

5. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE FLÚOR EN MUESTRAS BIOLÓGICAS

ALFREDO RIGALLI,* RODOLFO C. PUCHE

Laboratorio de Biología Ósea y Metabolismo Mineral. Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Rosario.

Resumen

El control de un tratamiento con fluoruro requiere la medición de flúor en plasma y orina. La metodología más conveniente es la potenciometría. En tratamientos con NaF solo, existe anión fluoruro en plasma y orina, sin embargo en otros tratamientos como con monofluorofosfato sódico (MFP) puede existir flúor indetectable al electrodo y que sólo se libera por tratamiento con ácidos. En hueso es más complejo el sistema y puede existir flúor ligado que sólo se libera por incineración de la muestra. Se han desarrollado muchas técnicas para la medición de fluoremia, sin embargo no todas son confiables. La lectura directa con un electrodo sobre el plasma no es adecuada por la baja concentración y presencia de proteínas. La medida potenciométrica post-destilación de la muestra permite medir el fluoruro más el flúor ácido lábil, además de concentrar la muestra y aumentar la sensibilidad del electrodo. En orina la lectura de fluoruria puede hacerse directamente con el electrodo de ion específico. No se puede hablar de valores normales, sino de límites teniendo en cuenta la exposición de la población. En poblaciones no expuestas la fluoruria no excede habitualmente los 50 micromoles/día y la fluoremia es menor a 1 micromol/L.

Palabras clave: fluoruro, fluoremia, fluoruria, concentración.

ASSAY OF FLUORIDE CONCENTRATION IN BIOLOGICAL SAMPLES

Abstract

Measurement of fluorine concentration is a need in patients under treatment with fluorine containing compounds. Fluoride in plasma and urine is commonly measured in patients under fluorine treatment, and potentiometry is the most convenient methodology. When NaF is used as a medication, fluoride is the predominant chemical species in plasma and urine. However, during treatment with sodium monofluorophosphate (MFP), peptides and proteins with acid-labile fluorine are present in plasma, the electrode being insensitive to them. In bones, compounds may exist with acid-resistant fluorine, which is detected only after incineration. Several techniques have been developed for the

measurement of fluoremia, but not all of them produce real values. In plasma, electrode sensitivity is affected by low fluoride concentration and proteins. Potentiometry after distillation of fluoride and acid-labile fluorine produce trustworthy results. Direct potentiometry is applicable to urine because of the more simple chemical system. Expected levels of fluoride in plasma or urine depend on the exposure of population. For non-exposed people, fluoruria below 50 micromoles/day and fluoremia lower than 1 micromole/L are expected values.

Key words: fluoride, fluoremia, fluoruria, concentration.

INTRODUCCIÓN

El flúor se encuentra en la naturaleza en un único estado de oxidación; sin embargo, se lo puede encontrar formando desde enlaces con un alto porcentaje de carácter iónico hasta enlaces con un elevado carácter covalente. La población está expuesta a diferentes tipos de compuestos con flúor, tanto de fuentes naturales como artificiales (ver artículo 1).

La medición de flúor en muestras biológicas es un tema contradictorio, para el cual se han desarrollado muchas metodologías y técnicas. Prácticamente cada investigador que ha trabajado en el tema ha desarrollado su propia técnica y la aplicación en el laboratorio de análisis clínicos no se ha popularizado. Cuando se habla de medir flúor en una muestra biológica lo primero que se debe aclarar es qué tipo de compuestos de flúor se medirá. Para interpretar las diferentes técnicas y tomar la decisión sobre la metodología a aplicar es necesario conocer las formas más comunes en las que el flúor puede formar parte de distintos compuestos.

Diferentes formas de flúor

Las metodologías existentes se fundamentan en la reacción del fluoruro con algún compuesto o la detección de fluoruro mediante un electrodo de ion específico. Por lo tanto, cualquier especie de flúor que no se encuentre al estado de fluoruro, no será detectada por el electrodo y necesitará un procesamiento previo para su detección.

