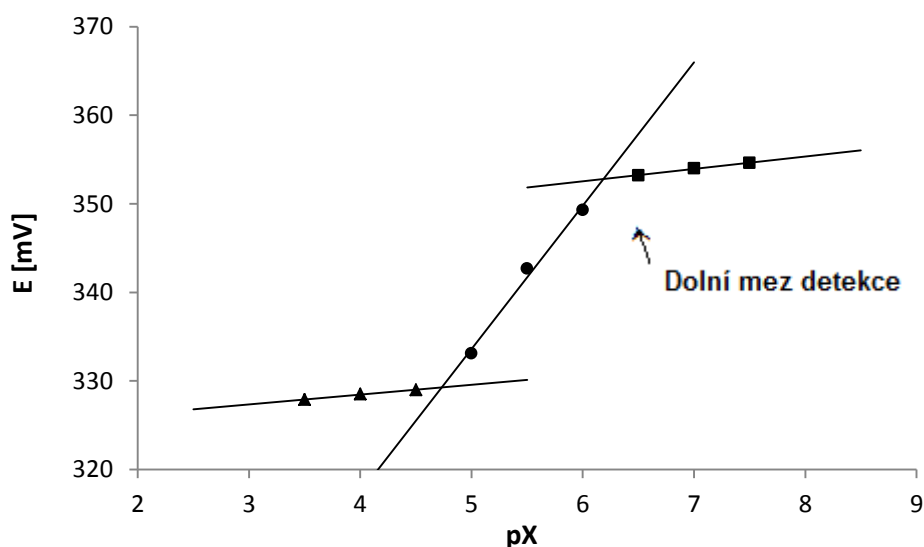
na další zvyšování koncentrace nereaguje. Toto nasycení poukazuje na horní mez detekce. Při velmi nízkých koncentracích je zase dosaženo dolní meze detekce, kdy elektroda již nemá žádnou odezvu.<sup>20,33</sup>

Koncentrační rozsah elektrody pro stanovení iontů pomocí ISE se pohybuje mezi  $10^{-6}$  až  $10^{-1}$  mol/l a nelineární částí křivky lze využít právě pro stanovení meze detekce. Obvykle se však neměří roztoky o koncentraci vyšší než  $10^{-1}$  mol/l a proto stanovujeme především dolní mez detekce.<sup>32</sup>

#### *Stanovení meze detekce*

Dolní mez detekce je nejnižší množství stanovované složky ve vzorku, které jsme schopni detekovat. Detekční limit lze určit vynesemím kalibračního grafu, kdy alespoň dva body definují lineární sklon křivky a dva body leží ve vodorovné pozici, kde již elektroda nereaguje na změnu koncentrace. Mez detekce elektrody je pak definována jako průsečík dvou přímek získaných prostřednictvím těchto bodů. Hodnotu meze detekce můžeme vypočítat pomocí dvou rovnic o dvou neznámých, získaných lineární regreseí obou křivek.<sup>34</sup>

Na obrázku (Obr. 2) jsou graficky znázorněny tři části kalibrační křivky, resp. její body, kterými jsou proloženy jednotlivé přímky lineární regrese a průsečík daných přímek odpovídající dolní mezi detekce.



**Obr. 2.** Kalibrační graf a znázornění dolní meze detekce

Mezi nejznámější iontově-selektivní elektrody patří skleněná či fluoridová elektroda. Skleněná ISE je nejstarší a v praxi stále používanou elektrodou. Její membrána je ze skla a používá se pro měření pH. Pro naše účely si popíšeme pouze ISE fluoridovou.

### 2.6.3 Fluoridová ISE

Fluoridová ISE se vyznačuje selektivitou k iontům fluoru a patří k nejselektivnějším elektrodám vůbec. Její membrána je tvořena monokrystalem fluoridu lanthanitého  $\text{LaF}_3$  s příměsí fluoridu europia  $\text{EuF}_2$ . Díky molekulám  $\text{EuF}_2$  v krystalické mřížce  $\text{LaF}_3$  se v krystalu nacházejí volná místa po chybějících aniontech fluoru. Do prázdných míst se pak mohou navázat jiné anionty fluoru. Důsledkem tohoto jevu je její značná selektivita k těmto aniontům. Vnitřní referentní elektrodou je elektroda argentschloridová a vnitřním roztokem je ekvimolární směs roztoků fluoridu sodného a chloridu draselného. Pro měření potenciálu se používá v kombinaci s elektrodou kalomelovou či jinou referentní elektrodou.<sup>29</sup>

