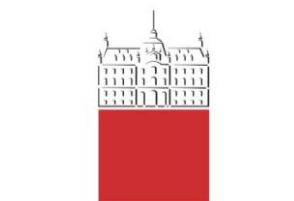


Univerza v Ljubljani

Fakulteta *za farmacijo*



ANTONELA LAH

**DOLOČANJE FLUORIDOV S PLINSKO KROMATOGRFIJO S
TEHNIKO NADPROSTORA V NOHTIH OTROK KOT DOKAZ
OBREMENTITVE S FLUORIDI**

**DETERMINATION OF FLUORIDE IN FINGERNAIL CLIPPINGS
BY HEADSPACE GAS CHROMATOGRAPHY AS AN INDICATOR
OF EXPOSURE OF CHILDREN TO FLUORINE COMPOUNDS**

MAGISTRSKA NALOGA

Magistrski študij laboratorijska biomedicina

Ljubljana, 2012

Magistrsko nalogo sem opravljala na Medicinski fakulteti, Inštitut za sodno medicino (toksikološki laboratorij), pod mentorstvom prof. dr. Marije Sollner Dolenc in somentorstvom asist. dr. Majde Zorec Karlovšek.

Zahvala

Zahvaljujem se mentorici prof. dr. Mariji Sollner Dolenc in somentorici asist. dr. Majdi Zorec Karlovšek za vodenje, strokovno pomoč, nasvete in spodbudo. Zahvaljujem se tudi svojim domačim za podporo.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko delo samostojno izdelala pod mentorstvom prof. dr. Marije Sollner Dolenc in somentorstvom asist. dr. Majde Zorec Karlovšek.

Antonelah Lah

.....

Predsednik komisije: izr. prof. dr. Darko Černe

Mentorica: prof. dr. Marija Sollner Dolenc

Somentorica: asist. dr. Majda Zorec Karlovšek

Član komisije: izr. prof. dr. Iztok Grabnar

Ljubljana, 2012

KAZALO

SEZNAM OKRAJŠAV.....	5
KAZALO	3
KAZALO SLIK.....	5
KAZALO PREGLEDNIC.....	7
POVZETEK.....	8
1 UVOD.....	12
1.1 VIRI FLUORIDOV V VSAKDANJEM ŽIVLJENJU.....	12
1.2 METABOLIZEM FLUORIDOV V TELESU	12
1.2.1 ABSORPCIJA FLUORIDOV.....	12
1.2.2 PORAZDELITEV FLUORIDOV	13
1.2.3 IZLOČANJE FLUORIDOV.....	14
1.3 TOKSIČNOST FLUORIDOV	15
1.3.1 AKUTNA TOKSIČNOST.....	15
1.3.2 KRONIČNA TOKSIČNOST.....	15
1.3.3 ZAKONSKA DOLOČILA ZA DOPUSTNE VREDNOSTI VNOSA FLUORIDOV	17
1.4 NORMALNE VREDNOSTI FLUORIDOV V KRVI IN URINU	17
1.5 DOLOČANJE FLUORIDOV	18
1.5.1 BIOLOŠKI MATERIAL ZA DOLOČANJE FLUORIDOV.....	18
1.5.2 IZOLACIJSKI POSTOPKI FLUORIDOV IZ BIOLOŠKEGA MATERIALA.....	18
1.5.3 ANALIZNE METODE DOLOČANJA FLUORIDOV.....	21
1.6 VREDNOTENJE (VALIDACIJA) ANALIZNE METODE.....	27
1.6.1 SELEKTIVNOST	27
1.6.2 LINEARNOST.....	27
1.6.3 TOČNOST	28
1.6.4 NATANČNOST.....	28
1.6.5 MEJA ZAZNAVNOSTI (LOD).....	29
1.6.6 MEJA DOLOČLJIVOSTI (LOQ).....	29
1.6.7 MERILNO OBMOČJE	29
2 NAMEN DELA.....	30
3 MATERIALI.....	31

3.1	REAGENTI.....	31
3.2	BIOLOŠKI VZORCI	31
3.3	PRIBOR IN OPREMA.....	32
4	METODE	33
4.1	PRIPRAVA OSNOVNIH RAZTOPIN.....	33
4.1.1	<i>DELOVNI REAGENT.....</i>	33
4.1.2	<i>STANDARDNE RAZTOPINE FLUORIDA</i>	33
4.1.3	<i>FLUORIDNA RAZTOPINA ZA PREVERJANJE TOČNOSTI IN NATANČNOSTI METODE (146,5 ng/mL).....</i>	33
4.2	PREDPRIPRAVA BIOLOŠKIH VZORCEV (NOHTOV).....	34
4.3	PRIPRAVA STANDARDNIH RAZTOPIN IN BIOLOŠKIH VZORCEV (NOHTI) ZA HS- GC ANALIZO	34
4.4	PLINSKO KROMATOGRAFSKA METODA	34
4.4.1	<i>POGOJI DELA NA VZORČEVALNIKU</i>	34
4.4.2	<i>POGOJI DELA NA PLINSKEM KROMATOGRAFU</i>	35
4.4.3	<i>TEMPERATURNI PROGRAM.....</i>	35
4.5	STATISTIČNA OBDELAVA REZULTATOV	35
5	REZULTATI.....	36
5.1	VPLIV STEKLA NA REZULTETE ANALIZE.....	36
5.2	VREDNOTENJE METODE.....	37
5.2.1	<i>SELEKTIVNOST</i>	38
5.2.2	<i>MEJA ZAZNAVNOSTI (LOD) IN MEJA DOLOČLJIVOSTI (LOQ).....</i>	39
5.2.3	<i>LINEARNOST.....</i>	39
5.2.4	<i>NATANČNOST IN TOČNOST.....</i>	42
5.3	REZULTATI BIOLOŠKIH VZORCEV	45
5.3.1	<i>PORAZDELITEV KONCENTRACIJE FLUORIDOV V NOHTIH.....</i>	47
5.3.2	<i>UGOTAVLJANJE RAZLIKE MED VSEBNOSTJO FLUORIDOV V NOHTIH PRVEGA IN DRUGEGA STRIŽENJA.....</i>	49
5.3.3	<i>UGOTAVLJANJE VPLIVA ZOBNE PASTE Z RAZLIČNO VSEBNOSTJO FLUORIDOV NA KONCENTRACIJO FLUORIDOV V NOHTIH</i>	49
6	RAZPRAVA.....	51
7	UGOTOVITVE.....	57
8	REFERENCE	58

SEZNAM OKRAJŠAV

Ag/AgCl	srebro/srebrov klorid
CaF ₂	kalcijev fluorid
F ⁻	fluoridi
FID	(ang. flame ionization detector) plamensko ionizirajoči detektor
GC	(ang. gas chromatography) plinska kromatografija
HClO ₄	klorova (VII) kislina ali perklorova kislina
H ₂ SO ₄	žveplova (VI) kislina
H ₂ SiF ₆	fluoro silicijeva kislina
HF	fluorovodikova kislina
HMDS	heksametildisiloksan
HS-GC	(ang. headspace gas chromatography) plinska kromatografija s tehniko nadprostora
ISE	(ang. ion selective electrode) ion selektivna elektroda
LaF ₃	lantanov fluorid
LOD	(ang. limit of detection) meja zaznavnosti
LOQ	(ang. limit of quantification) meja določljivosti
NaF	natrijev fluorid
Na ₃ AlF ₆	natrijev aluminijev fluorid
NaOH	natrijev hidroksid
OH ⁻	hidroksilni ion
ppm	(ang. parts per milion) število masnih ali volumskih delov neke snovi v milijonu delov raztopine ali zmesi (npr. mg/L, ng/mg)
PTH	paratiroidni hormon
TISAB	(ang. total ionic strength adjustment buffer) pufer za uravnavanje ionske moči
TMFS	trimetilfluorosilan
TMS	trimetilsilanol

KAZALO SLIK

SLIKA 1: PRIMER DENTALNE FLUROZE.....	16
SLIKA 2: PRIMER SKELETNE FLUROZE	16
SLIKA 3: SHEMA FLUORIDNE ISE S KRISTALNO MEMBRANO IZ LAF3.....	22
SLIKA 4: SHEMA Prikaz HEADSPACE PLINSKEGA KROMATOGRAFA	24
SLIKA 5: ČASOVNI VPLIV STEKLENIH VIAL NA KROMATOGRAFSKO ANALIZO FLUORIDNIH VZORCEV	36
SLIKA 6: VPLIV SVEŽE PRIPRAVLJENIH VZORCEV NA KROMATOGRAFSKO ANALIZO.....	37
SLIKA 7: KROMATOGRAM STANDARDNE FLUORIDNE RAZTOPINE	39
SLIKA 9: PRIKAZ ODVISNOSTI ODZIVA OD KONCENTRACIJE FLUORIDOV (1.DAN).....	41
SLIKA 10: PRIKAZ ODVISNOSTI ODZIVA OD KONCENTRACIJE FLUORIDOV (2.DAN).....	41
SLIKA 11: PRIKAZ ODVISNOSTI ODZIVA OD KONCENTRACIJE FLUORIDOV (3.DAN).....	42
SLIKA 12: ŠTEVILČNI PRIKAZ VZORCEV IN REZULTATOV HS-GC ANALIZE	45
SLIKA 13: PORAZDELITEV KONCENTRACIJE FLUORIDOV PRED UPORABO ZOBNE PASTE	48
SLIKA 14: PORAZDELITEV KONCENTRACIJE FLUORIDOV PO UPORABI ZOBNE PASTE.....	48

KAZALO PREGLEDNIC

PREGLEDNICA I: SEZNAM UPORABLJENIH REAGENTOV	31
PREGLEDNICA II: PREGLED UPORABLJENEGA PRIBORA IN OPREME	32
PREGLEDNICA III: ENAČBE LINEARNE REGRESIJE IN R^2 ZA TRI DNI PREIZKUSA LINEARNOSTI METODE	40
PREGLEDNICA IV: PRIKAZ TOČNOSTI IN NATANČNOSTI ZA 19 NG/ML FLUORIDNO RAZTOPINO	43
PREGLEDNICA V: PRIKAZ TOČNOSTI IN NATANČNOSTI ZA 146,5 NG/ML FLUORIDNO RAZTOPINO	44
<i>PREGLEDNICA VI: PRIKAZ TOČNOSTI IN NATANČNOSTI ZA 285 NG/ML FLUORIDNO RAZTOPINO</i>	44
PREGLEDNICA VII: STATISTIČNE VREDNOSTI ANALIZE NOHTOV PRVEGA IN DRUGEGA STRIŽENJA TER ZOBNE PASTE S 500 PPM F^- IN 1000 PPM F^-	47
PREGLEDNICA VIII: TESTIRANJE PORAZDELITVE REZULTATOV VSEBNOSTI FLUORIDA V NOHTIH	47
PREGLEDNICA IX: WILCOXONOV TEST PREDZNAČENIH RANGOV.....	49
PREGLEDNICA X: WILCOXONOV TEST PREDZNAČENIH RANGOV (SKLEPNA STATISTIKA)	49
PREGLEDNICA XI: WILCOXONOV TEST VSOTE RANGOV, ZA UGOTAVLJANJE RAZLIKE MED ZOBNIMA PASTAMA	50
PREGLEDNICA XII: SKLEPNA STATISTIKA WILCOXONOVEGA TESTA	50

POVZETEK

Po zaužitju se 80 – 90 % fluoridov (F^-) absorbira iz gastrointestinalnega trakta. Delež absorbiranega fluorida, ki se ne izloči preko ledvic, se skoraj v celoti kopiči v kalcificiranih tkivih (zobeh in kosteh), kjer se vključuje v kristalno strukturo kalcijevega hidroksiapatita ($Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$). Pri tem procesu pride do zamenjave hidroksilnega iona s fluoridom in nastali kalcijev fluoroapatit ($Ca_{10}(PO_4)_6F_2$) ojača kristalno strukturo apatita. Najbolj pomembna vloga fluorida je antikariogeno delovanje. Večje antikariogeno delovanje dosežemo z lokalnim vnosom fluoridov, saj tako v večji meri povečamo njihovo koncentracijo v slini. Fluorirani pripravki, ki so namenjeni lokalnemu delovanju, so predvsem geli, premazi, ustne vode in zobne paste. Količina sistemsko vnesenega fluorida je običajno nizka in tako dobljena zaščita proti kariesu je majhna. Vendar prevelik sistemski vnos fluoridov v času razvoja zob lahko povzroči motnjo mineralizacije sklenine ali dentalno fluorozo v hujših primerih pa skeletno fluorozo. Tveganje za nastanek fluoroze in njena izrazitost sta odvisna od količine zaužitih fluoridov predvsem s pitno vodo, živili, pri otrocih pa še z zaužitjem fluorirane zobne paste pri umivanju zob. Kronično izpostavljenost fluoridom lahko določamo z merjenjem koncentracije fluoridov v nohtih.

Zaradi potreb Stomatološke klinike v Ljubljani, Centra za otroško in preventivno zobozdravstvo, smo razvili in ovrednotili metodo za določanje koncentracije fluoridov v nohtih otrok. Vzorce otroških nohtov so zbrali na Stomatološki kliniki v Ljubljani. Otroci so bili povabljeni na dva zobozdravniška pregleda, kjer so jim postrigli tudi nohte na rokah. Ob prvem pregledu so bili otroci stari med 6 in 8 mesecev in še niso uporabljali fluorirane zobne paste. Po prvem striženju je ena skupina otrok dobila v uporabo zobno pasto z vsebnostjo fluorida 500 ppm, druga pa zobno pasto s 1000 ppm fluorida. Po 6-10 mesečni uporabi fluorirane zobne paste so istim otrokom ponovno postrigli nohte.

V nalogi smo želeli z merjenjem fluoridov v nohtih oceniti izpostavljenost majhnih otrok fluoridom, oziroma koliko k tej izpostavljenosti prispeva redna uporaba fluorirane zobne paste. Prav tako smo želeli ugotoviti, če se uporaba zobnih past, ki vsebujejo različne koncentracije fluoridov (500 ppm in 1000 ppm) odraža v razliki koncentracij fluoridov v nohtih. Razvili, optimizirali in validirali smo plinsko kromatografsko analizno metodo za

določanje fluoridov v nohtih v koncentracijskem območju med 9,5 in 380 ng/mL. Fluoride iz nohtov smo izolirali z difuzijskim postopkom z uporabo heksametildisiloksana (HMDS) v kislem mediju kot trimetilfluorsilan (TMFS), katerega smo določali s plinsko kromatografijo s plamensko ionizacijskim detektorjem. Ker je TMFS zelo hlapna spojina (vrelišče 16 °C) smo difuzijski postopek in postopek merjenja združili z uporabo plinske kromatografije s tehniko nadprostora. Kot notranji standard smo uporabili metiletil keton. Določeni optimalni čas izolacije in derivatizacije fluorida je bil 15 minut pri 55 °C.

Povprečna vsebnost fluorida v nohtih, dobljenih ob prvem striženju (pred začetkom uporabe fluorirane zobne paste) je bila 0,60 ng/mg in se je gibala v koncentracijskem območju med 0,03 ng/mg in 3,13 ng/mg. Povprečna vsebnost fluorida v vzorcih, dobljenih ob drugem pregledu (po uporabi fluorirane zobne paste) je bila 0,99 ng/mg in se je gibala v območju med 0,04 ng/mg in 5,14 ng/mg. Vsebnost fluorida v nohtih je bila pri vzorcih dobljenih ob drugem obisku značilno večja od vsebnosti fluorida v vzorcih odvzetih pri prvem obisku ($p < 0,001$).

Pri otrocih, ki so uporabljali zobno pasto s 500 ppm, je bila vsebnost fluorida v nohtih $0,91 \pm 0,79$ ng/mg. Pri otrocih, ki so uporabljali zobno pasto z vsebnostjo fluorida 1000 ppm, je bila povprečna vsebnost fluoridov $1,05 \pm 0,88$ ng/mg. Povprečna vsebnost fluoridov v vzorcih nohtov otrok, ki so uporabljali zobno pasto s 1000 ppm fluoridov je bila večja kot pri otrocih, ki so uporabljali zobno pasto s 500 ppm fluoridov, vendar razlika ni bila statistično značilna ($p = 0,140$).

ABSTRACT

After ingestion 80 – 90 % of fluoride (F⁻) is absorbed from the gastrointestinal tract. The portion of absorbed fluoride, which is not excreted via kidneys, is almost entirely accumulated in calcinated tissues (teeth and bones) where is included in the crystal structure of calcium hydroxyapatite (Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂). During this process hydroxyl ion is exchanged with fluoride and formed calcium fluoroapatite (Ca₁₀(PO₄)₆F₂) strengthening the crystal structure of apatite. The most important role of fluoride is anticariogenic action. Greater anticariogenic action is achieved by local application of fluoride, causing higher concentration of fluoride in saliva. Fluorinated preparations, used for local action, are gels, coats, mouth wash and tooth paste. Uptake of fluoride is in general low and the anticariogenic action small. But to high, excessive exposure and uptake of fluoride during tooth development can lead to a disturbance in mineralization of enamel called dental fluorosis and in worst cases it can result also in skeletal fluorosis. The risk for development of fluorosis and its expressiveness are dependent on amount of fluoride ingested mainly with drinking water and food and in case of children with ingestion of fluorinated tooth paste when washing teeth. Chronic exposure to fluoride can be determined with measurement of fluoride concentration in nails.