Pro měření je třeba brát v úvahu, že fluoridová ISE má detekční limit asi  $1 \mu\text{mol/l}$ . V závislosti na stavu elektrody (stáří, koncentrace fluoridů v roztoku, ve kterém byla elektroda ponechána, mechanické poškození membrány, přítomnost bublinek ve vnitřním roztoku) se může mez detekce změnit a přiblížit k  $5 - 10 \mu\text{mol/l}$ .<sup>20</sup>

#### **Tlumící roztok TISAB**

Stanovení fluoridů iontově-selektivní elektrodou se provádí v prostředí tlumícího roztoku TISAB. Jedná se o vodný roztok směsi chloridu sodného  $\text{NaCl}$ , kyseliny octové  $\text{CH}_3\text{COOH}$ , octanu sodného  $\text{CH}_3\text{COONa}$  a komplexního činidla *trans*-1,2-diaminocyklohexan- $\text{N,N,N',N'}$ -tetraoctové kyseliny. Chlorid sodný zajišťuje konstantní iontovou sílu, směs kyseliny octové a její soli udržuje konstantní hodnotu pH v rozmezí 5 až 6, čímž eliminuje vliv interferujících hydroxidových iontů a komplexní činidlo váže rušivé ionty (např.  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ) do stabilních komplexů a brání tak tvorbě komplexů s fluoridy.<sup>28</sup>

## 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 3.1 Chemikálie

- vodný kalibrační roztok fluoridů 1,000 +/- 0,002 g/l, Analytika, ČR
- kyselina dusičná HNO<sub>3</sub> – 67% Analpure, Analytika, ČR
- roztok Tisab-F, Theta'90, ČR
- deionizovaná voda ze zařízení Direct Q od firmy Milipore, vodivost 18,2 MΩ.cm

### 3.2 Přístroje a pomůcky

- laboratorní váhy Kern ABJ
- pH-metr Inolab pH 720, WTW Series
- fluoridová ISE, typ 09-37, Monokrystaly, ČR
- referentní elektroda argentschloridová, typ RAE 113, Monokrystaly, ČR
- pH-elektroda SenTix 41, WTW
- mikrovlnný mineralizátor UniClever II, Plazmatronika, Polsko

### 3.3 Pracovní postup

#### 3.3.1 Stanovení fluoridů v nehtech

##### 3.3.1.1 Příprava vzorků a kalibračních roztoků

###### *Vzorky nehtů*

Pro experiment byly shromažďovány nehty z rukou, a to ve formě nehtových ústřížků. Byly uchovávány v čistých papírových obálkách a poté použity k analýze. Ústřížky byly získávány od dospělých jedinců i dětí.

###### *Mineralizace*

Nehtové ústřížky byly nejprve zbaveny nečistot ponecháním v ultrazvukové lázni po dobu 10 minut. Po vyjmutí z lázně byly osušeny buničitou vatou a zváženy. Nehtové ústřížky byly navažovány do teflonových mineralizačních kelímků v množství okolo 0,1 – 0,3 g na jednu navážku. V digestoři bylo poté do označeného kelímku se známou navážkou nehtů

přidáno 2,5 ml koncentrované kyseliny dusičné. Kelímek byl uzavřen víčkem a vložen do mikrovlnného mineralizátoru. Vzorek byl rozkládán v těchto krocích. Nejdříve 2 minuty 70 % výkonu, poté 30 s na 0 %, 2 minuty 90 %, 30 s na 0 % a konečně 10 minut na 100 % výkon. Maximální rozmezí tlaků pro rozklad bylo 42 – 45 atmosfér.

#### *Kalibrační roztoky*

Pro každé měření byla připravena sada kalibračních roztoků v koncentracích  $10^{-7}$  až  $10^{-3}$  mol/l dle potřeby. Roztoky byly připravovány postupným ředěním do 25 ml odměrných baněk za použití deionizované vody. Výchozím roztokem byl standardní roztok fluoridů o koncentraci 1 g/l. Kalibrační roztoky doplněné po rysku byly řádně označeny, utěsněny uzávěrem a promíchány.