In accordance with the requirements of Division of Stomatology in Ljubljana, Centre for Children's and Preventive health care, we developed and evaluated a method for determination of fluoride concentration in nails of children. Samples of children finger nail clippings were collected at Division of Stomatology in Ljubljana during two dental examinations. At the first examination the children were between 6 and 8 months old and they did not used fluorinated tooth paste before. After first cutting one group of children received a tooth paste containing 500 ppm and the other group a tooth paste containing 1000 ppm of fluoride. After 6-10 months of use of fluorinated tooth paste nail clippings were collected again.

Our aim was to (1) estimate the exposure of young children to fluoride by measuring fluoride content in nails and (2) to evaluate the contribution of regular use of fluorinated tooth paste to the exposure. We also wanted to determine if the use of tooth paste with

different concentration of fluoride (500 and 1000 ppm) is also reflected in different concentration of fluoride in investigated nails. We developed, optimised and validated a gas chromatographic analytical method for determination of fluoride in nails in concentration range between 9.5 and 380 ng/mL. Fluoride was isolated from nails by a diffusion procedure using hexamethyldisiloxane (HMDS) in acidic medium as trimethylfluorosilane (TMFS), which was determined by gas chromatography with ionization detector. Because TMFS is a highly volatile compound we combined the diffusion process and measurement using gas chromatography by a headspace technique. Methyl ethyl ketone was used as internal standard. Determined optimal time for isolation and derivatization of fluoride was 15 minutes at 55 °C.

Average content of fluoride in nails, obtained during the first cutting (before use of fluorinated tooth paste) was 0.60 ng/mg with a concentration range between 0.03 and 3.13 ng/mg. Average content of fluoride in samples obtained during the second examination (after the use of fluorinated tooth paste) was 0.99 ng/mg with a concentration range between 0.04 and 5.14 ng/mg. The content of fluoride obtained in nails sampled during second visit was evidently higher than the content of fluoride in samples collected at the first visit ($p < 0,001$). Nails collected from children who used the tooth paste with 500 ppm of fluoride contained 0.91 ± 0.79 ng/mg of fluoride. Nails sampled of children who used the tooth paste with 1000 ppm of fluoride contained 1.05 ± 0.88 ng/mg of fluoride. The average content of fluoride in nail samples of children who used the tooth paste with 1000 ppm of fluoride was higher than in nail samples of children that used the tooth paste with 500 ppm of fluoride, but the difference was not statistically significant ($p = 0.140$).

1 UVOD

Fluor je element iz skupine halogenov, ki je kemijsko zelo reaktiven, zato ga v naravi ne najdemo v čisti obliki temveč v obliki spojin, ki so lahko anorganske ali organske. V vsakdanjem življenju smo izpostavljeni predvsem anorganskim oblikam fluoridov, kot so NaF (v majhnih količinah za fluoriranje vode, v dentalnih preparatih), v povezavi z delovnim mestom pa lahko tudi s HF (za jedkanje stekla in pridobivanje drugih fluorovih spojin), CaF₂ - fluorit (v metalurgiji kot talilo), Na₃AlF₆ – kriolit (pri pridobivanju aluminija) (1,2).

1.1 VIRI FLUORIDOV V VSAKDANJEM ŽIVLJENJU

Glavni viri vnosa fluoridov v telo so hrana, pitna voda in druge pijače (pravi čaj) ter dentalni preparati, ki vsebujejo fluorid (zobne paste, ustne vode, fluorove tablete, amin-fluoridni želeji). Koncentracija fluoridov je v hrani običajno nižja od 0,5 ppm, z izjemo morske hrane oziroma rib, kjer je lahko koncentracija fluoridov do 30 ppm (1,2,3). Priporočljiva koncentracija fluoridov v pitni vodi je v Sloveniji do 1,5 mg/L. Po podatkih ljubljanskega vodovoda, pitna voda v Ljubljani z okolico vsebuje od 0,01 do 0,05 mg/L fluoridov (4). Ostale pijače (sadni sokovi) ne presegajo 1,5 ppm fluoridov z izjemo pravih čajev, kjer je koncentracija fluoridov lahko tudi do 7 ppm. Koncentracija fluoridov je v zobozdravstvenih preparatih veliko višja in je običajno navedena na embalaži (1,2).

1.2 METABOLIZEM FLUORIDOV V TELESU

1.2.1 ABSORPCIJA FLUORIDOV

Koncentracija fluoridov v atmosferi je nizka, zato je njihova absorpcija preko kože in dihal zanemarljiva. Fluoridi se v telo absorbirajo predvsem preko prebavil, zanemarljiv del pa preko kože in pljuč. Po zaužitju se 80 – 90 % fluoridov absorbira iz gastrointestinalnega trakta, absorpcija preko ustne sluznice je zelo nizka, približno 1 %. Neabsorbirani del se izloči z blatom (približno 10 %). Po zaužitju, koncentracija fluorida doseže maksimalno vrednost po 30 – 60 min in doseže ravnotežje približno po 3 urah. Absorpcija iz gastrointestinalnega trakta je odvisna od pH želodčne vsebine, pri kislem pH je absorpcija

hitrejša in večja. Visoka koncentracija kalcijevih ionov in drugih kationov zmanjšajo absorpcijo fluoridnih ionov zaradi nastanka netopnih kompleksov (3).

1.2.2 PORAZDELITEV FLUORIDOV

V plazmi so fluoridi predvsem v prosti obliki, ker se ne vežejo na proteine ali druge v plazmi prisotne snovi. Prav tako koncentracija fluoridov v plazmi ni homeostatsko regulirana in je odvisna od dnevnega vnosa, delovanja ledvic in nalaganja fluoridov v trdnih tkivih (zobovje in kosti). Okoli 50 % absorbiranega fluorida se porazdeli po telesu, skoraj v celoti (99 %) se kopiči v kalcificiranih tkivih: zobeh in kosteh. Preostalih 50 % absorbiranega fluorida pa se v 24 urah izloči iz telesa preko ledvic. Razmerje 50 : 50 se spremeni v obdobju rasti v korist kopičenja v trdna tkiva in v starejšem obdobju v korist izločanja preko ledvic.

1.2.2.1 Nalaganje fluoridov v kosteh

Fluoridi se močno vendar reverzibilno vežejo na kalcijev hidroksiapatit ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) in druge komponente kalcijevega fosfata v kosteh. Pri tem procesu pride do zamenjave hidroksilnega iona s fluoridom in nastali kalcijev fluoroapatit ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2$) ojača kristalno strukturo apatita.

Sproščanje fluoridov v krvni obtok je posledica remodelacije kosti. V literaturi zasledimo, da se koncentracija fluoridov v krvi zviša ob prisotnosti hormona parathormona in zniža ob sproščanju kalcitonina, torej dveh hormonov, ki vplivata na homeostatsko regulacijo kalcija (1,3).

1.2.2.2 Nalaganje fluoridov v zobeh

Fluorid, ki ga zaužijemo (sistemski vnos), se v času izraščanja zob vključuje v kristalno strukturo kalcijevega hidroksiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$). Z vezavo nastaja kalcijev fluoroapatit ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2$), ki je odpornejši proti kislinam kot prevladujoči gradniki zob - kalcijev hidroksiapatit (5,6,7).

Vloga fluoridov pri preprečevanju kariesa

Karies je bakterijsko povzročena, počasi napredujoča bolezen trdih zobnih tkiv. Povzročijo jo v biofilmu (zobnih oblogah) prisotni kariogeni mikroorganizmi, ki ob razgradnji ogljikovih hidratov izločajo šibke kisline. To povzroči lokalizirano kemično raztapljanje površine zoba pod biofilmom. Raztapljanje mineralov (demineralizacija) pri padcu pH v biofilmu pod določeno mejo in ponovno nalaganje mineralov (remineralizacija) pri porastu pH se dogajata v skleninski površini na stiku med biofilmom in skleninsko površino (5,6,7).

Prisotnost ustrezne koncentracije fluoridov v neposrednem okolju zobne površine zavira demineralizacijo oziroma raztapljanje in izgubo mineralnih snovi iz zob in celo spodbuja remineralizacijo ali nalaganje mineralnih snovi nazaj v zobe. Lokalno prisotni fluoridi zavirajo tudi rast bakterij, ki so odgovorne za nastanek zobne gnilobe, tako da inhibirajo njihov metabolizem (8,9). Antibakterijsko delovanje fluoridov lahko pripišemo dejstvu, da se fluoridi v kislem mediju obnašajo kot šibke kisline (HF), ki prehajajo preko bakterijske celične membrane, kar ima za posledico zakisanje citoplazme. Kisel pH inhibira encime, ki sodelujejo pri glikolizi, predvsem enolazo. Posledično je prizadeta razgradnja glukoze do piruvata in nastanek ATP-ja (9A).

Sistemi vnos fluoridov je običajno nizek in tako dobljena zaščita proti kariesu je majhna. Večje antikariogeno delovanje dosežemo z lokalnim vnosom fluoridov, saj tako v večji meri povečamo njihovo koncentracijo v slini. Fluorirani pripravki, ki so namenjeni lokalnemu delovanju, so predvsem geli, premazi, ustne vode in zobne paste (5,6,7).

1.2.3 IZLOČANJE FLUORIDOV

10 – 25 % zaužitih fluoridov se ne absorbira iz gastrointestinalnega trakta in se izloči z blatom. Absorbirani fluorid se pretežno izloča preko ledvic. Ledvični očistek fluoridov je dokaj visok (okoli 35 mL/min, očistek ostalih halogenov je približno 1-2 mL/min) in je odvisen od glomerulne filtracije ter od pH urina. Koncentracije fluorida v znoju so 1 – 3 $\mu\text{mol/L}$ (1,3).

1.3 TOKSIČNOST FLUORIDOV

Dokazano je, da ima fluorid antikariogen učinek (preventiva zobnega kariesa). Prevelik vnos pa lahko povzroči akutno ali kronično zastrupitev s fluoridi.

1.3.1 AKUTNA TOKSIČNOST

O akutni toksičnosti govorimo, ko posameznik naenkrat v telo vnese veliko količino fluoridov. Smrtni primeri so redki in so možni, ko je koncentracija fluoridov v telesu odrasle osebe med 35 in 70 mg F⁻ / kg telesne teže (8) in med 16 in 64 mg F⁻ / kg telesne teže (12). Pri otrocih je kot smrtna doza navedena količina fluoridov v telesu med 3 in 16 mg/kg (12). Kot simptomi akutne zastrupitve se pojavijo bolečine v trebuhu, driske, bruhanje, krči v mišicah. Absorpcijo fluoridov zmanjša uporaba kalcijevih spojin, za preprečevanje reabsorpcije iz urina pa naalkaljenje urina (10).

1.3.2 KRONIČNA TOKSIČNOST

Kronična zastrupitev s fluoridi je običajno posledica dolgotrajne izpostavljenosti, ponavadi fluoridom v pitni vodi. Razvije se lahko dentalna fluoroza, pri višjih koncentracijah pa skeletna fluoroza (8). Po SCIEF (Scientific Committee on Health and Environmental Risks) je težko določiti najnižjo koncentracijo fluoridov, ki je odgovorna za razvoj skeletne fluoroze zaradi vpliva dejavnikov, kot so prehrabene navade in različnega vnosa vode, zaradi klimatskih razlik.

1.3.2.1 Dentalna fluoroza

Dentalna fluoroza nastane kot posledica povečanega vnosa fluoridov v času razvoja zob, torej od rojstva do 6-8 leta starosti. Prevelik sistemski vnos fluoridov v času razvoja zob lahko povzroči motnjo mineralizacije sklenine ali dentalno fluorozo. Ta se lahko kaže s tankimi, neprosojnimi črtami, ki potekajo preko površine zob. V izrazitih primerih fluoroze gre za kredaste, neprosojne, slabo omejene lise, ki lahko zajemajo večji del površine zoba, prizadeta sklenina pa se lahko na mehansko izpostavljenih delih odkruši ali obrabi (5). Poleg fluorirane vode sta se kot potencialna dejavnika tveganja za nastanek fluoroze pokazala tudi nepravilna uporaba fluorovih tablet in nenadzorovano uživanje zobne paste (6,7).



Slika 1: Primer dentalne fluoroze

1.3.2.2 Skeletna fluoroza

Zvišan vnos fluoridov v telo lahko povzroči hipokalcemijo, kar ima za posledico sekundarni hiperparatireoidizem. Sproščanje PTH poveča glomerulno reabsorpcijo kalcijevih ionov v ledvicah in povečano resorpcijo kostnine. Pospešuje delovanje osteoklastov, torej celic, ki so odgovorne za razgrajevanje kostnine in povečujejo koncentracijo kalcijevih in fosfatnih ionov v krvi. Posledica tega so težave pri formiranju kosti. Pri milejši obliki skeletne fluoroze pride do znižanja kostne gostote, sklepi postanejo trdi in boleči. V hujših primerih pride do krhkosti in deformacije kosti (8,11).



Slika 2: Primer skeletne fluoroze

1.3.2.3 Drugi toksični vplivi fluoridov

Fluoridi prehajajo preko placente in preko krvno-možgansko bariere ter lahko povzročijo biokemične in funkcijske spremembe v živčnem sistemu tudi pri plodu. To naj bi pri otrocih imelo za posledico poznejše težave pri učenju. Kronična izpostavljenost fluoridom povzroča tudi oksidativni stres, saj fluoridi vplivajo na znižanje koncentracije askorbinske kisline, ki je pomemben antioksidant. Poleg tega pospešijo lipidno peroksidacijo v eritrocitih. To ima za posledico razvoj številnih kroničnih boleznih (rak, sladkorna bolezen) (12,13).

1.3.3 ZAKONSKA DOLOČILA IN PRIPOROČILA ZA DOPUSTNE VREDNOSTI VNOSA FLUORIDOV

V uradnem listu RS, št. 19/2004 (Pravilnik o pitni vodi), Priloga I, del B je določena mejna vrednost za fluoride v pitni vodi v Sloveniji do 1,5 mg/L. Prav tako uradni list RS št. 100/2001 v Pravilniku o varovanju delavcev pred tveganji zaradi izpostavljenosti kemičnim snovem pri delu navaja biološke mejne vrednosti (BAF) za fluoride v urinu delavcev pred delovno izmeno 23,82 mmol/mol kreatinina (4,0 mg/g kreatinina) in ob koncu delovne izmene 41,68 mmol/mol kreatinina (7,0 mg/g kreatinina). Pri čem se v primerih, ko je koncentracija kreatinina $< 0,5$ g/L in $> 3,0$ g/L ne upoštevajo.

EFSA (European Food Safety Authority) navaja najvišje dopustne dnevne vrednosti vnosa fluoridov za odrasle in starejše od 15 let 7 mg/dan, za otroke 9-14 let 5 mg/dan. Omenjene vrednosti temeljijo na preprečitvi skeletne fluoroze. Za preprečitev dentalne fluoroze za otroke med 1 in 3 letom je dovoljeni vnos 1,4 mg/dan in otroke med 4 in 8 letom 2,2 mg/dan.

V ZDA po EPA (U.S. Environmental Protection Agency) je maksimalna priporočena koncentracija fluoridov v pitni vodi 4 mg/L za preprečitev skeletne fluoroze in 2 mg/L za preprečitev dentalne fluoroze.

1.4 NORMALNE VREDNOSTI FLUORIDOV V KRVU IN URINU

Referenčne vrednosti fluoridov v krvi in urinu se razlikujejo, ker je koncentracija fluoridov v biološkem materialu odvisna od prehrane in predvsem od koncentracije fluoridov v pitni

vodi (14). Na variiranje koncentracije vplivajo še fiziološki dejavniki npr. funkcija ledvic in starost. V osnovi velja pravilo, da pri zdravi osebi, ki vnaša fluoride v telo predvsem s prehrano, koncentracija fluoridov v plazmi v $\mu\text{mol/L}$ korelira s koncentracijo fluoridov v pitni vodi v mg/L ali ppm (15). V literaturi zasledimo referenčne vrednosti fluoridov za odrasle osebe v krvi med 0,001 in 0,047 mg/L (14) in v urinu med 0,2 – 3,2 mg/L (14) ter 0,4 – 2,0 mg/L (16).

1.5 DOLOČANJE FLUORIDOV

1.5.1 BIOLOŠKI MATERIAL ZA DOLOČANJE FLUORIDOV

Fluoridi imajo pozitiven učinek predvsem na zobe zaradi preprečevanja kariesa, vendar so v visokih koncentracijah nevarni zaradi fluoroze, zato so razvite številne metode za določanje koncentracije fluoridov v biološkem materialu.