#### *Odpařování a převedení vzorku do odměrných baněk*

Po skončení mineralizace byl teflonový kelímek se vzorkem vyjmut z přístroje a nechán stáním vychladit na laboratorní teplotu. Poté byl kelímek opatrně otevřen a jeho obsah byl kvantitativně převeden do odpařovací misky. Směs vzorku a kyseliny byla odpařena na minimální objem. Mezitím byl do mineralizátoru vložen další nachystaný vzorek a spuštěn rozklad. Odparky vzorků byly kvantitativně převedeny do 5, 10 nebo 25 ml odměrných baněk a doplněny po rysku deionizovanou vodou.

### **3.3.1.2 Stanovení fluoridů**

#### *Příprava vzorků*

Z každé odměrné baňky vzorku či standardu byly odpipetovány 4 ml do plastových nádobek určených pro následující měření. Do všech řádně označených nádobek byl ještě přidán 1 ml tlumícího roztoku TISAB a takto upravené vzorky byly připraveny k měření.

#### *Příprava elektrod a pH-metru*

Fluoridová ISE i referentní argentchloridová elektroda byly po připojení k pH-metru asi na 10 minut ponořeny do kalibračního roztoku fluoridů (včetně přídavku TISABu) o střední koncentraci. Po regeneraci obou elektrod při laboratorní teplotě byly ponořené konce elektrod opláchnuty deionizovanou vodou a osušeny buničitou vatou. Poté byly ihned měřeny připravené vzorky.

### *Měření potenciálu*

Nejdříve byla proměřena celá sada kalibračních roztoků od nejvyšší po nejnižší koncentraci. Nakonec byly změřeny vzorky o neznámé koncentraci fluoridových iontů, přičemž byly všechny hodnoty naměřených potenciálů zaznamenávány.

### *Měření pH*

Po skončení měření potenciálu se u neznámých vzorků změřilo pH. K pH-metru byla připojena pH-elektroda a nastaven modul pro měření pH. Kalibrace přístroje byla prováděna na kalibrační roztoky o pH 4,01 a 7,00. Poté byla elektroda vyjmuta z roztoku, opláchnuta, osušena a připravena k měření příslušných vzorků.

### **3.3.2 Stanovení meze detekce**

Stanovení meze detekce bylo prováděno obdobným způsobem. Pro měření byly použity dvě elektrody, jedna starší, druhá nová. Sada kalibračních roztoků byla připravena v koncentracích  $1 \cdot 10^{-5}$  –  $3 \cdot 10^{-6}$  –  $1 \cdot 10^{-6}$  –  $6 \cdot 10^{-7}$  –  $3 \cdot 10^{-7}$  –  $2 \cdot 10^{-7}$  –  $1 \cdot 10^{-7}$  –  $3 \cdot 10^{-8}$  –  $1 \cdot 10^{-8}$  mol/l a proměřena kalibrační závislost napětí na pF.

## 4 VÝSLEDKY A DISKUZE

V této části práce jsou interpretovány experimentální výsledky stanovení fluoridů v nehtech a stanovení meze detekce elektrody, včetně komentářů pro jednotlivá měření. Výsledky a vypočítané hodnoty fluoridové koncentrace v nehtech jsou posouzeny ve shrnutí.

### 4.1 Stanovení fluoridů v nehtech

Pro analýzu nehtů byla získána data z celkem pěti měření. Naměřené hodnoty a výsledky jsou uvedeny v tabulce pro každé měření zvlášť. Tabulka zahrnuje číslo vzorku, navážku nehtových ústřížků a objem baňky, do které byl vzorek po mineralizaci, resp. po odpaření převeden. Z experimentálních dat jsou uvedeny naměřené hodnoty napětí a pH a dále hodnota pF získaná z kalibračního grafu. Poslední sloupec obsahuje vypočítanou hodnotu koncentrace fluoridových iontů v miligramech fluoridů na kilogram nehtů, a to pouze u vzorků, kdy hodnoty pF byly vyšší než mez detekce elektrody.

Hodnoty pro sestrojení kalibrační křivky byly zpracovány v programu QC Expert 3.2 Trilobyte s.r.o., ČR, přičemž data z naměřených hodnot napětí pro jejich sestrojení jsou uvedeny v Příloze č. 1 a kalibrační graf pro měření č. 5 je zobrazen v Příloze č. 2.