V primeru kratkotrajne ali akutne izpostavljenosti je smiselno meriti fluoride v plazmi in slini iz parotidnega izvodila (obušesnica). Tudi urin je primeren, vendar na koncentracijo v urinu vpliva stopnja glomerulne filtracije. Koncentracija fluoridov v kosteh je najboljši pokazatelj kronične izpostavljenosti skozi daljše obdobje. Obstaja dobra korelacija med koncentracijo fluoridov v kosteh in v ekstracelularni tekočini, to pomeni, da je koncentracija fluoridov v plazmi pri preiskovancih, ki niso vnašali fluoridov v organizem v zadnjih nekaj urah proporcionalna koncentraciji v kosteh. Koncentracija fluoridov v nohtih prav tako odraža kronično izpostavljenost. Dokazano je namreč, da so fluoridi v nohtih privzeti predvsem iz sistemskega obtoka preko rastne konice nohta in da dosežejo distalni del nohta približno po 3 mesecih ter odražajo vnos fluoridov v telo skozi daljše obdobje (npr. voda, hrana, fluorirani zobni preparati) (17,18). Drugi biološki materiali za merjenje dolgotrajne obremenitve so dentin in lasje (16).

1.5.2 IZOLACIJSKI POSTOPKI FLUORIDOV IZ BIOLOŠKEGA MATERIALA

Telesne tekočine (urin, kri, slina) pred analiznim postopkom zahtevajo zelo malo predpriprave, vendar pa je tkiva potrebno upepeliti, razgraditi s pirohidrolizo ali s postopkoma difuzije in destilacije sprostiti fluoride iz matriksa (15,19).

1.5.2.1 Upepelitev vzorca

Z upepelitvijo vzorca pri 500 – 600 °C se doseže sprostitvev kovalentno vezanih fluoridnih ionov, poleg tega se odstranijo tudi druge spojine, ki lahko motijo analize. Pri postopku se zaradi hlapnosti F⁻ dodajajo fiksatorji, kot so kalcijev fosfat, kalcijev acetat, magnezijev acetat, magnezijev oksid (19,20).

1.5.2.2 Pirohidroliza

Pri postopku pirohidrolize se s segrevanjem vzorca pri temperaturi višji od 1000 °C in dovajanjem vodne pare sprošča HF. Nastali hlapni produkt pirolize se kondenzira in zbira v polietilenski epruveti.

V večini primerov je reakcija pirohidrolize počasna, v prisotnosti katalizatorjev, kot so vanadijev, uranijev ali volframov oksid se postopek pospeši. Glede na to, da se pri procesu uporablja visoka temperatura in pri tem še nastaja HF, ki ima koroziven učinek na steklo, se za segrevanje vzorca z ali brez katalizatorja uporabljajo posode iz platine, nerjavečega jekla, niklja ali porcelana (21,22).

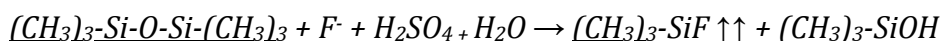
1.5.2.3 Destilacija

Destilacija je klasična metoda ločevanja fluoridnih ionov od neželenih snovi, vendar je postopek počasen. Postopek temelji na destilaciji vzorca s kislino (HClO₄, H₂SO₄), pri temperaturi 135 °C – 145 °C in pri tem nastaja hlapen HF. Za preprečitev destilacije drugih halogenov se lahko dodaja srebrov perklorat ali srebrov sulfat. V primeru, da je v vzorcu prisoten silicij, pri destilaciji nastaja H₂SiF₆, iz katerega se pri nadaljnji hidrolizi sprostijo fluoridni ioni (23).

1.5.2.4 Difuzija s heksametildisiloksanom (HMDS)

Osnovni difuzijski postopek izolacije fluoridov iz matriksa je temeljil na difuziji HF. HF se sprošča pri segrevanju vzorca pri 50 °C čez noč v prisotnosti HClO₄. Polietilenska posoda mora biti zaprta. Nastali HF zreagira z dodanim NaOH, sproščajo se fluoridni ioni, ki se nato analizirajo (20). Taves je leta 1968 ugotovil, da z uvedbo siliranih spojin v reakcijski zmesi, nastajajo hlapni fluorosilani, kar ima za posledico pospešeno difuzijo in možnost

izvajanja te pri sobni temperaturi (24). V devetdesetih letih prejšnjega stoletja je Whitford difuzijski postopek izolacije fluoridov po Tavesu modificiral: HMDS v kislem mediju (npr. 2 M H₂SO₄) s fluoridi tvori trimetilfluorosilan (TMFS), ki je zelo hlapna spojina (vrelišče ima pri 16 °C). Pri reakciji nastaja tudi trimetilsilanol (TMS). Hlapen TMFS ob stiku z alkalnim medijem razpade in sprostito se fluoridni ioni. Dve molekuli TMS se kondenzirata in nastaja HMDS, ki lahko v kislem mediju ponovno vstopa v reakcijo s fluoridi (20,24).



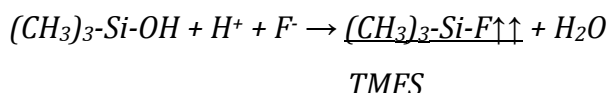
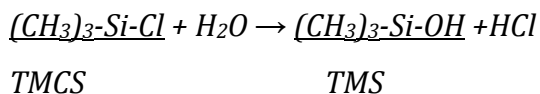
Heksametildisiloksan (HMDS) *Trimetilfluorosilan (TMFS)*

Izvedba difuzije fluoridov iz nohtov z uporabo HMDS

V plastičnih posodah Falcon 1007 (petrijevke) odpipetiramo 3 mL deionizirane vode in dodamo zatehtano količino vzorca (nohti). Petrijevko zapremo s pokrovom, v katerem je narejena odprtina, na notranjo stran pokrova pa previdno odpipetiramo 50 µL 0,05 M raztopine NaOH obliki treh kapljic. Rob pokrova ovijemo s parafilom ali zapremo z vazelinom. Skozi odprtino v pokrovu dodamo 3 mL HMDS, nasičenega s kislino (3,0 M H₂SO₄). Odprtino je potrebno takoj po dodatku HMDS zapreti. Difuzija fluoridov v NaOH se začne takoj po dodatku HMDS in se pusti, da v celoti poteče preko noči. Po končani difuziji na notranjo stran pokrova dodamo 20 µL 0,20 M očetne kisline, katero previdno premešamo z NaOH v eno samo kapljo. Kapljo s pipeto odpipetiramo z pokrova in dodamo toliko deionizirane vode, da je končni volumen 75 µL ali 100 µL. Nastala raztopina se nato uporablja za nadaljnje analize npr. z ISE ali GC (17,18).

V primeru nadaljnje analize z »direktno« GC, ko vzorec direktno injiciramo na plinski kromatograf je po zgoraj opisani izolaciji fluoridov iz nohtov potrebna še ekstrakcija z organskim topilom in šele nato kvantifikacija. Difuzijski raztopini se doda trimetilklorosilan (TMCS), ki v kislem mediju hidrolizira v trimetilsilanol (TMS), ta reagira s fluoridnimi ioni, pri čemer nastaja hlapen TMFS. TMFS se ekstrahira z organskim topilom (toluen), lahko se uporabi še notranji standard (izopentan). Po končani ekstrakciji se na GC injicira toluenska plast in meri površina ali višina TMFS

kromatografskega vrha. Namesto TMCS se lahko uporabijo tudi drugi trialkilchlorosilani (25).



V primeru, da je metoda izbora plinska kromatografija s tehniko nadprostora, ni potrebno izvajati izolacije fluoridov s postopkom difuzije v petrijevkah, ampak ta postopek lahko izvajamo direktno v headspace vialah in se fluoridi določajo direktno v obliki hlapnega TMFS. Prav tako se z uporabo tehnike nadprostora izognemo dodatni ekstrakciji z organskim topilom, ki je potrebna pri direktni GC (26).

Pri pripravi, shranjevanju fluoridnih raztopin in vzorčenju se moramo izogibati stekleni laboratorijski posodi. Fluoridi reagirajo s steklom (SiO_2) v prisotnosti že majhne količine vode in pri tem nastaja silicijev tetrafluorid (SiF_4) (27). Pri določanju fluoridov iz urina se uporabljajo polietilenske posodice z dodatkom EDTA, ki zniža vezavo fluoridnih ionov na katione npr. kalcij. Epruvetam za odvzem krvi pa se dodaja heparin (28).

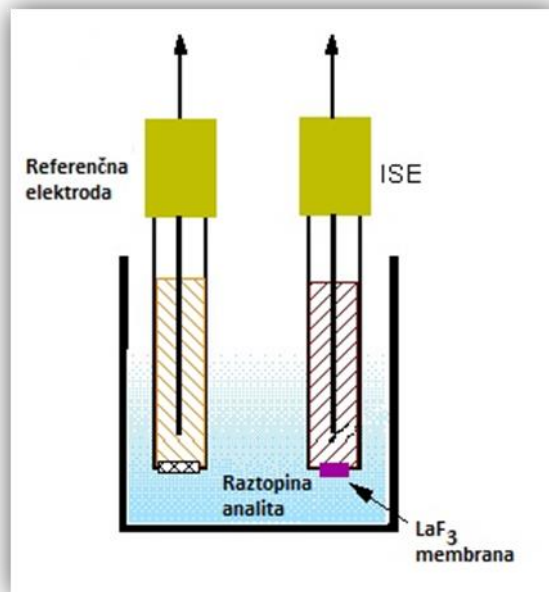
1.5.3 ANALIZNE METODE DOLOČANJA FLUORIDOV

Najpogosteje uporabljene analizne metode za določanje fluoridov v bioloških vzorcih so direktna potenciometrija (fluoridna ion selektivna elektroda), plinska kromatografija, ionska kromatografija in kolorimetrija. Fluoridi se lahko določajo tudi z encimsko metodo vendar ta postopek ni pogost (25,29).

1.5.3.1 DIREKTNA POTENCIOMETRIJA

Je elektrokemijska analizna metoda, kjer ugotavljamo koncentracijo analita z merjenjem napetostne razlike med indikatorsko in referenčno elektrodo.

Za merjenje fluoridnih ionov se kot indikatorska elektroda uporablja ion selektivna elektroda, ki ima kristalno membrano iz LaF_3 , referenčna elektroda je običajno $Ag/AgCl$ elektroda in ima znan stalen elektrokemijski potencial.



Slika 3: Shema fluoridne ISE s kristalno membrano iz LaF_3

Ko indikatorsko elektrodo potopimo v preiskovalno raztopino, prosti fluoridni ioni difundirajo skozi membrano, nastane potencial, ki je odvisen od aktivnosti analita. S pomočjo izmerjenega potenciala preko aktivnosti lahko določimo koncentracijo ionov v raztopini. Potencial je povezan z Nernstovo enačbo (enačba 1).

$$E = E^{\circ} - (RT/zF) \ln a_{F^-} \quad \text{Pri } 25^{\circ} \text{ C je } E = E^{\circ} - (0,059/z) \log a_{F^-} \quad (\text{Enačba 1})$$

E° - standardni elektrodni potencial

R - plinska konstanta (8,314 J/K mol)

T - absolutna temperatura (298,16 K - 25°C)

F - Faradayeva konstanta (96500 As)

z - število elektronov, ki v reakciji sodelujejo

a – aktivnost fluoridnih ionov

ln – 2,303 log

Aktivnost fluoridnih ionov (a) je odvisna od koncentracije raztopine (c) in koeficienta aktivnosti (γ), pri čemer je $a = c\gamma$. Ko je ionska moč raztopine konstantna, je tudi koeficient

aktivnosti konstanten. Izmerjena napetostna razlika med elektrodama je sorazmerna logaritmu koncentracije fluoridnih ionov v raztopini. Za uravnavanje ionske moči se uporablja TISAB (Total Ionic Strength Adjustment Buffer) pufer. TISAB pufer poleg tega še uravnava pH vrednost raztopine, da je ta med 5 in 8 (optimalen pH je 5,5). Prisotnost OH^- ionov moti določanje fluoridnih ionov z ISE. Tretja funkcija TISAB pufra je sproščanje fluoridnih ionov iz kompleksov z aluminijem in železom (27,30).

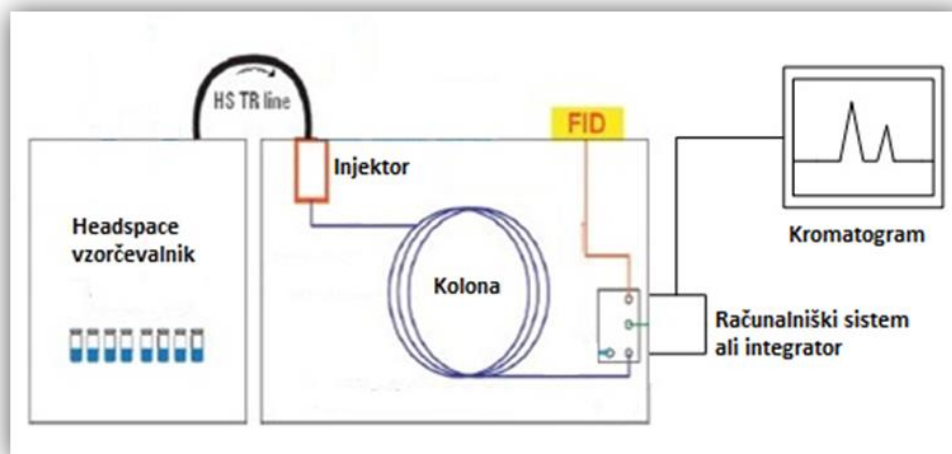
Z ionoselektivno elektrodo lahko izmerimo koncentracijo fluoridnih ionov v raztopini do 0,02 mg/L (ppm) (31).

1.5.3.2 PLINSKA KROMATOGRAFIJA S TEHNIKO NADPROSTORA

Kromatografija je separacijska metoda, kjer je separacija posledica razlik v hitrosti potovanja posameznih komponent pod vplivom mobilne faze (plin, tekočina), zaradi selektivnega zadrževanja (retencije) komponent na stacionarni fazi (trdna površina, nemobilna tekočina). Glede na vrsto mobilne in stacionarne faze ločimo plinsko kromatografijo (GC) in tekočinsko kromatografijo (LC).

Plinska kromatografija (GC) se uporablja za separacijo in kvantitativno analizo termično stabilnih spojin, ki imajo ustrezno hlapnost. Ločevanje komponent v vzorcu temelji na porazdelitvi med mobilno in stacionarno fazo. Mobilna faza je tista faza, ki se premika in je v plinastem stanju (dušik, helij,...), stacionarna faza je mirujoča in je lahko trdna površina ali nemobilna tekočina nameščena znotraj kolone. Kromatografska separacija torej poteka na koloni, ki je nosilec stacionarne faze s pomočjo plinaste mobilne faze. Molekule vzorca, ki potujejo s pomočjo mobilne faze imajo različno afiniteto do molekul stacionarne faze, zato se tudi različno časovno eluirajo (izločajo - ločevanje glede na različne retencijske čase) iz kolone na detektor. Ko je plinski kromatograf kombiniran s headspace vzorčevalnikom, govorimo o plinski kromatografiji s tehniko nadprostora (HS-GC).

HS-GC sestavljajo trije, med seboj povezani deli: headspace vzorčevalnik, plinski kromatograf (injektor, kromatografska kolona in detektor) ter integrator ali računalniški sistem.



Slika 4: Shemski prikaz headspace plinskega kromatografa

1. Headspace vzorčevalnik

V vzorčevalniku s tehniko nadprostora spojine iz tekočega ali trdnega agregatnega stanja pretvorimo v plinasto fazo še pred prihodom na kolono. Pri povišani temperaturi se hlapne snovi porazdelijo iz matriksa v plinasto fazo nad vzorcem. Del tega plina (nadprostora) potuje na kolono, kjer poteka ločevanje. Metoda temelji na principu zaprtega sistema (Henry-jev zakon), kjer je parni tlak snovi v plinasti fazi sorazmeren koncentraciji te snovi v raztopini.

2. Plinski kromatograf

2.1. Injektor

Injektor nam omogoča injiciranje vzorca na kolono. Obstajata dve vrsti injektorja: splitt in splittless. V primeru splitt injektorja se na kolono prenese le del vzorca, s tem se zniža preobremenjenost kolone, vendar se zniža tudi opazovani signal. Ta način injiciranja je primeren za vzorce, ki vsebujejo visoke koncentracije opazovane spojine. Pri zelo nizkih koncentracijah (učinkovine v sledovih) se uporablja splittless način injiciranja (injicira se ves vzorec).

2.2. Kromatografska kolona

Uporabljajo se polnjene in kapilarne kolone. Polnjene kolone so 2-3 m dolge, so lahko kovinske ali steklene z notranjim premerom 2 – 8 mm. Polnjene so s trdnim, inertnim polnilom prevlečenim s tekočo stacionarno fazo. Velikost delcev polnila je običajno 125 – 150 μm (100 / 120 mesh). Kapilarne kolone so daljše (do 50 m), s premerom do 1 mm.

2.3. Detektor (FID)

Komponente vzorca se eluirajo iz kolone s pomočjo mobilne faze in prehajajo na detektor. V plinski kromatografiji se uporabljajo številni detektorji (TCD, TED, FPD, PID, ECD in FID). V rutini se največ uporablja FID – Flame Ionization Detector, kjer gre za detekcijo ionov. Eluent iz kolone prehaja v plamen visoke temperature (vodik-zrak), ta povzroči pirolizo organskih spojin (eluent), pri tem nastajajo ioni in elektroni, ki povzročijo nastanek toka, ki ga detektor zazna. Nastali tok povzroči padec napetosti, ta signal ojačimo in ga zaznamo na integratorju. Število ionov in elektronov je proporcionalno številu ogljikovih atomov v molekulah snovi, ki pripotujejo na detektor. Detektor ima visoko občutljivost in visok linearen odziv.

3. Integrator

Integrator izriše kromatogram in poda meritve površin kromatografskih vrhov ter retencijske čase za posamezne komponente (32,33,34).

Izračun koncentracije snovi v vzorcu

Posnamemo kromatograme standardnih raztopin znane koncentracije, narišemo umeritveno krivuljo, ki predstavlja odvisnost jakosti signala (razmerje površine kromatografskega vrha komponente in vrha notranjega standarda) in znane koncentracije. Iz umeritvene krivulje nato odčitamo koncentracijo komponente v preiskovanem vzorcu oziroma koncentracijo iz vzorca izračunamo iz enačbe umeritvene premice.

1.5.3.3 DRUGE METODE DOLOČANJA FLUORIDOV

Kolorimetrija

Določanje fluoridnih ionov temelji na razbarvanju obarvanega kompleksa, ki je produkt med cirkonijevimi ioni ter SPANDS (natrijev 2-(parasulfofenilazo)-1,8-dihidroksi-3,6-naftalen disulfonat) reagentom in se meri spektrofotometrično pri 570 nm. Stopnja razbarvanja je sorazmerna koncentraciji fluoridnih ionov. Druga organska barvila, ki se lahko uporabijo, so Eriokrom cianin R in alizarin (35,36).

V uporabi je tudi postopek, kjer prisotnost fluoridnih ionov spremeni barvo rdečega cerijevega ali lantanovega kompleksa z alizarin kompleksonom ($C_{19}H_{15}NO_8$) v modro. Absorbanca se meri pri 610-620 nm.

Anione in katione, ki motijo, se lahko odstrani s predhodno destilacijo vzorca.

Ionska kromatografija

Osnova ionske kromatografije je ionska izmenjava. Kolona je napolnjena z ionskim izmenjevalcem, kar predstavlja stacionarno fazo. Topilo (mobilna faza) in raztopljen vzorec potujeta skozi kolono pod visokim tlakom. Ioni vzorca in ioni eluenta imajo različno afiniteto do funkcionalnih skupin izmenjevalca in se različno eluirajo na detektor. Običajno se uporablja detektor električne prevodnosti. V večini primerov je po separacijski koloni še supresor, ki poveča občutljivost meritev. Supresor prevede ione vzorca v popolnoma disociirano obliko, ione eluenta pa v nedisociirano obliko. Pri določanju fluoridov je separatorska kolona običajno polnjena z anionskimi izmenjevalnimi smolami, kot eluent oziroma mobilna faza je v uporabi predvsem natrijev karbonat/natrijev bikarbonat pufer, vodna raztopina kalijevega benzoata ali kalijevega hidrogen ftalata (22).

Encimska metoda

Anioni so običajno inhibitorji katalitične aktivnosti encimov, ki vsebujejo hem v svoji strukturi npr. konjska peroksidaza. Reakcija temelji na nastanku kompleksa med anionom in kovinskim ionom (Fe^{2+}) v aktivnem mestu encima. Analizni signal se meri spektrofotometrično ali fluorometrično (29).

1.6 VREDNOTENJE (VALIDACIJA) ANALIZNE METODE

Validacija analizne metode je proces, s katerim potrdimo, da ta dosega predpisane rezultate in ustreza namenu uporabe. Vrednotenje metode vključuje določanje naslednjih parametrov: specifičnost in selektivnost, meja zaznavnosti, meja določljivosti, linearnost, delovno območje, točnost, natančnost, robustnost.

Katere od teh parametrov moramo preizkusiti in katerim kriterijem mora biti zadoščeno, je odvisno od analiznega postopka oziroma, če je ta namenjen za rutinsko uporabo ali pa gre za analizni postopek, ki je uporabljen le v eni študiji oziroma za določanje redkih analitov.

1.6.1 SELEKTIVNOST

Selektivnost je sposobnost metode, da loči analit od ostalih komponent, ki so prisotne v vzorcu (npr. drugi analiti, nečistote, reagenti,...). Potrebno je posneti kromatograme vseh uporabljenih raztopin, topil, pomožnih snovi in slepega vzorca. Selektivnost ovrednotimo na osnovi vizualne ocene odsotnosti interferirajočih spojin.

1.6.2 LINEARNOST

Linearnost je sposobnost metode, da v določenem koncentracijskem območju daje odzive (površina kromatografskega vrha), ki so sorazmerni s koncentracijo analita v vzorcu. Določimo jo z dvakratnim merjenjem vsaj petih raztopin s poznano koncentracijo analita. Linearnost preverimo z risanjem umeritvene krivulje z enačbo $y = kx + n$, ki podaja povezavo med merjenim odzivom in koncentracijo analita (enačba 2).

$$y = kx + n \quad (\text{Enačba 2})$$

y - odziv (npr. površina kromatografskega vrha oziroma razmerje površin kromatografskega vrha analita in IS)

x - koncentracija analita v vzorcu

k - naklon premice

n - odsek na ordinati

Odnos med koncentracijo analita in odzivom ovrednotimo s Pearsonovim koeficientom *r* oziroma korelacijskim koeficientom R^2 . Linearnost metode je potrjena, če je $R^2 \geq 0,99$.

1.6.3 TOČNOST

Točnost je ujemanje rezultatov, ki jih izmerimo z našo metodo, s pravo (referenčno) vrednostjo. Točnost določimo z analizo vsaj dveh kontrolnih vzorcev z znano koncentracijo analita. Kontrolni vzorci morajo pokrivati merilno območje metode (npr. ena manjša in ena višja koncentracija), potrebno pa je opraviti vsaj pet ponovitev, sledi izračun relativne napake (R_N), ki kaže odstopanje srednje vrednosti vseh meritev od prave vrednosti (enačba 3). Dovoljena odstopanja so $\pm 15\%$ od dejanske vrednosti, v primeru koncentracije v bližini LOQ pa je sprejemljiv kriterij za točnost $\pm 20\%$.

$$R_N(\%) = \frac{\bar{x} - \mu}{\mu} \times 100 \quad (\text{Enačba 3})$$

\bar{x} - povprečna vrednost

μ - prava (dejanska, ciljana) vrednost

1.6.4 NATANČNOST

Natančnost metode nam pove, kakšno je sipanje meritev znotraj neke serije ponovitev. Podajamo jo kot standardni odmik SD (enačba 4) ali kot relativni standardni odmik (RSD) več zaporednih meritev istega vzorca. RSD izračunamo po enačbi 5.

$$SD = \sqrt{\frac{\sum_i^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}} \quad (\text{Enačba 4})$$

x_i – posamezna meritev

\bar{x} - povprečna vrednost meritev

n – število meritev

$$RSD(\%) = \frac{SD}{\bar{x}} \times 100 \quad (\text{Enačba 5})$$

SD – standardni odmik

\bar{x} - povprečna vrednost meritev

Natančnost običajno določamo kot znotraj dnevno in med dnevno (vsaj 3 dni) ponovljivost. Potrebno je opraviti analizo kontrolnih vzorcev analita (vsaj dve različni koncentraciji QC vzorcev, ki pokrivajo celotno območje metode in vsaj 5 ponovitev pri vsaki koncentraciji).

Sprejemljiv kriterij za ponovljivost metode je ta, da RSD vseh ponovitev pri posamezni koncentraciji QC ne presega 15 % oziroma 20 % pri LOQ.

1.6.5 MEJA ZAZNAVNOSTI (LOD)

Je najnižja koncentracija analita v vzorcu, ki jo zaznamo, ni pa nujno, da jo kvantitativno določimo. V literaturi je opisanih več načinov določanja LOD.

1. Vizualna ocena iz kromatograma.
2. Na podlagi razmerja signal/šum. Primerjamo signal nizke koncentracije analita s signalom, ki ga zaznamo na bazni liniji. Za mejo zaznavnosti zadostuje razmerje signal/šum 3 ali 2:1.
3. Na osnovi standardne deviacije odziva in naklona umeritvene premice.

1.6.6 MEJA DOLOČLJIVOSTI (LOQ)

LOQ je najnižja koncentracija analita, ki zagotavlja dovolj visok signal, da ga lahko kvantificiramo z ustrezno natančnostjo. LOQ lahko:

1. Ocenimo vizualno iz kromatograma
2. Izračunamo na podlagi razmerja signal/šum. Primerjamo signal nizke koncentracije analita s signalom, ki ga zaznamo na bazni liniji. Za mejo določljivosti zadostuje razmerje signal/šum 10:1.
3. Na osnovi standardne deviacije odziva in naklona umeritvene premice

1.6.7 MERILNO OBMOČJE

Je območje med najnižjo in najvišjo koncentracijo analita v vzorcu, za katere so bili dokazani točnost, ponovljivost in linearnost. Običajno ga določamo iz območja linearnosti (37,38).

2 NAMEN DELA

Zaradi potreb Stomatološke klinike v Ljubljani, Center za otroško in preventivno zobozdravstvo, bomo razvili in ovrednotili metodo za določanje koncentracije fluoridov v nohtih otrok.

V ta namen bomo:

1. Razvili plinsko kromatografsko metodo

Izbrali bomo take pogoje dela in reagente, da bodo ustrezali določanju fluoridov v nohtih s plinsko kromatografijo s tehniko nadprostora.

2. Ovrednotili ustreznost metode

Ustreznost metode bomo potrdili z merjenjem vodnih raztopin fluorida, ki jih bomo pripravili z redčenjem standardne raztopine fluoridov s poznano koncentracijo. Določili bomo validacijske parametre: selektivnost, mejo zaznavnosti, mejo določljivosti, linearnost, točnost in natančnost (ponovljivost znotraj dneva in ponovljivost med dnevi).

3. Določili bomo koncentracijo fluoridov v nohtih

Z merjenjem fluoridov v nohtih želimo oceniti izpostavljenost majhnih otrok fluoridom, oziroma koliko k tej izpostavljenosti prispeva redna uporaba fluorirane zobne paste. Prav tako bomo ugotavljali, če se uporaba zobnih past, ki vsebujejo različne koncentracije fluoridov (500 ppm in 1000 ppm) odraža v razliki koncentracij fluoridov v nohtih.

3 MATERIALI

3.1 REAGENTI

Preglednica I: Seznam uporabljenih reagentov

Ime	Empirična formula	Opis	Proizvajalec
Žveplova (VI) kislina 95 – 97 %	H ₂ SO ₄	M = 98,08 g/mol 1 L = 1,84 kg	Merck
Heksametildisiloksan (HMDS) ≥ 98 %	(CH ₃) ₃ SiOSi(CH ₃) ₃	M = 162,38 g/mol 1 L = 0,764 kg	Sigma Aldrich
Etilmetil keton 99 %	CH ₃ COCH ₂ CH ₂	M = 72,11 g/mol 1 L = 0,80 kg	Kemika, Zagreb
Metanol ≥ 99,9 %	CH ₃ OH	M = 32,04 g/mol 1 L = 0,792 kg	Merck
Natrijev fluorid	NaF	c (F ⁻) = 0,1 mol/L	Fluka
Voda	H ₂ O	deionizirana	ARIUM pro UV/DI, Sartorius Stedim Biotech (aparati)

3.2 BIOLOŠKI VZORCI

Vzorci otroških nohtov so zbrali na Stomatološki kliniki v Ljubljani, Center za otroško in preventivno zobozdravstvo. 289 otrok je bilo povabljenih na dva zobozdravniška pregleda, kjer so jim postrigli tudi nohte na rokah. Ob prvem pregledu, ki se ga je udeležilo 264 otrok, so bili otroci stari med 6 in 8 mesecev in še niso uporabljali fluorirane zobne paste. Ti so bili nato naključno razdeljeni v dve skupini: prva je uporabljala zobno pasto z vsebnostjo fluorida 500 ppm, druga pa zobno pasto s 1000 ppm fluorida. Obe vrsti zobne paste je za namen raziskave izdelovala »Ilirija, razvoj, proizvodnja in trženje kozmetičnih izdelkov, d.d.«. Paste z različno vsebnostjo fluorida so bile označene z različno barvo nalepke, na njih pa ni bilo podatka o vsebnosti fluorida. Količina uporabljene zobne paste naj bi bila za majhno grahovo zrno velika. Zobe naj bi starši umivali otrokom zjutraj in zvečer po zadnjem obroku. Staršem je bilo tudi naročeno, naj otroci po končanem umivanju zob, zobno pasto izpljunejo.

Po 6-10 mesečni uporabi fluorirane zobne paste so otroke ponovno povabili na pregled. Drugega pregleda se je udeležilo 232 otrok, katerim so ponovno postrigli nohte. Nohti so bili shranjeni v plastičnih posodicah s pokrovčkom, pri sobni temperaturi in ustrezno označeni. Z analizo nohtov smo pričeli, ko so bili zbrani vzorci prvega in drugega striženja.

3.3 PRIBOR IN OPREMA

Preglednica II: Pregled uporabljenega pribora in opreme

Pribor in oprema	Proizvajalec
Pipete (nastavljive)	Brand
Steklene viala za HS-GC (10 mL)	Agilent
Aluminijasti pokrovi za viala s silikonskim septumom za HS-GC	Agilent
Analizna tehtnica	Mettler AE 240
Ultrazvočna kopel	Bandelin Sonorex TK 52
Aparat za prečiščeno vodo	ARIUM pro UV/DI, Sartorius Stedim Biotech
Plinski kromatograf	Hewlett Packard 5890 Series II
Headspace vzorčevalnik	Agilent 7694
Integrator	HP 3396 A
Polnjena kolona	0,3% Carbowax 1500/ Carbopack C, 60-80 mesh
Plinske jeklenke (zrak, N ₂ , H ₂)	Messer

4 METODE

4.1 PRIPRAVA OSNOVNIH RAZTOPIN

4.1.1 DELOVNI REAGENT

- Delovni reagent je vseboval 5 mL vodne raztopine A, 0,250 mL vodne raztopine B in 0,025 mL vodne raztopine C.
- Raztopina A - 1,5 mol/L H₂SO₄, ki smo jo pripravili iz koncentrirane kisline.
- Raztopina B - Etilmetil keton s koncentracijo 0,04 g/L, ki smo ga pripravili z redčenjem 99 % etilmetil ketona.
- Raztopina C – heksametildisiloksan (HMDS)
- Delovni reagent smo pripravljali dnevno.

4.1.2 STANDARDNE RAZTOPINE FLUORIDA

- Pri pripravi in shranjevanju standardnih raztopin smo uporabljali plastične 50 mL bučke ter plastične stekleničke. Priprava je potekala volumetrično (pipetiranje).
- Izhajali smo iz 0,1 M NaF osnovne standardne raztopine s koncentracijo fluoridnih ionov 1,9 mg/mL. Iz te raztopine smo pripravili vodno raztopino s koncentracijo 19 µg/mL.
- Iz 19 µg/mL vodne raztopine 0,1 M NaF smo pripravili naslednje vodne raztopine fluoridov: 9,5; 19; 38; 57; 76; 95; 114; 190; 285 in 380 ng/mL. Te raztopine smo uporabili za validacijo metode in za pripravo umeritvene premice pri določanju fluoridov v biološkem materialu (nohtih).

4.1.3 FLUORIDNA RAZTOPINA ZA PREVERJANJE TOČNOSTI IN NATANČNOSTI METODE (146,5 ng/mL)

- Za kontrolo točnosti nismo imeli na razpolago referenčne raztopine z znano koncentracijo, zato smo poleg volumetrično pripravljenih vodnih raztopin fluorida pripravili gravimetrično (s tehtanjem) še dodatno raztopino fluoridnih ionov s koncentracijo 14,65 ng/ 100 µL.

- Izhajali smo iz osnovne raztopine 0,1 M NaF s koncentracijo fluoridnih ionov 1,9 mg/mL.

4.2 PREDPRIPRAVA BIOLOŠKIH VZORCEV (NOHTOV)

- Vzorce nohtov smo očistili z enominutnim spiranjem v 1 mL deionizirane vode v ultrazvočni kopeli. Vodo smo odpipetirali in nohte posušili pri sobni temperaturi.

4.3 PRIPRAVA STANDARDNIH RAZTOPIN IN BIOLOŠKIH VZORCEV (NOHTI) ZA HS-GC ANALIZO

- V 10 mL HS vialo smo pipetirali 0,1 mL standardne raztopine znane koncentracije in dodali 0,1 mL delovnega reagenta, kar pomeni, da je bilo v viali 0,95; 1,9; 3,8; 5,7; 7,6; 9,5; 11,4; 19,0; 28,5 ali 38,0 ng F⁻. Vialo smo takoj zaprli in analizirali s plinsko kromatografijo.
- Nohte smo zatehtali v 10 mL HS-GC viali, dodali 0,1 mL deionizirane vode in 0,1 mL delovnega reagenta. Po dodatku delovnega reagenta smo vialo (zaradi hlapnosti TMFS) takoj zaprli in vstavili v vzorčevalnik, kjer je potekala kromatografska analiza. Nohti so bili pri otrocih striženi dvakrat; prvo striženje (pred uporabo fluorirane zobne paste) in drugo striženje (po uporabi fluorirane zobne paste). Nohte prvega in drugega striženja za istega otroka smo tehtali ločeno, analizirali pa smo jih znotraj iste serije. V vsakem vzorcu nohtov smo izmerili količino fluoridov v ng, rezultat smo nato preračunali na maso vzorca in smo dobili koncentracijo fluoridov v nohtih (ng fluorida na mg nohta; ng/mg).