Tabulka III. Měření č. 1

Vzorek č.	Navážka [g]	Objem baňky [ml]	pH	E [mV]	pF	F [mg/kg]
1	0,1198	25	< 1	470,7	-	-
2	0,1227	10	< 1	458,0	-	-
3	0,1194	10	5,17	362,0	6,23	4,67

Vzorky č. 1 a 2 nebyly po mineralizaci podrobeny odpařování a jejich pH bylo nižší než 1. Hodnoty napětí byly příliš vysoké a nebylo možné je dále zpracovat.

Vzorek č. 3 již odpařen byl, čemuž odpovídalo i vyšší pH v hodnotě 5,17. Tato hodnota byla uspokojivá a pomocí kalibrační křivky bylo vyhodnoceno pF. Fluoridová koncentrace vzorku nehtů činila 4,67 mg/kg.



**Tabulka V. Měření č. 2**

Vzorek č.	Navážka [g]	Objem baňky [ml]	pH	E [mV]	pF	F [mg/kg]
1	0,2015	10	5,06	335,6	6,42	-

V měření byla záměrně zvýšena navážka vzorku. Bylo zjišťováno, zda hodnota pF bude nižší a nedosáhne pod mez detekce elektrody. I přes vyšší navážku však pF bylo vysoké.

**Tabulka VI. Měření č. 3**

Vzorek č.	Navážka [g]	Objem baňky [ml]	pH	E [mV]	pF	F [mg/kg]
1	0,1301	10	5,56	349,9	6,61	-
2	0,1358	5	5,53	343,7	5,93	4,11
3	0,1240	5	5,54	350,3	6,74	-

Pro dosažení nižší hodnoty pF byly vzorky č. 2 a 3 po odpaření převedeny do odměrných baněk o ještě menším objemu (5 ml).

Ve srovnání se vzorkem č. 1, byla u vzorku č. 2 hodnota pF skutečně nižší, přičemž oba vzorky měly podobnou navážku. Vzorek č. 3, ač v objemu 5 ml, měl hodnotu pF opět vysokou, i přesto, že v porovnání s navážkou vzorku č. 2 byla nižší pouze o 0,0118 g.

**Tabulka VII. Měření č. 4**

Vzorek č.	Navážka [g]	Objem baňky [ml]	pH	E [mV]	pF	F [mg/kg]
1	0,1803	5	5,44	333,3	6,38	-
2	0,3157	25	5,64	334,7	6,77	-

Vzorek č. 1 byl převeden do baňky o objemu 5 ml a hodnota pF již ležela těsně pod mezí detekce.

Vzorek č. 2 se po odpaření nepodařilo převést do 5 ml odměrné baňky. Byl tedy převeden do baňky o objemu 25 ml, čímž se hodnota pF přiblížila k vysokým hodnotám a opět se pohybovala pod detekčním limitem.

Tabulka VIII. Měření č. 5

Vzorek č.	Navážka [g]	Objem baňky [ml]	pH	E [mV]	pF	F <sup>-</sup> [mg/kg]
1	0,1227	5	4,55	354,5	6,38	-
2	0,1439	5	3,52	357,4	6,86	-

Poslední měření bylo zaměřeno na převedení vzorků do 5 ml odměrných baněk. Oba vzorky však vykazovaly pH pod hodnotu 5. Nižší pH bylo nejspíše způsobeno při odpařování, kdy vzorky nebyly odpařeny zcela do sucha, ale do objemu menší kapky.

Vzorek č. 1 měl hodnotu pF stanovenou na 6,38, což bylo opět blízko detekčnímu limitu.

#### 4.1.1 Shrnutí

Rozdílnost hodnot fluoridové koncentrace ve vzorcích o podobné navážce je pravděpodobně způsobena použitím směsi nehtů. Jednalo se o vzorky nehtů žen, mužů i dětí, a to v různém věku a z různých domácností, kde koncentrace fluoridů v pitné vodě byla odlišná. Všechny tyto faktory výrazně ovlivňují koncentraci fluoridů v nehtech a mohli být příčinou těchto rozdílů.

Potíží při stanovení bylo získat hodnoty pF vzorků nad mez detekce ISE. Pouze dva vzorky vykazovaly hodnotu vyšší než detekční limit elektrody. U jednoho z nich byla hodnota pF stanovena na 6,23, s navážkou vzorku 0,1194 g, pH 5,17 a v objemu baňky 10 ml. Druhý vzorek měl hodnotu pF 5,93, navážku 0,1358 g, pH 5,53 a byl v objemu baňky 5 ml. Shodné výsledky pF v hodnotě 6,38 u dalších dvou vzorků, se mezi detekci velmi blížily.