4.4 PLINSKO KROMATOGRAFSKA METODA

4.4.1 POGOJI DELA NA VZORČEVALNIKU

TEMPERATURE

Termostatska kopel (Oven)	55 °C
Zanka (Loop)	65 °C

PRITISK

Tlak nosilnega plina 22,4 Psi

ČASI

Čas analize (GC cycle time) 16 min

Čas uravnoveženja (Vial eq.time) 15 min

Čas injiciranja (Inject time) 0,5 min

4.4.2 POGOJI DELA NA PLINSKEM KROMATOGRAFU

Detektor 220 °C

Injektor 200 °C

Pretok mobilne faze 26 psi

4.4.3 TEMPERATURNI PROGRAM

1. Začetna temperatura na koloni: 2,5 min pri 75 °C
2. Segrevanje s hitrostjo 10 °C/min
3. Končna temperatura na koloni: 12 min pri 120 °C

Pri izbrani HS-GC metodi določujemo fluoride v obliki zelo hlapnega TMFS (trimetilfluorosilan). Z opisanimi pogoji smo dosegli tudi dobro ločljivost vseh hlapnih komponent v viali.

4.5 STATISTIČNA OBDELAVA REZULTATOV

Po opravljeni analizi smo rezultate statistično ovrednotili. Za pridobitev parametrov, ki so bili ključni za validacijo analizne metode, smo uporabili osnovne statistične zveze, ki so opisane v poglavju 1.6. V ta namen smo uporabili računalniški program Microsoft Office Excel 10.

Rezultate analize bioloških vzorcev (nohtov) smo obdelali z računalniškim programom SPSS 18. S Kolmogorov-Smirnovim testom smo, ugotavljali kako se porazdeljujejo meritve, nato smo za primerjavo vsebnosti fluoridov v nohtih pred in po začetku uporabe zobne paste uporabili Wilcoxonov test predznačenih rangov in za primerjavo vsebnosti fluoridov v nohtih pri testni in kontrolni skupini pa Wilcoxonov test vsote rangov.

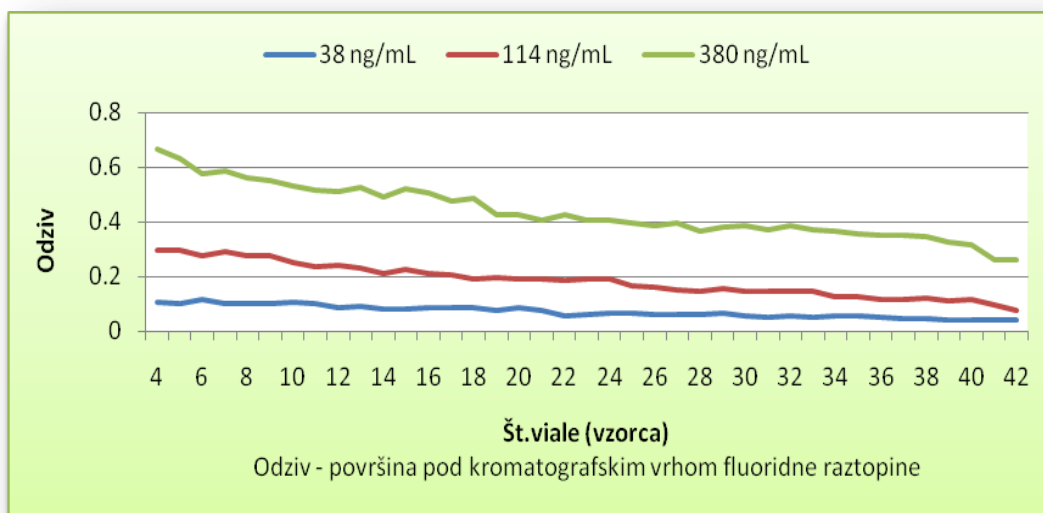
5 REZULTATI

5.1 VPLIV STEKLA NA REZULTETE ANALIZE

V literaturi, ki opisuje določanje fluoridov, je poudarjeno, da se je pri izbiri laboratorijskega pribora potrebno izogibati steklu, zaradi reagiranja fluoridnih ionov z SiO_2 iz stekla, kar vodi do lažno znižanih rezultatov. Pri našem postopku smo pri pripravi in shranjevanju standardnih raztopin uporabljali plastičen pribor, pri sami analizi z HS-GC pa smo uporabili steklene vial, ker za to delo ni na razpolago vial iz drugega materiala.

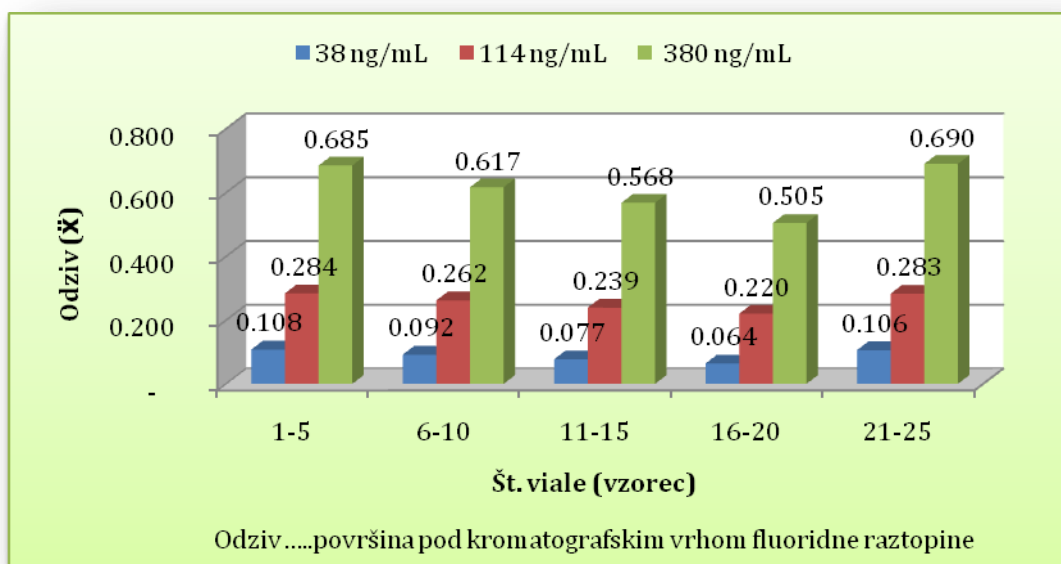
Pred vrednotenjem analizne metode, smo naredili preizkus, kakšna je izguba fluoridnih ionov pri uporabi steklenih vial.

- Prvi preizkus smo opravili z raztopinami, v katerih je bila koncentracija fluoridov 38, 114 in 380 ng/mL. Vsako raztopino smo odpipetirali v 42 vial in jih analizirali eno za drugo. To pomeni, da je bil časovni zamik med analizo prve in zadnje vial 11 ur in 25 min. Po končani GC analizi smo opazovali spremembo odziva v odvisnosti od časa, ko je bil pripravljen vzorec (čas zapiranja vial) do časa, ko je bil vzorec analiziran. Rezultate (površina kromatografskega vrha) smo predstavili grafično. Iz grafa (slika 5) je razviden časovni padec odziva. To pomeni, da imajo standardni fluoridni vzorci, ki so bili dalj časa v steklenih vialah, nižje odzive.



Slika 5: Časovni vpliv steklenih vial na kromatografsko analizo fluoridnih vzorcev

- V drugem preizkusu smo pripravljali serijo istih fluoridnih raztopin, kot pri prvem preizkusu, vendar v drugačnem vrstnem redu, tako da smo skrajšali čas med pripravo in analizo vzorca. S tem smo želeli skrajšati čas stika med fluoridno raztopino in stekleno vialo. To smo dosegli tako, da sta serijo sestavljali dve časovno različno odpipetirani skupini vzorcev (20+5). Ponovno smo merili odziv (površina kromatografskega vrha fluoridnih ionov). S tem smo želeli dokazati, da padcu odziva, po pipetiranju svežih vzorcev (vzorci od 21 do 25) sledi ponoven dvig odziva. Na grafu (slika 6) je videti, da se je povprečen odziv vsakih 5 zaporednih vial znižal za približno 14 % pri analizi fluoridnega standarda s koncentracijo 38 ng/mL, za 9 % pri koncentraciji 114 ng/mL in za 15 % pri koncentraciji 380 ng/mL . Vzorci od 21 do 25 so bili »sveže« odpipetirani in je zaznati dvig odziva pri vseh treh koncentracijah, ki je skoraj enak odzivu prvih petih vzorcev odpipetiranih na začetku serije.



Slika 6: Vpliv sveže pripravljenih vzorcev na kromatografsko analizo

5.2 VREDNOTENJE METODE

Pri vrednotenju analizne metode smo se odločili za validacijo naslednjih parametrov: selektivnost, meja zaznavnosti, meja določljivosti, linearnost, natančnost in točnost.

Vse vzorce, ki smo jih uporabili za vrednotenje HS-GC metode, smo pripravili po zgoraj opisanih postopkih.

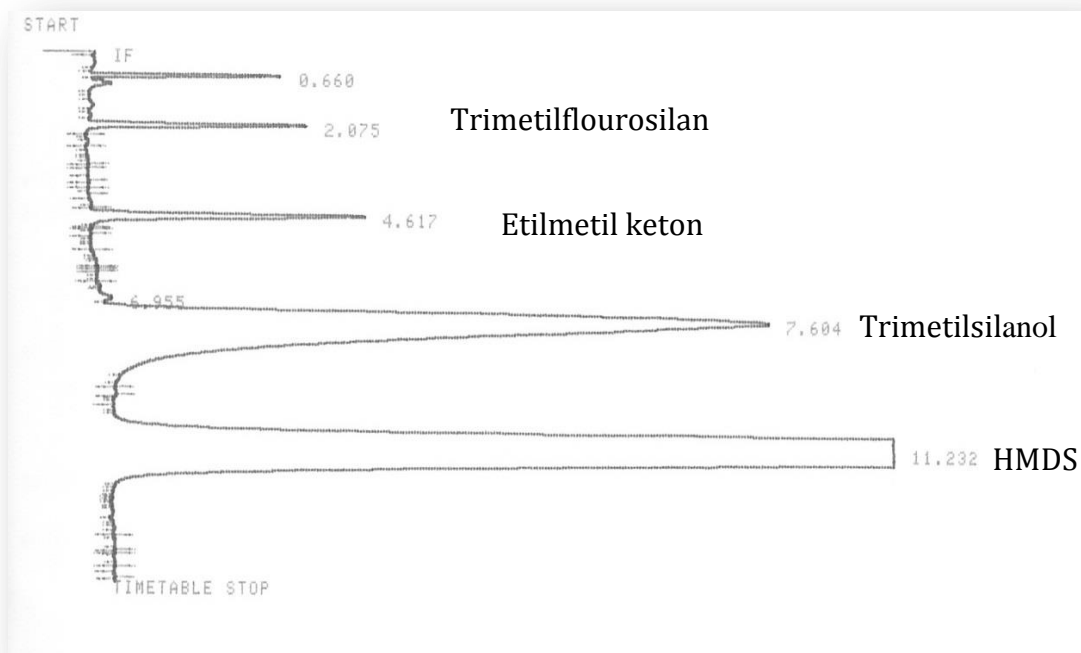
5.2.1 SELEKTIVNOST

Selektivnost metode (na kromatografski vrh analita ne vplivajo druge komponente) smo preverjali s posnetkom kromatogramov za naslednje spojine:

- deionizirana voda brez dodatka delovnega reagenta
- deionizirana voda z dodatkom delovnega reagenta
- deionizirana voda z HMDS v 1,5 M H₂SO₄
- etilmetil keton (0,04 g/L)
- standardna raztopina fluoridov z nizko koncentracijo in dodatek delovnega reagenta
- standardna raztopina fluoridov z visoko koncentracijo in dodatek delovnega reagenta
- vzorec nohtov in delovni reagent

Želeli smo ugotoviti, pri katerem času se iz kolone eluirajo posamezne komponente ter če na kromatografski vrh fluoridov oz. TMFS vpliva prisotnost drugih komponent. S povečevanjem koncentracije fluoridnih ionov pa smo hoteli potrditi retencijski čas TMFS.

Iz slike 7 je razvidno, da se TMFS (fluoridi) eluira pri 2,07 min, na kromatografski vrh ne vplivajo druge komponente, kot tudi ne na kromatografski vrh etilmetil ketona (notranji standard) pri 4,62 min. Reagent HMDS in njegov produkt hidrolize trimetilsilanol izstopata iz kolone veliko pozneje kot TMFS in notranji standard, ki sta pomembna za določanje količine oziroma koncentracije fluoridov.



gSlika 7: Kromatogram standardne fluoridne raztopine

5.2.2 MEJA ZAZNAVNOSTI (LOD) IN MEJA DOLOČLJIVOSTI (LOQ)

Določili smo ju na dva načina:

1. Vizualno iz kromatogramov, ki smo jih dobili z redčenjem fluoridne raztopine s koncentracijo 19 ng/mL. Meja zaznavnosti, pri kateri je bil kromatografski vrh za fluoride še viden, je bila 4,7 ng/mL. Meja določljivosti, torej najnižja koncentracija, ki jo je integrator še integriral, pa je bila 9,5 ng/mL.
2. Na podlagi razmerja signal:šum, kjer smo upoštevali kriterij za LOD 3:1 in za LOQ 10:1, je bila vrednost za LOD nekoliko nižja in sicer 2,4 ng/mL, za LOQ pa skoraj enaka vizualni oceni 9,5 ng/mL.

5.2.3 LINEARNOST

Površine kromatografskih vrhov smo izmerili desetim vodnim raztopinam in sicer z naslednjimi koncentracijami fluoridnih ionov: 9,5; 19; 38; 57; 76; 95; 114; 190; 285 in 380

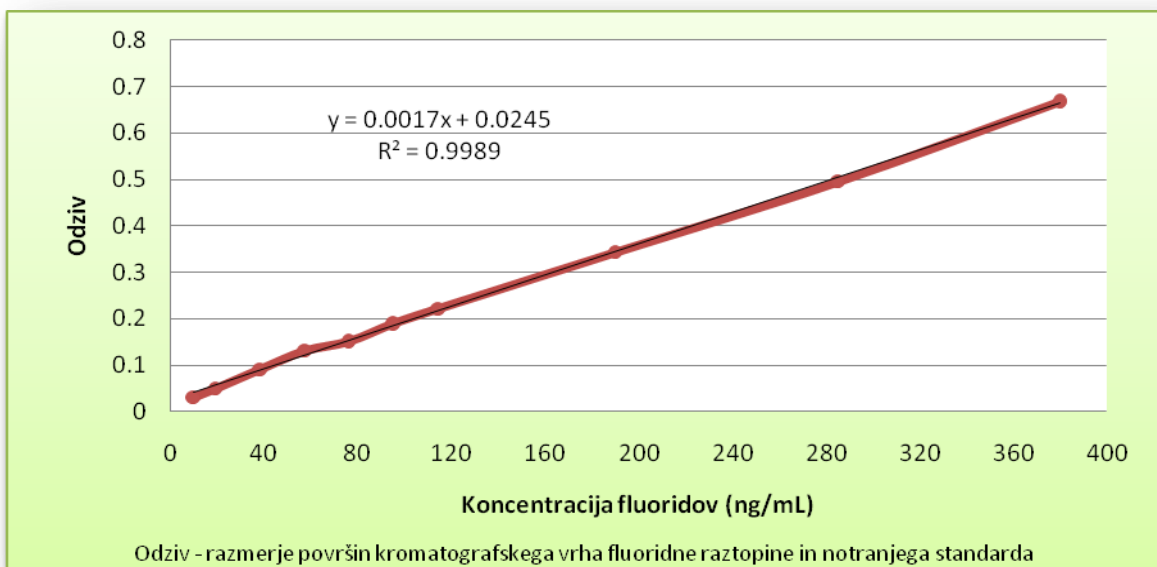
ng/mL. Dobljene vrednosti smo uporabili za pridobitev umeritvene premice, določitev enačbe umeritvene premice, korelacijskega koeficienta R^2 in za določitev linearnega območja metode. Pri grafičnem prikazu dobljenih rezultatov smo upoštevali, da so znane koncentracije standardnih raztopin predstavljale neodvisno spremenljivko (x), odzivi oz. razmerja površin vrhov vzorca in notranjega standarda pa odvisno spremenljivko (y). Odzive smo merili tri dni zaporedoma, kot kriterij za potrditev linearnosti metode v kontroliranem koncentracijskem območju smo upoštevali pogoj $R^2 \geq 0,99$. Rezultati so prikazani v preglednici III in na slikah 8,9 in 10 v obliki umeritvene premice ter s koeficientom korelacije (R^2).

Vrednosti korelacijskega koeficienta R^2 so višje kot 0,99 in potrjujejo linearno povezavo med koncentracijo fluoridov in velikostjo odziva (površina kromatografskega vrha). Na podlagi dobljenih rezultatov lahko trdimo, da je analizna metoda linearna v koncentracijskem območju med 9,5 in 380 ng/mL.