Koncentrace fluoridů, u vzorků s pF vyšším než mez detekce, byla u vzorku s pF 6,23 vypočítána na 4,67 mg/kg a u vzorku s pF 5,93 na 4,11 mg/kg. Vypočítané hodnoty řádově odpovídají koncentracím uvedených v literatuře.<sup>25</sup>

## 4.2 Stanovení meze detekce

Mez detekce byla stanovena pro dvě fluoridové iontově-selektivní elektrody. První z nich byla starší a déle používaná a druhá elektroda byla zcela nová. Starší elektroda byla používána na měření vzorků nehtů po měření č. 3, pak byla stanovena mez detekce pro tyto

dvě elektrody s cílem zjistit, zda by nová elektroda byla pro stanovení vhodnější. Otázkou tedy bylo, jak velký vliv na detekční limit bude mít stáří elektrody a která z elektrod bude mít nižší mez detekce.

Výsledky stanovení byly velmi podobné. Mez detekce starší elektrody byla stanovena na  $4,9 \cdot 10^{-7}$  mol/l a mez detekce nové elektrody na  $4,8 \cdot 10^{-7}$  mol/l. Lze konstatovat, že stáří první elektrody nemělo na mez detekce výrazný vliv a obě elektrody vykazovaly téměř shodné výsledky. Analýza vzorků nehtů tedy dále pokračovala s používáním starší elektrody.

Naměřené hodnoty pro sestrojení kalibrační křivky byly zpracovány v programu Microsoft Office Excel 2007 a jsou uvedeny v Příloze č. 3. Kalibrační závislosti pro stanovení meze detekce jsou spolu s rovnicemi lineární regrese přímek rovněž uvedeny v Příloze č. 3. Pro tvorbu křivek byly použity pouze hodnoty napětí v úseku vysokých a velmi nízkých koncentrací.

## 5 ZÁVĚR

Hlavní náplní bakalářské práce bylo optimalizovat podmínky pro vyvíjenou metodu stanovení fluoridů v nehtech. Metoda spočívá v chemickém rozkladu nehtů kyselinou dusičnou v mikrovlnném mineralizátoru a následném potenciometrickém stanovení fluoridů.

Z výsledků experimentu lze usuzovat následující. Po rozkladu musí být vzorek odpařen na co nejmenší objem, čímž je omezen vznik kyseliny fluorovodíkové rušící stanovení. Pro dosažení optimálních hodnot pF vzorků, takových, aby ležely nad mezí detekce elektrody, je třeba vzít v úvahu charakter vzorku, resp. jeho dárce a tomu přizpůsobit vhodnou navážku a použít odměrné baňky o nízkém objemu. Za těchto podmínek by mohla metoda splnit svůj účel.

Za předpokladu, stanovení přibližně do 20 vzorků, je vyvíjená metoda rozkladu v porovnání s metodou HMDS relativně rychlá. Příprava jednoho vzorku včetně ultrazvukového čištění, navážení, rozkladu, odpařování a převedení do odměrné baňky trvá asi 70 minut. Příprava kalibračních roztoků se dá provést během rozkladu a samotné měření roztoků a vzorku se vtěsná do 45 minut.

Metodou HMDS difúze je vzorek podroben několikahodinovému procesu a metoda je tedy časově náročnější. Pokud bychom však vzali v úvahu měření několika desítek vzorků, za předpokladu rychlosti přípravy necelých 5 minut/1 vzorek, 8hodinové difúze, a při použití jedné ISE, je HMDS metoda výhodnější. Pro menší počet vzorků je proces zdoluhavý díky difúzi, pro větší počet je výhodou rychlá příprava vzorků.

V budoucí analýze alternativních biomarkerů fluoridové expozice by zajímavější roli mohly hrát vlasy. Oproti nehtům se totiž dají získat v mnohem vyšších navážkách. Otázkou je, zda obsahují dostatečné množství fluoridů.

## 6 SEZNAM LITERATURY

- [1] Bagramian R. A., Garcia-Godoy F., Volpe A. R.: *Am J Dent.* **22**, 3 (2009).
- [2] Nevorál J., Janda J., Frühauf P., Broukal Z., Merglová V., Handzel J., Cabrnichová H.: *Fluoridy v prevenci zubního kazu u dětí.* 2010.
- [3] Cotton F. A., Wilkinson G.: *Anorganická chemie.* Academia, Praha 1973.
- [4] Sullivánová K.: *Vitamíny a minerály v kostce.* Slovart 1997.
- [5] Kameníček J., Šindelář Z., Pastorek R., Kašpárek F.: *Anorganická chemie.* UP v Olomouci, Olomouc 2006.
- [6] Greenwood N. N., Earnshaw A.: *Chemie prvků, Svazek II.,* Informatorium, Praha 1993.
- [7] Provazník K.: *Manuál prevence v lékařské praxi: Zdravotní kritéria pro fluoridy a fluorózu.* Fortuna, Praha 1998.
- [8] Zákon č. 258/2000 Sb. o ochraně veřejného zdraví, vyhláška č.252/2004 Sb., příloha č. 1: *Mikrobiologické, biologické, fyzikální, chemické a organoleptické ukazatele pitné vody a jejich hygienické limity.*
- [9] Kilian J.: *Prevence ve stomatologii.* UK Karolinum, Praha 1999.
- [10] Kvasničková A.: *Minerální látky a stopové prvky.* ÚZPI, Praha 1998.
- [11] Michálková J.: *Potraviny jako zdroj fluoru ve výživě.* Bakalářská práce, Univerzita Tomáši Bati ve Zlíně, Zlín 2009.
- [12] Dancingerová H.: *Fluor nejen pro zuby dobrý.* Bakalářská práce, Masarykova univerzita, Brno 2011.
- [13] WHO Regional Office for Europe: *Air Quality Guidelines, Chapter 6.5, Fluorides.* Dánsko 2000.
- [14] Cornelis R., Caruso J., Crews H., Heumann K.: *Handbook of Elemental Speciation II – Species in the Environment, Food, Medicine and Occupational Health,* kap. 2.24, John Willey and Sons, 2005.
- [15] Brázda O.: *Fluoridy a zubní kaz.* SPN, Praha 1989.
- [16] Ozsvath D. L.: *Rev Environ Sci Biotechnol.* **8**, 59–79 (2009).
- [17] Whitford G. M., Thomas J. E., Adair S. M.: *Arch Oral Biol.* **44**, 785-788 (1999).

- [18] Viswanathan G., Jaswanth A., Gopalakrishnan S., Siva ilango S., Aditya G.: *Sci Total Environ.* **407**, 5298-5307 (2009).
- [19] Pessan J. P., Pin M. L. G., Martinhon C. C. R., da Silva S. M. B., Granjeiro J. M., Buzalaf M. A. R.: *Caries Res.* **39**, 363-370 (2005).
- [20] Whitford G. M.: *The Metabolism and Toxicity of Fluoride*. Švýcarsko 1996.
- [21] Pessan J. P., Buzalaf M. A. R.: *Monogr Oral Sci.* **22**, 52 (2011).
- [22] <http://www.news-medical.net/health/Biomarker-What-is-a-Biomarker.aspx> (cit. 12. 4. 2012).
- [23] Richter H., Kierdorf U., Richards A., Melcher F., Kierdorf H.: *Arch Oral Biol.* **56**, 785-792 (2011).
- [24] Whitford G. M., Sampaio F. C., Arneberg P., von der Fehr F. R.: *Caries Res.* **33**, 462-467 (1999).
- [25] Fukushima R., Rigolizzo D. S., Maia L. P., Sampaio F. C., Lauris J. R. P., Buzalaf M. A. R.: *Caries Res.* **43**, 147-154 (2009).
- [26] Buzalaf M. A. R., Pessan J. P., Alves K. M. R. P.: *Caries Res.* **40**, 231 (2006).
- [27] Venkateswarlu P.: *Adv Dent Res.* **8**, 80 (1994).
- [28] Krakovská E., Kuss H. M.: *Rozklady v analytickej chémii*. Viena, Košice 2001.
- [29] [http://www.vscht.cz/anl/lach1/2\\_Pot-F.pdf](http://www.vscht.cz/anl/lach1/2_Pot-F.pdf) (cit. 3. 3. 2012).
- [30] [http://cheminfo.chemi.muni.cz/ktfch/trnkova/elanalmet/navody/uloha%201/1-ISE\\_navod.pdf](http://cheminfo.chemi.muni.cz/ktfch/trnkova/elanalmet/navody/uloha%201/1-ISE_navod.pdf) (cit. 11. 3. 2012).
- [31] [http://www.vscht.cz/anl/lach1/3\\_Pot-pH.pdf](http://www.vscht.cz/anl/lach1/3_Pot-pH.pdf) (cit. 21. 3. 2012).
- [32] Barek J., Opekar F., Štulík K.: *Elektroanalytická chemie*. UK, Praha 2005.
- [33] <http://www.kch.zcu.cz/cz/di/sks/03-POTENCIOMETRIE.pdf> (cit. 4. 4. 2012).
- [34] [http://www.pro-base.eu/files/b\\_fluoride\\_t\\_en\\_tg.pdf](http://www.pro-base.eu/files/b_fluoride_t_en_tg.pdf) (cit. 19. 4. 2012).