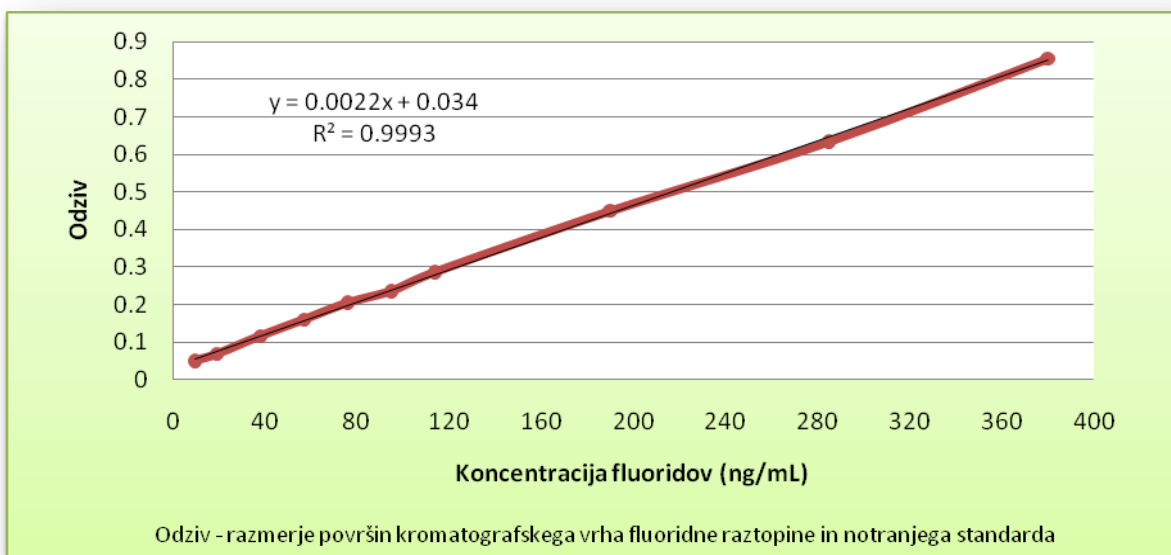
Preglednica III: Enačbe linearne regresije in R^2 za tri dni preizkusa linearnosti metode

	1.dan	2.dan	3.dan
Koncentracija (ng/mL)	Odziv	Odziv	Odziv
9,5	0,031000	0,039771	0,032078
19	0,049945	0,064605	0,051359
38	0,091323	0,093268	0,104400
57	0,130923	0,129098	0,130350
76	0,151544	0,164095	0,183895
95	0,190267	0,184705	0,217761
114	0,221913	0,217920	0,254925
190	0,343533	0,337314	0,393718
285	0,495233	0,509681	0,570100
380	0,668226	0,660413	0,768097
Enačba umeritvene premice	$y = 0,0168x + 0,0245$	$y = 0,0166x + 0,0302$	$y = 0,0195x + 0,024$
R^2	0,9989	0,9993	0,9987

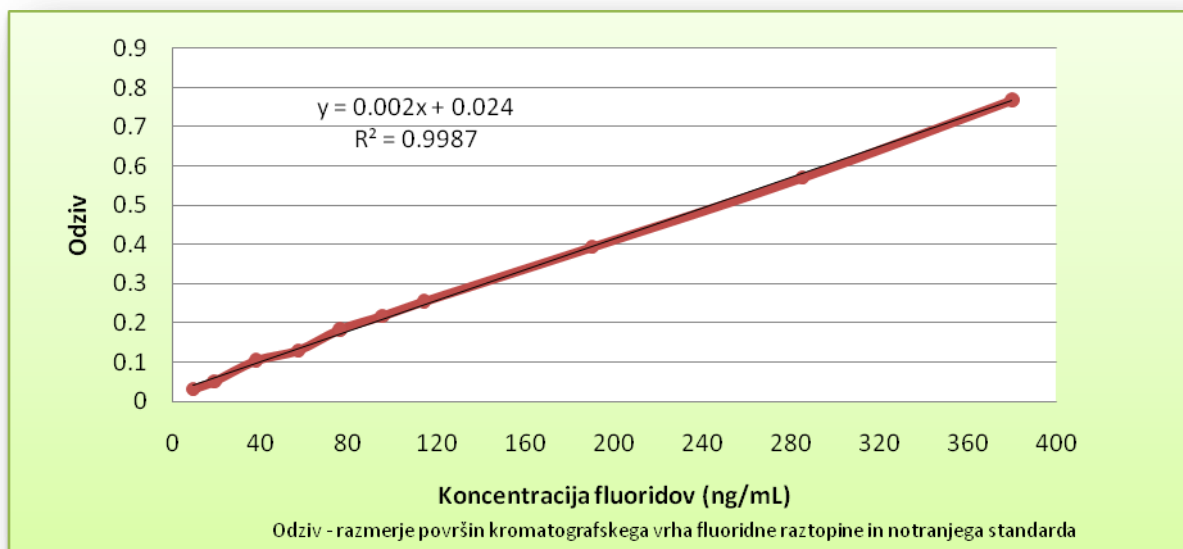
Odziv - razmerje površin kromatografskega vrha fluoridne raztopin in notranjega standarda



Slika 8: Prikaz odvisnosti odziva od koncentracije fluoridov (1.dan)



Slika 9: Prikaz odvisnosti odziva od koncentracije fluoridov (2.dan)



Slika 10: Prikaz odvisnosti odziva od koncentracije fluoridov (3.dan)

5.2.4 NATANČNOST IN TOČNOST

Standardne raztopine s koncentracijam 19, 146,5 in 285 ng/mL smo analizirali v šestih ponovitvah prvi dan (ponovitev znotraj dneva 1), v šestih ponovitvah drugi dan (ponovitev znotraj dneva 2) in tretji dan (ponovitev znotraj dneva 3). Za posamezen dan smo izračunali povprečno vrednost odzivov (\bar{x}), standardni odmik (SD) in relativni standardni odmik (RSD).

Za določitev ponovljivosti med dnevi smo izračunali povprečno vrednost odzivov v vseh treh dneh, kot tudi skupni standardni odmik (SD) in relativni standardni odmik (RSD) v treh dneh. Kriterij za natančnost, ki smo ga upoštevali, je RSD manj kot 15 % in v bližini meje zaznavnosti manj kot 20 %.

Točnost analizne metode smo tako kot natančnost preverjali z raztopino z nizko (19 ng/mL), srednjo (146,5 ng/mL) in visoko (285 ng/mL) koncentracijo fluoridov znotraj območja linearnosti. Računali smo odstotek ujemanja dobljene vrednosti iz umeritvene premice z dejansko koncentracijo fluoridov, ki naj bi bila v vzorcu in upoštevali, da je

metoda točna v primeru, ko relativna napaka (R_N) ne presega 15 %, v bližini meje zaznavnosti pa ne presega 20 %.

Naslednje tri preglednice (IV, V in VI) prikazujejo rezultate za točnost in natančnost (ponovljivost znotraj dneva in ponovljivost med dnevi) metode pri treh različnih raztopinah fluoridov: 19 ng/mL, 146,5 ng/mL in 285 ng/mL. Vrednost R_N in RSD za vse tri kontrolirane raztopine ne presegajo 15 oziroma 20 % pri LOD, kar pomeni, da analizni postopek ustreza kriterijem tako za točnost kot tudi za ponovljivost znotraj dneva in med dnevi.

Preglednica IV: Prikaz točnosti in natančnosti za 19 ng/mL fluoridno raztopino

19 ng/mL			
	1.dan	2.dan	3.dan
Enačba umeritvene premice in R^2	$y = 0,0195x + 0,024$ $R^2 = 0,9987$	$y = 0,0201x + 0,0266$ $R^2 = 0,9972$	$y = 0,0215x + 0,034$ $R^2 = 0,9993$
Odzivi	0,056950	0,061372	0,073688
	0,061438	0,060989	0,075690
	0,058736	0,055372	0,071414
	0,059725	0,067013	0,072593
	0,057421	0,058023	0,071180
	0,062134	0,054859	0,071212
$\bar{x} \pm SD$	0,059401±0,002102	0,059605±0,004536	0,072629±0,001793
RN (točnost)	4,45 %	12,54 %	5,26 %
RSD (ponovljivost znotraj dneva)	3,54 %	7,61 %	2,47 %
RSD (ponovljivost med dnevi)	10,94%		

Preglednica V: Prikaz točnosti in natančnosti za 146,5 ng/mL fluoridno raztopino

146,5 ng/mL			
	1.dan	2.dan	3.dan
Enačba umeritvene premice in R ²	y=0,0195x+0,024 R ² = 0,9987	y=0,0201x+0,0266 R ² = 0,9972	y= 0,0196x+0,0314 R ² = 0,9974
Odzivi	0.309385	0.315972	0.330032
	0.328986	0.309380	0.330067
	0.310754	0.333824	0.316451
	0.316094	0.328812	0.315400
	0.308801	0.321164	0.309881
	0.311266	0.302019	0.321485
$\bar{x} \pm SD$	0,314214±0,007682	0,318529±0,011912	0,320553±0,008228
RN (točnost)	1,57 %	0,89 %	0,61 %
RSD (ponovljivost znotraj dneva)	2,44 %	3,74 %	2,57 %
RSD (ponovljivost med dnevi)	2,93 %		

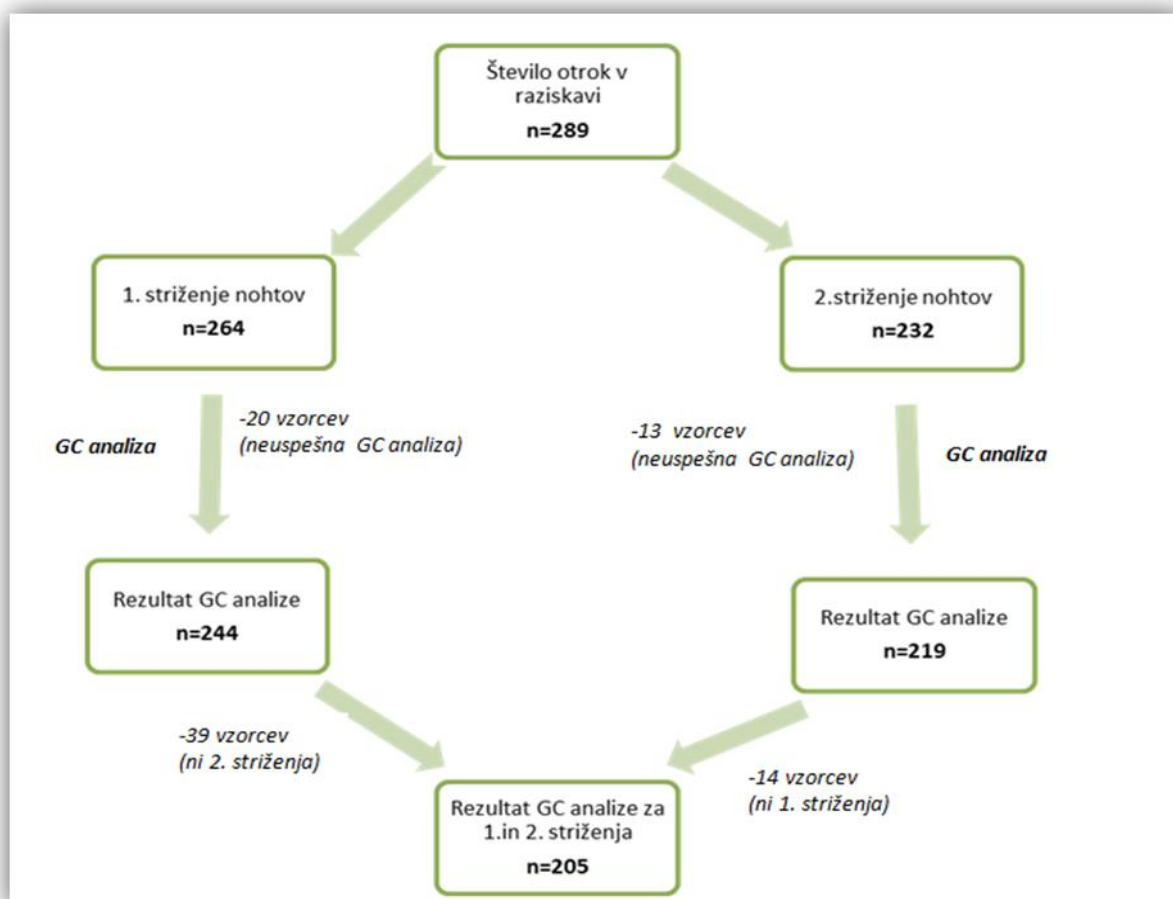
Preglednica VI: Prikaz točnosti in natančnosti za 285 ng/mL fluoridno raztopino

285 ng/mL			
	1.dan	2.dan	3.dan
Enačba umeritvene premice in R ²	y = 0,0201x + 0,0266 R ² = 0,9972	y = 0,0196x + 0,0314 R ² = 0,9974	y = 0,0215x + 0,034 R ² = 0,9993
Odzivi	0,610952	0,633671	0,680532
	0,618971	0,607346	0,672105
	0,568696	0,633905	0,645565
	0,571776	0,608671	0,685746
	0,566161	0,612844	0,688709
	0,617148	0,605821	0,698734
$\bar{x} \pm SD$	0,592284±0,025839	0,617043±0,013179	0,678565±0,018417
RN (točnost)	1,25 %	4,84 %	5,19 %
RSD (ponovljivost znotraj dneva)	4,36 %	2,14 %	2,71 %
RSD (ponovljivost med dnevi)	6,63 %		

5.3 REZULTATI BIOLOŠKIH VZORCEV

V raziskavi je bilo povabljenih 289 otrok. Na prvem zobozdravstvenem pregledu so 264 otrokom postrigli nohte (pred uporabo zobne paste). Od tega je bilo neuspešno GC analiziranih 20 vzorcev in smo dobili rezultate za 244 vzorcev. Po 6 do 10 mesečni uporabi zobne paste je prišlo na drugi zobozdravstveni pregled in na drugo striženje nohtov 232 otrok. Od tega je bilo neuspešno analiziranih 13 vzorcev, tako da smo dobili rezultate za 219 vzorcev.

39 otrok, ki so se udeležili prvega obiska, ni prišlo na drugi pregled in pri 14 otrocih smo dobili vzorce le pri drugem striženju nohtov. Pri 205 otrocih smo dobili vzorce pri prvem in pri drugem striženju, te vzorce oziroma rezultate smo statistično ovrednotili.



Slika 11: Številčni prikaz vzorcev in rezultatov HS-GC analize

- V skupini 205 otrok, ki so oddali vzorce nohtov pri prvem in drugem striženju nohtov, je bila povprečna teža nohtov 6,46 mg in se je gibala v območju med 0,77 in 18,45 mg. Koncentracija fluoridov (n=410) preračunana na težo nohtov je bila med 0,03 ng/mg in 5,14 ng/mg. Pri 15 vzorcih je bila vsebnost fluoridov pod mejo zaznavnosti analizne metode.
- Povprečna vsebnost fluorida v nohtih, dobljenih ob prvem striženju (n₁=205) (pred začetkom uporabe fluorirane zobne paste) je bila 0,60 ng/mg. Najnižja vrednost fluorida je bila 0,03 ng/mg. Pri 14 vzorcih je bila vsebnost fluorida pod mejo zaznavnosti metode. Najvišja vsebnost fluorida je bila 3,13 ng/mg.
- Povprečna vsebnost fluorida v vseh vzorcih, dobljenih ob drugem pregledu (n₂=205) (po uporabi fluorirane zobne paste) je bila 0,99 ng/mg. Najnižja zaznavna vsebnost fluorida v nohtih je bila 0,04 ng/mg. Pri enem vzorcu je bila vsebnost fluorida pod mejo zaznavnosti metode. Najvišja vsebnost fluorida je bila 5,14 ng/mg.
- Med 205 vzorci nohtov dobljenih ob drugem striženju je 95 otrok uporabljalo zobno pasto z vsebnostjo fluorida 500 ppm in preostalih 110 otrok je uporabljalo zobno pasto z vsebnostjo fluorida 1000 ppm. Pri otrocih, ki so uporabljali zobno pasto s 500 ppm, je bila vsebnost fluorida v nohtih $0,91 \pm 0,79$ ng/mg, vrednosti so se gibale med 0,05 in 5,14 ng/mg. Pri otrocih, ki so uporabljali zobno pasto z vsebnostjo fluorida 1000 ppm je bila povprečna vsebnost fluoridov $1,05 \pm 0,88$ ng/mg, vrednosti so se gibale med 0,04 in 5,10 ng/mg.
- Pri določanju koncentracije fluoridov v nohtih po prvem striženju (pred uporabo fluorirane zobne paste) je bila ta v večini primerov nižja v primerjavi z drugim striženjem (po uporabi fluorirane zobne paste). Vendar smo pri nekaj otrocih izmerili višje koncentracije fluoridov pri prvem striženju v primerjavi z drugim striženjem. Tako smo npr. pri prvem striženju določili naslednje koncentracije fluoridov: 3,13, 2,05, 1,90 in 1,81 ng/mg, za iste otroke pa pri drugem striženju 2,40, 0,81, 0,89 in 0,46 ng/mg.