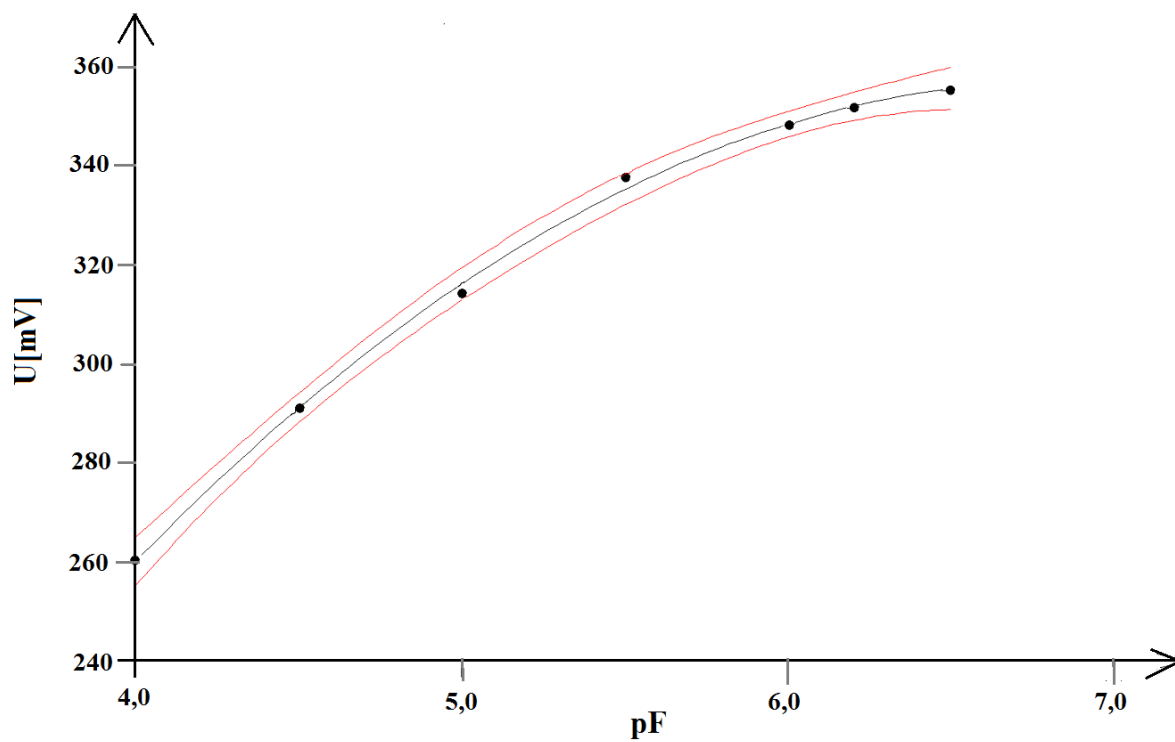
## 7 PŘÍLOHY

### PŘÍLOHA Č. 1: Naměřené hodnoty napětí pro sestavení kalibračních křivek

Pozn. Horní indexy označují číslo měření.

pF	E [mV] <sup>1</sup>	E [mV] <sup>2</sup>	E [mV] <sup>3</sup>	E [mV] <sup>4</sup>	E [mV] <sup>5</sup>
3	209,2	-	-	-	-
3,5	241,7	-	-	-	-
4	266,5	233,6	276,7	270,5	260,5
4,2	279,1	-	-	-	-
4,5	302,2	265,7	300,1	298,6	290,8
4,7	304,7	-	-	-	-
5	319,6	286,2	321,8	308,8	314,5
5,5	-	313,9	334,9	320,8	337,5
6	354,9	325,7	343,3	326,6	348,0
6,2	-	331,7	346,8	332,4	351,8
6,5	-	337,9	349,4	335,8	355,6
6,7	-	339,9	-	-	-
7	-	340,9	-	-	-

**PŘÍLOHA Č. 2: Kalibrační graf pro stanovení fluoridů k měření č. 5**



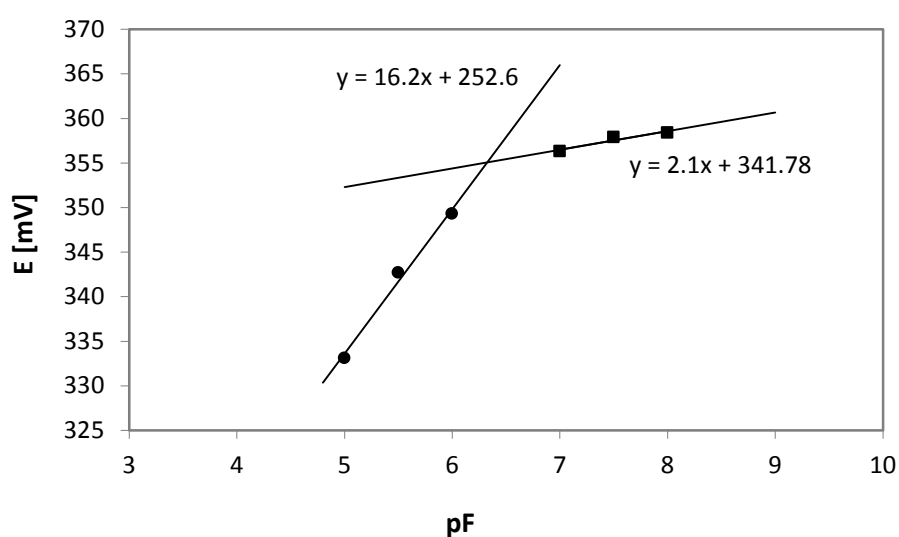
**Obr. 3.** Kalibrační graf (měření č. 5)



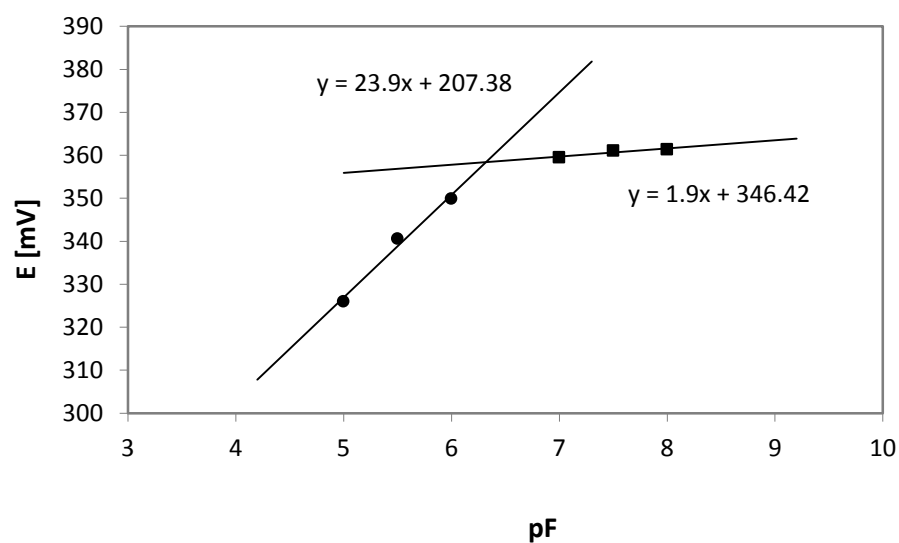
### PŘÍLOHA Č. 3: Naměřené hodnoty a kalibrační grafy pro stanovení meze detekce

Pozn. Hodnoty týkající se nové elektrody jsou označeny hvězdičkou.

pF	5	5,5	6	6,2	6,5	6,7	7	7,5	8
E [mV]	333,1	342,7	349,3	352,8	353,2	354,6	356,3	357,9	358,4
E [mV]*	326,0	340,6	349,9	352,9	356,4	358,0	359,5	361,1	361,4



Obr. 4. Kalibrační graf pro stanovení meze detekce



Obr. 5. Kalibrační graf pro stanovení meze detekce \*