Preglednica VII: Statistične vrednosti analize nohtov prvega in drugega striženja ter zobne paste s 500 ppm F⁻ in 1000 ppm F⁻

Statistične vrednosti (vsebnost fluorida)	1.striženje	2. striženje	Zobna pasta 500 ppm F ⁻	Zobna pasta 1000 ppm F ⁻
N	205	205	95	110
\bar{x} (ng F ⁻ /mg)	0,60	0,99	0,91	1,05
Mediana (ng F ⁻ /mg)	0,44	0,79	0,73	0,83
X _{min} - X _{max} (ng F ⁻ /mg)	0,03 – 3,13	0,04 – 5,14	0,05 – 5,14	0,04 – 5,10

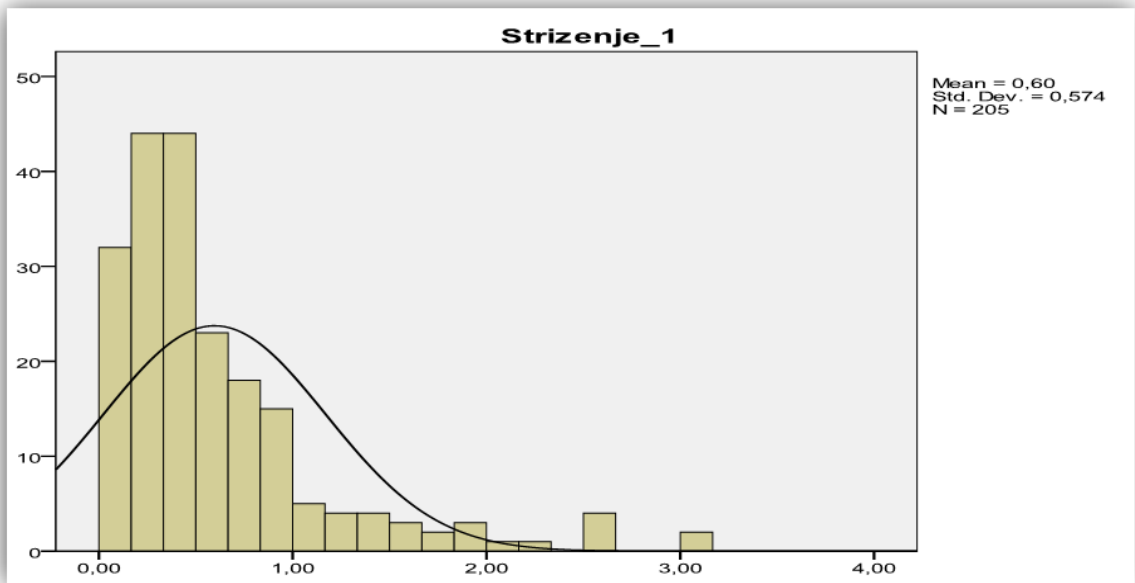
Iz dobljenih rezultatov smo želeli ugotoviti, če je vsebnost fluoridov v nohtih večja po uporabi fluorirane zobne paste. Primerjali smo vsebnost fluoridov v vzorcih ob prvem striženju (pred uporabo zobne paste) z vzorci dobljenim ob drugem striženju (po nekaj mesečni uporabi fluorirane zobne paste).

5.3.1 PORAZDELITEV KONCENTRACIJE FLUORIDOV V NOHTIH

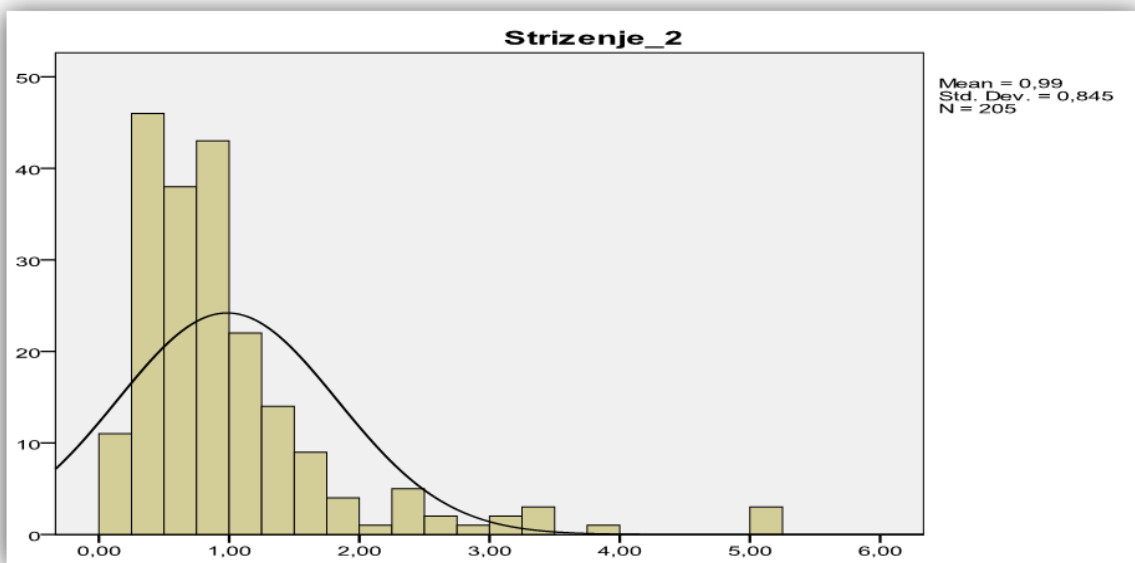
S Kolmogorov-Smirnovim testom smo ugotavljali, kako se porazdeljujejo dobljeni rezultati obeh striženj. Upoštevali smo stopnjo tveganja $\alpha = 0,01$. Glede na to, da je bila pri obeh striženjih vrednost $p < \alpha$, sprejmemo alternativno hipotezo, ki pravi, da se vzorci ne porazdeljujejo normalno. To je razvidno tudi iz grafičnega prikaza rezultatov (slika 12 in 13 ter preglednica VIII)

Preglednica VIII: Testiranje porazdelitve rezultatov vsebnosti fluorida v nohtih

Kolmogorov-Smirnov test			
	Statistika	Df	Sig (p)
Striženje 1	0,180	205	<0,001
Striženje 2	0,191	205	<0,001



Slika 12: Porazdelitev koncentracije fluoridov pred uporabo zobne paste



Slika 13: Porazdelitev koncentracije fluoridov po uporabi zobne paste

5.3.2 UGOTAVLJANJE RAZLIKE MED VSEBNOSTJO FLUORIDOV V NOHTIH PRVEGA IN DRUGEGA STRIŽENJA

Glede na to, da rezultati niso porazdeljeni normalno, smo statistično razliko med prvim in drugim striženjem dokazovali z Wilcoxonovim testom predznačenih rangov (dva odvisna vzorca, porazdelitev ni normalna). Za stopnjo tveganja α smo vzeli vrednost 0,01. Signifikanca (p) je bila $< 0,001$ in je manjša od stopnje tveganja α (preglednici IX in X). Sprejeli smo alternativno hipotezo, ki pravi, da obstaja razlika v vsebnosti fluorida v nohtih pred uporabo fluorirane zobne paste in po uporabi te.

Preglednica IX: Wilcoxonov test predznačenih rangov

		N	Srednji rang	Vsota rangov
Striženje 2 - Striženje 1	Neg. razlika	60 ^a	84,33	5060,00
	Poz. razlika	145 ^b	110,72	16055,00
	Ni razlike	0 ^c		
	Vsota	205		

^a Striženje 2 < Striženje 1; ^b Striženje 2 > Striženje 1; ^c Striženje 2 = Striženje 1

Preglednica X: Wilcoxonov test predznačenih rangov (sklepna statistika)

	Striženje 2 - Striženje 1
Z	- 6,465 ^a
Sig. (p)	<0,001

^a Temelji na negativni vsoti rangov

5.3.3 UGOTAVLJANJE VPLIVA ZOBNE PASTE Z RAZLIČNO VSEBNOSTJO FLUORIDOV NA KONCENTRACIJO FLUORIDOV V NOHTIH

Iz dobljenih rezultatov smo tudi ugotavljali, če se razlika koncentracij fluoridov v zobni pasti (500 ppm in 1000 ppm) za uporabo pri majhnih otrocih odraža tudi v vsebnosti

fluoridov v nohtih. Za dokazovanje statistične razlike smo uporabili Wilcoxonov test vsote rangov (dva neodvisna vzorca, rezultati niso normalno porazdeljeni) (preglednica XI).

Iz preglednice XII je razvidno, da je signifikanca večja od stopnje tveganja α (0,01). Zato smo privzeli ničelno hipotezo, da ni razlike v vsebnosti fluorida v nohtih otrok pri uporabi zobne paste 500 ppm in 1000 ppm.

Preglednica XI: Wilcoxonov test vsote rangov, za ugotavljanje razlike med zobnima pastama

Zobna pasta		N	Srednji rang	Vsota rangov
Konc.F ⁻ v nohtih	0	95	96,42	9159,50
	1	110	108,69	11955,50
	Vsota	205		

0...zobna pasta 500 ppm; 1...zobna pasta 1000 ppm

Preglednica XII: Sklepna statistika Wilcoxonovega testa

	Konc. F ⁻ v nohtih
Mann-Whithney U	4599,500
Wilcoxon W	9159,500
Z	-1,477
Sign. (p)	0,140

6 RAZPRAVA

Merjenje koncentracije fluoridov v nohtih je samo del večjega raziskovalnega projekta na Stomatološki kliniki v Ljubljani, kjer proučujejo vpliv fluoridov na dentalno zdravje. V sklopu projekta so ugotavljali tudi kako socialno - demografski dejavniki in navade bodočih staršev (starost, izobrazba, pogostnost umivanja zob, uporaba zobne nitke, vrsta zobne paste, kdaj imajo namen začeti umivati zobe otroku, mnenje o zobni pasti s fluoridi) v zvezi z vzdrževanjem lastnega ustnega zdravja vplivajo na količino paste, ki bi jo uporabili za ustno nego majhnega otroka. V raziskavo so bili vključeni otroci, katerih starši so obiskovali Šolo za starše na Ginekološki kliniki UKC Ljubljana.

Fluoridi imajo pozitiven učinek na zobe zaradi zmanjševanja nastanka kariesa. Vendar so raziskave pokazale, da je najpomembnejši lokalni (topikalni) učinek fluoridov na okolje v ustni votlini in da ni značilne povezave med prevalenco kariesa in vsebnostjo fluorida v sklenini. Glavni razlog antikariogenega učinka fluorirane vode in drugih fluoridnih preparatov je v vzdrževanju stalne prisotnosti fluoridov v ustni votlini po izrasti zob. S tem se zmanjša hitrost demineralizacije in spodbudi remineralizacija sklenine. Pripravki, ki so namenjeni lokalnemu delovanju in vsebujejo fluorid, so predvsem geli, premazi, ustne vode in zobne paste. Zelo primerna je zobna pasta, ki ob redni uporabi zagotavlja stalno prisotnost nizkih koncentracij fluoridov v ustni votlini. V literaturi je opisana povezava med višjo koncentracijo fluorida v zobni pasti in večjo učinkovitostjo nadzora kariesa. Tako naj zobne paste z vsebnostjo fluorida, ki je nižja od 500 ppm, ne bi imele antikariogenega učinka na zobe. Pomembna je tudi količina zobne paste, ki se nanese na zobno krtačo. Pri otrocih naj bi bila v velikosti graha. Uporaba zobne paste s fluoridom pri otrocih mora biti nadzorovana, saj ti veliko zobne paste pogoltnejo. Prevelik sistemski vnos fluoridov v času razvoja zob lahko povzroči motnjo mineralizacije sklenine ali dentalno fluorozo. Tveganje za nastanek fluoroze in njeno izrazitost je odvisno od količine zaužitih fluoridov - predvsem s pitno vodo, od razvojne stopnje zoba, trajanja izpostavljenosti in telesne teže otroka. Kronično izpostavljenost fluoridom lahko določamo z merjenjem koncentracije fluoridov v nohtih ali laseh. Objavljene raziskave kažejo, da vsebnost fluoridov v nohtih odraža izpostavljenost fluoridom predvsem iz pitne vode in hrane ter iz zobnih past (39,40,41).

IZBIRA ANALIZNE METODE IN IZOLACIJA FLUORIDOV IZ NOHTOV

V poglavju 1.5.2. smo opisali več možnih tehnik izolacije fluoridov iz nohtov, vendar je difuzija z HMDS najbolj pogosto uporabljena (16,17,18,19). Buzalaf in sodelavci so standardne raztopine fluorida pripravili po enakem difuzijskem postopku, kot smo ga opisali v poglavju 1.5.2.4. in merili koncentracijo fluoridov (15). Nato so enakim fluoridnim raztopinam določili koncentracijo fluoridov po nedifuzijskem postopku, uporabili so le enake raztopine (0,05 M NaOH, 0,20 M očetno kislino). Ugotovili, so da je koncentracija fluoridov v raztopini po difuzijskem in nedifuzijskem postopku enaka, kar je dokaz za popolno izolacijo fluoridnih ionov iz vzorca z difuzijskim postopkom (15). Raziskave še navajajo, da pred difuzijo ni potrebna nobena druga predpriprava nohtov npr. mletje, rezanje na manjše dele, ali upepelitev. Pri poskusu so nohte ene roke preiskovanca upepelili pri visoki temperaturi in nato pepel uporabili za nadaljnji difuzijski postopek. Fluoride iz nohtov druge roke so izolirali le z difuzijskim postopkom brez predhodne upepelitve. S primerjavo dobljenih rezultatov so ugotovili, da ni statističnih razlik v koncentraciji fluoridov v nohtih ene in druge roke (15,18). Prav tako velikost nohtov (rezanje na manjše dele) ne vpliva na končni rezultat difuzije s HMDS (18). Dolgotrajna izpostavljenost nohtov deionizirani vodi ne zniža koncentracijo fluoridov v nohtih. Zato lahko nohte pred analizo oziroma difuzijo čistimo z deionizirano vodo (15). Vse zgoraj našete ugotovitve so potrditev, da s HMDS difuzijo kvantitativno izoliramo vse fluore v nohtih (16,18). Zato smo se tudi mi odločili za izolacijo fluoridov iz nohtov z difuzijo z HMDS.

Za nadaljnjo kvantifikacijo fluoridov v biološkem materialu in nohtih (po HMDS difuziji) se v literaturi navaja predvsem fluoridna ISE. Tudi želja izvajalcev raziskovalnega projekta na Stomatološki kliniki v Ljubljani je bila, da bi določali koncentracijo fluoridov v otroških nohtih z ISE in sicer po postopku, ki ga navajata Buzalaf in Whitford v svojih člankih (17, 18, 42). Vendar je v literaturi zaslediti tudi primere določanja fluoridov v vzorcih z GC oziroma HS-GC (13,25,26). Ker smo imeli HS-GC aparat na razpolago, poleg tega je izvedba HMDS difuzije v kombinaciji z HS-GC metodo veliko hitrejša in enostavnejša, kot v primeru ISE, smo se odločili za kvantifikacijo fluoridov v nohtih z HS-GC metodo.

Podroben opis HMDS difuzije fluoridov iz nohtov, kot predpripravo vzorcev za nadaljnjo kvantifikacijo z ISE, je opisan v poglavju 1.5.2.4. Postopek smo tudi poskusili izvesti. V primeru analize z ISE bi postopek difuzije izvajali v Falcon 1007 plastičnih posodicah (petrijevkah). V pokrovu bi morali narediti odprtino, kar zahteva čas in seveda nekaj spretnosti. Skozi luknjico bi dodali HMDS nasičen s kislino in bi jo morali takoj zapreti, ker se difuzijski postopek začne takoj po dodatku difuzijskega reagenta in moramo preprečiti izgubo hlapnega TMFS. Za preprečitev izgube TMFS je potrebno pokrov posodice v celoti zapreti z vazelinom ali parafilmom. Pri tem je potrebna izredna natančnost oziroma previdnost, ker so na notranji strani pokrova kapljice NaOH, ki jih na pokrov petrijevke vežejo le sile povezane s površinsko napetostjo. Po končani difuziji je potrebno kapljice NaOH nevtralizirati z dodatkom kisline, združiti v eno kapljo in jo prenesti za nadaljnjo analizo z ISE (volumen je zelo majhen; 75 μL ali 100 μL). S HS-GC metodo, difuzija poteka direktno v vialah, v headspace vzorčevalniku. V HS vialo zatehtamo nohte, dodamo HMDS nakisan s kislino (1,5 M H_2SO_4) in notranji standard (etilmetil keton) ter vialo takoj zapremo. TMFS, ki nastaja v nadprostoru, določamo s plinsko kromatografijo. Če primerjamo obe izvedbi difuzijskega postopka, je razvidno, da je ta v primeru HS-GC metode veliko hitrejši in enostavnejši. Poleg tega je tudi možnost napak manjša. Z izbiro GC metode s tehniko nadprostora smo se prav tako izognili ekstrakciji z organskim topilom. Postopek direktne GC metode, ko vzorec direktno injiciramo na plinski kromatograf, namreč zahteva pred kvantifikacijo še dodaten korak in sicer, raztopino vzorca je po končani difuziji potrebno ekstrahirati z organskim topilom, nato pa se šele organska faza injicira na GC.

REAGENTI IN POGOJI DELA

Delovni reagent je vseboval raztopino H_2SO_4 in HMDS, obe kemikaliji sta potrebni za difuzijo fluoridov iz nohtov. Da smo se izognili dodatnem pipetiranju, smo delovnem reagentu dodali še notranji standard v obliki etilmetil ketona. Za etilmetil keton smo se odločili na osnovi poskusov oziroma posnetih kromatogramov, iz katerih je bilo razvidno, da omenjena spojina ne reagira s TMFS ali kakšno drugo spojino, poleg tega se eluira takoj za TMFS.

S temperaturnim programom smo dosegli, da sta se v prvih nekaj minutah eluirala iz kolone TMFS in notranji standard, v nadaljnjih minutah pa tudi HMDS oziroma njegov produkt hidrolize.

VPLIV STEKLA NA ANALIZNI POSTOPEK

Fluoridi reagirajo s steklom (SiO_2) v prisotnosti že majhne količine vode in pri tem nastaja silicijev tetrafluorid (SiF_4) (27). Omenjeno dejstvo smo lahko upoštevali pri pripravi in hranjenju standardnih fluoridnih raztopin (uporabili smo plastično embalažo). Pri HS-GC analizi pa nismo imeli druge izbire, kot uporabiti steklene vial, saj na tržišču nismo zasledili HS vial iz drugega materiala, zato smo precejšen del našega dela posvetili ovrednotenju izgube fluoridov z uporabo steklenih vial. Ugotovili smo, da reakcija fluoridov s steklom poteče in da so vzorci, ki so bili dalj časa v steklenih vialah imeli nižje odzive, pri sveže odpipetiranih vzorcih standardnih raztopin pa smo zaznali višji odziv. Ugotovitve smo upoštevali pri nadaljnjem delu. S sprotnim pipetiranjem vzorcev smo dosegli dovolj kratek čas vzorcev v viali, da je bila izguba fluoridov zaradi vpliv stekla na analizo minimalna, oziroma v okviru dovoljenih napak za točnost in natančnost znotraj dneva.

Pri iskanju rešitve omenjenega problema smo razmišljali tudi o uporabi polietilenskih vložkov, ki bi jih vložili v steklene HS vial, vendar na tržišču nismo zasledili takšnih dimenzij, ki ne bi motile analize s tehniko nadprostora. Proizvajalci, kot tudi dobavitelji HS vial, nam niso ponudili nobenih praktičnih rešitev.

OVREDNOTENJE HS-GC METODE

Preden smo določali fluoride v realnih vzorcih (nohtih), smo HS-GC metodo validirali. Metoda ni namenjena redni uporabi, zato smo se odločili za vrednotenje selektivnosti, meje zaznavnosti, meje določljivosti, linearnosti, natančnosti in točnosti (38).

Selektivnost je ključna pri postavitvi analizne metode, saj pri prekrivanju kromatografskih vrhov snovi iz reakcijske zmesi, zelene učinkovine ne moremo kvantitativno določiti. Iz posnetih kromatogramov je bilo razvidno, da so kromatografski vrhovi vseh eluentov dobro ločeni, prav tako je bilo razvidno, da se TMFS in etilmetil keton (notranji standard) eluirata prva iz kolone in sicer pri 2,07 min in pri 4,62 min. Meja zaznavnosti, pri kateri je

bil kromatografski vrh za fluoride še viden, je bila 4,7 ng/mL (0,0047 mg/L). Meja določljivosti je bila 9,5 ng/mL (0,0095 mg/L). Linearnost je bila potrjena v koncentracijskem območju od 9,5 do 380 ng/mL. Metoda je prav tako ustrezala postavljenim kriterijem za točnost, kot tudi za ponovljivost znotraj dneva in med dnevi.

DOLOČANJE KOLIČINE FLUORIDOV V NOHTIH

Po validaciji analizne metode smo še kvantitativno določili vsebnost fluoridov v otroških nohtih. Dokazano je namreč, da so fluoridi v nohtih privzeti predvsem iz systemskega obtoka preko rastne konice nohta in da dosežejo distalni del nohta približno po 3 mesecih (17,18). Zato je smiselna analiza nohtov vsaj tri mesece po spremembi (npr. začetek uporabe fluorirane zobne paste, spremembe pri vnosu s hrano, pitno vodo,...). V našem primeru je drugo striženje nohtov bilo izvajano po 6 do 10 mesecih.

Povprečna koncentracija fluorida v nohtih otrok se je po začetku uporabe fluoriranih zobnih past značilno povečala. Vendar smo zasledili tudi nekaj primerov, ko smo pri otrocih izmerili višje koncentracije fluoridov pri prvem striženju v primerjavi z drugim striženjem. Razlog bi lahko bil v nedoslednosti staršev pri umivanju zob otrok s fluorirano zobno pasto. Umivanje zob je lahko potekalo takoj po obroku, ki v tem starostnem obdobju temelji predvsem na mlečnih proizvodih, kateri vsebujejo kalcij, ki dokazano zmanjšuje absorpcijo fluoridov iz gastrointestinalnega trakta (3). Prav tako bi lahko prišlo do napak pri sami analizi nohtov, kar je težko dokazati ali zavreči, ker je v našem primeru šlo za otroške nohte, katerih je količina bila v večini primerov izredno majhna in nam ni omogočala delo v dvojniku oziroma paralelkah. Torej šlo je za enkratni vzorec, ki nam ni omogočal ponavljanje analize.

Koncentracija fluorida v vzorcih drugega striženja je bila v skupini, ki je uporabljala zobno pasto z vsebnostjo fluorida 1000 ppm, večja kot v skupini, ki je uporabljala zobno pasto s 500 ppm, vendar razlika ni bila statistično značilna. Z drugimi besedami: opazili smo statistično značilen vpliv uporabe zobne paste na obremenitev otrok s fluoridi, saj je večmesečna uporaba fluorirane zobne paste povzročila, da so bile vsebnosti fluoridov v nohtih statistično signifikantno višje kot pred uporabo zobne paste. Med skupinama, ki sta uporabljali zobno pasto z večjo vsebnostjo fluorida (1000 ppm) in skupino, ki je uporabljala zobno pasto z manjšo vsebnost fluorida (500 ppm), smo tudi opazili razliko, ki

je nakazovala različno obremenitev, vendar razlika med obema skupinama ni bila statistično značilna.

Povprečna vsebnost fluoridov v nohtih, ki smo jo določili, je bila nižja v primerjavi z drugimi raziskavami (41,42). V Braziliji, kjer so naredili največ tovrstnih raziskav pri otrocih, je v skupini otrok med 1 in 3 letom starosti povprečna koncentracija fluoridov v nohtih bila $3,11 \pm 1,14$; $2,22 \pm 1,46$ in $3,53 \pm 1,40 \mu\text{g F}^-/\text{g}$ (42). To bi lahko pripisali dejstvu, da pitna voda v Sloveniji ni fluorirana oziroma vsebuje malo fluoridov v primerjavi npr. z Brazilijo, kjer so delali podobne raziskave (4). Poleg tega so bili otroci, ki so sodelovali, nekoliko starejši, kot otroci, katerim smo mi določali vsebnost fluoridov v nohtih. Saj je vnos fluoridov pri starejših otrocih s hrano in vodo višji, hrana je bolj raznovrstna in lahko vključuje tudi ribe, ki so dodaten vir fluoridov. Poleg tega so brazilski otroci uporabljali zobno pasto z vsebnostjo fluorida med 1000 in 1500 ppm.

7 UGOTOVITVE

Za določanje vsebnosti fluoridov v nohtih otrok smo razvili in validirali plinsko kromatografsko metodo s tehniko nadprostora (HS-GC). Z izbranimi pogoji in reagenti smo dosegli linearnost metode v koncentracijskem območju med 9,5 in 380 ng/mL. Meja določljivosti (LOQ) je bila 9,5 ng/mL (0,0095 mg/L oziroma 0,01 ppm). Metoda je ustrezala tudi postavljenim kriterijem za točnost in natančnost (ponovljivost znotraj dneva in med dnevi).

Pri analizi bioloških vzorcev (nohtov) smo statistično potrdili večjo vsebnost fluoridov v nohtih otrok po 6 – 10 mesečni redni uporabi fluorirane zobne paste.

Pri statistični obdelavi podatkov nismo uspeli dokazati razlike v vsebnosti fluoridov v nohtih otrok, ki so uporabljali zobno pasto z vsebnostjo fluorida 500 ppm in med tistimi, ki so uporabljali zobno pasto z vsebnostjo fluorida 1000 ppm.

8 REFERENCE

1. Health Effects of Ingested Fluoride. Intake, Metabolism and Disposition of Fluoride. The National Academy of Sciences, 1993; 125-133. Dosegljivo na: http://www.nap.edu/openbook.php?record_id=2204&page=125 (avgust 2011)
2. International Programme on Chemical safety. Enviromental Health Criteria 36. Fluorine and fluorides, 1984; 1-95. Dosegljivo na: <http://inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc36.htm> (junij 2011)
3. Whitford GM. Intake and metabolism of fluoride. Adv Dent Res. 1994 Jun; 8(1): 5-14.
4. Vodovod Kanalizacija. Ljubljana: Javni holding Ljubljana; Lokalni vodovodni sistemi. Dosegljivo na: <http://www.jh-lj.si/index.php?p=3&k=372> (avgust 2011).
5. Fejerskov O, Ekstrand J, Burt BA, eds. Fluoride in dentistry. 2nd ed. Copenhagen: Munksgaard; 1996: 112-46.
6. Whelton HP, Ketley CE, McSweeney F, O Mullane DM. A review of fluorosis in the European Union: prevalence, risk factors and aesthetic issues. Community Dent Oral Epidemiol 2004; 32(1): 9-18.
7. Cochran JA, Ketley CE, Arnadottir IB, Fernandes B, Koletsi-Kounari H, Oila A-M, van Lovren C, Whelton HP, O Mullane DM. A comparison of the prevalence of fluorosis in 8-year-old children from seven european study sites using a standardized methodology. Community Dent Oral Epidemiol 2004; 32(1): 28-33.
8. Dhar V, Bhatnagar M. Physiology and toxicity of fluoride. Indian J Dent Res. 2009-Sep; 20(3): 350-5.
9. ten Cate JM, Featherstone JD. Mechanistic aspects of the interactions between fluoride and dental enamel. Crit Rev Oral Biol Med. 1991; 2(3): 283-96.
- 9A. Marquis RE, Clock SA, Mota-Meira M. Fluoride and organic weak acids as modulators of microbial physiology. FEMS Microbiol Rev. 2003 Jan; 26(5): 493-510.
10. Ellenhorn MJ. Ellenhorn's Medical Toxicology. Diagnosis and Treatment of Human Poising. Williams&Wilkins, A Waverly company. Second Edition. 2000; 1003-1005.

11. Bresjanac M, Rupnik M. Patofiziologija s temelji fiziologije, 3. popravljena in dopolnjena izdaja. Inštitut za patološko fiziologijo. Ljubljana, 2002: 153-158
12. Barbier O, Arreola-Mendoza L, Del Razo LM. Molecular mechanisms of fluoride toxicity. *Chem Biol Interact.* 2010 Nov 5; 188(2): 319-33.
13. Gupta SK, Gupta RC, Gupta AB. Is there a need of extra fluoride in children? *Indian Pediatr.* 2009 Sep; 46(9): 755-9.
14. Anthony C Moffat, M David Osselton, Brian Widdop. *Clarke's Analysis of Drugs and Poisons.* Pharmaceutical Press, Third Edition. 2000; 444-446.
15. Buzalaf MA, Fukushima R, Granjeiro JM, Cury J. Correlation between plasma and nail fluoride concentrations in rats given different levels of fluoride in water. *Fluoride.* 2002; 35(3): 185-191.
16. Czarnowski W, Krechniak J. Fluoride in the urine, hair, and nails of phosphate fertilizer workers. *Br J Ind Med.* 1990 May; 47(5): 349-51.
17. Whitford GM. Monitoring fluoride exposure with fingernail clippings. *Schweiz Monatsschr Zahnmed.* 2005;115(8): 685-9.
18. Whitford GM, Sampaio FC, Arneberg P, von der Fehr FR. Fingernail fluoride: A method for monitoring fluoride exposure. *Caries Res.* 1999 Nov-Dec; 33(6): 462-7.
19. Campbell AD. Determination of fluoride in various matrices. *Pure and Applied Chemistry.* 1987; 59(5): 695-702.
20. Glick D. *Methods of biochemical analysis: Determination of fluorine in biological materials.* John Wiley and Sons. Nov 1977: 93-203.
21. Dressler VL, Pozebon D, Flores E, Paniz J, Flores E. Potentiometric determination of fluoride in geological and biological samples following pyrohydrolytic decomposition. *Analytica Chimica Acta.* 2002: 117-123.
22. Wang Q, Makishima A, Nakamura E. Determination of fluorine and chlorine by pyrohydrolysis and ion chromatography: Comparison with alkaline fusion digestion and ion chromatography. *Geostandards and geoanalytical research.* 2010; 54: 175-183.

23. Noguchi Y, Maruta T, Yamane T, Kiba N. Differences of fluorine in cements determined by photometric methods after distillation and pyrolysis. *Analytical sciences*. 2008; 24: 673-675.
24. Taves DR. Determination of submicromolar concentrations of fluoride in biological samples. *Talanta*. 1968; 15:1015-1023.
25. Yuwono M, Ebel S. Determination of fluoride impurities in calcium ascorbate comparison of Gas Chromatography and Ion Selective Electrode Potentiometry. *Arch.Pharm.Pharm.Med.Chem*. 1997: 348-352.
26. Tashkov W, Benchev I, Rizov N, Kolarska A. Fluoride determination in fluorinated milk by headspace gas chromatography. *Chromatographia* 29 (11/12),1990 July: 544-546.
27. Rajković MB, Novaković ID. Determination of fluoride content in drinking water and tea infusions using fluoride ion selective electrode. *Jurnal of Agricultural Sciences*. 2007; 52(2):155-168.
28. NIOSH Manual of analytical methods. Fluoride in urine. Method 8308; Aug 1994. Dosegljivo na <http://www.cdc.gov/niosh/docs/2003-154/> (december 2011).
29. Yablotskii KV and Shekhovtsova TN. Enzymatic Determination of Anions. *Journal of Analytical Chemistry*. 2010; 65(7): 660-673.
30. Light T, Cappuccino C. Determination of fluoride in toothpaste using ion selective electrode. *Jurnal of Chemical Education*; 52(4), Apr 1975: 247-250.
31. NICO 2000. Technical specifications for fluoride ion selective electrode (ELIT 8221). Dosegljivo na: <http://www.nico2000.net/analytical/fluoride.htm> (januar 2012).
32. Skoog D, Holler J, Neiman T. Principles of instrumental analysis. Fifth edition, Harcourt Brace company; Orlando, 1998: 701- 722.
33. Koželj G. Posodobitev alkoholimetričnih preiskav na ISM v Ljubljani. Predstavitev kombinacije head-space vzorčevalnika in plinskega kromatografa. *Medicinski razgledi*, 1993; 32(4):151-157.
34. De Zeeuw RA, Franke JP, Machata G, Moller MR, Greafe A, Tiess D, Pflieger K, Geldmacher von Mallinckrodt M. Gas chromatographic retention indices of solvents

and other volatile substances for use in toxicological analysis. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, 1992: 1-19.

35. Brossok G, McTigue D, Kuthy R. The use of a colorimeter in analyzing the fluoride content of public well water. *Pediatric Dentistry*. 1987; 9 (3): 204-207.
36. EPA Methods. Method 340.1: Fluoride by Colorimetry. Official Name: Fluoride, Total (Colorimetric, SPADNS with Bellack Distillation). Method 340.3: Fluoride by Colorimetry. Official Name: Fluoride (Colorimetric, Automated Compexone). Dosegljivo na: <http://www.caslab.com/EPA-Methods/> (januar 2012).
37. ICH Harmonised tripartite guideline. Validation of analytical procedures: Text and methodology; Q2 (R1). Nov 2005.
38. Peters FT, Drummer OH, Musshoff F. Validation of new methods. *Forensic Sci Int*. 2007 Jan 17; 165(2-3): 216-24.
39. Fejerskov O, Thylstrup A, Larsen MJ. Rational Use of Fluorides in Caries Prevention. *Acta Odontol Scand* 1981; 39: 241-249.
40. Ellwood RP, Cury JA. How much toothpaste should a child under the age of 6 years use? *Eur Arch Paediatr Dent* 2009; 10: 168-74.
41. Rodrigues MHC, de Magalhaes Bastos JR, Buzalaf MAR. Fingernails and toenails as biomarkers of subchronic exposure to fluoride from dentifrice in 2-to 3-year-old children. *Caries Res* 2004; 38: 109-14.
42. de Almeida BS, da Silva Cardoso VE, Buzalaf MAR. Fluoride ingestion from toothpaste and diet in 1- to 3-year-old Brazilian children. *Community Dent Oral Epidemiol* 2007; 35: 53-63.