* Dirección postal: Cátedra de Química Biológica, Facultad de Ciencias Médicas. Santa Fe 3100, (2000) Rosario, SF, Argentina. Correo electrónico: arigalli@fmedic.unr.edu.ar



El flúor puede existir como:

1- Flúor iónico: se lo conoce como fluoruro (F^-). Forma parte de sales como el NaF y el CaF_2 . Aunque en las dos sales mencionadas el fluoruro es el anión presente, también se debe tener en cuenta que la disociación puede ser muy diferente. Mientras en una solución acuosa de NaF el electrodo medirá la concentración de fluoruro, en una solución de CaF_2 no lo hará por ser este compuesto muy poco disociado.

2- Flúor ácido-lábil (FAL) corresponde a flúor ligado a compuestos ya sea por enlace iónico o covalente pero que se desprende de la muestra como ácido fluorhídrico, por tratamiento con ácido fuerte. Por ejemplo el monofluorofosfato (MFP) no contiene fluoruro pero sí tiene flúor unido covalentemente que se hidroliza por ácido y se libera como ácido fluorhídrico.

3- Flúor ácido-resistente (FAR): en estos compuestos el flúor se encuentra unido a compuestos por enlace covalente, resistentes al tratamiento con ácidos fuertes. En general se refiere a compuestos donde el flúor está unido a carbonos, como por ejemplo el flurbiprofeno. En algunos casos este flúor puede ser liberado en el organismo por degradación de la molécula carbonada que lo contiene. Estos compuestos liberan el flúor por calcinación, generando NaF .

Utilizaremos la denominación FT (Flúor total) para representar la suma: $F^- + FAL + FAR$.

En general las técnicas utilizadas miden F^- (si únicamente utilizan potenciometría) o $F^- + FAL$ (si combinan el uso de destilación isotérmica y potenciometría). Rara vez se realizan mediciones de FAR y FT, en tal caso se requiere de calcinación, destilación y potenciometría directa.

Diferentes metodologías para medir flúor

La medición de flúor es una práctica frecuente en terapéutica y casos de intoxicación. Durante años se han desarrollado técnicas que pueden ser enmarcadas en tres tipos de metodología:

1- Colorimétrica: Esta metodología se fundamenta en la reacción del fluoruro con compuestos de zirconio cuyo producto presenta absorción de radiación electromagnética a una longitud de onda específica.¹

2- Potenciométrica: Esta metodología se fundamenta en la utilización de un electrodo de ion específico sensible al fluoruro.

La diferencia de potencial desarrollada por este electrodo y la concentración de fluoruro se ajustan por la ecuación de Nernst, la que permitirá calcular

la concentración de soluciones incógnitas utilizando soluciones de referencia adecuadas.

3- Cromatografía gaseosa: Aunque es una técnica de gran sensibilidad y especificidad, no es utilizada con frecuencia, debido a la necesidad de un equipo muy costoso y personal muy capacitado.²

Las metodologías descritas se pueden combinar con otras técnicas como son la destilación isotérmica y la calcinación, permitiendo la medición de FAL o FAR.

Destilación isotérmica

Pueden existir muchos interferentes que deben ser eliminados por destilación, como el ácido fluorsilícico¹ o el ácido fluorhídrico, ambos con características volátiles. Este proceso se lleva a cabo en medio ácido y libera de la muestra el F^- y el FAL. Por otra parte la destilación isotérmica (también conocida como difusión isotérmica) permite –además de concentrar el fluoruro de la muestra– aislarlo en un medio de fuerza iónica conocida. Se han diseñado diferentes sistemas para lograr la destilación en condiciones isotérmicas.

La técnica fue desarrollada por Taves³ y modificada por Whitford; utiliza una placa de Petri de material plástico, el hidróxido de sodio actúa como trampa del fluoruro. Como reactivo desplazante se utiliza ácido sulfúrico saturado en hexametildisiloxano, que acelera el tiempo de destilación a 24 horas. El procedimiento tiene una recuperación mayor al 99%. Hallsworth y col.⁷ diseñaron un dispositivo de destilación empleando tubos de polipropileno, utilizando $NaOH$ como trampa y ácido perclórico como desplazante. En nuestro laboratorio desarrollamos un dispositivo que cumple con el objetivo perseguido en la destilación isotérmica, en tubos Eppendorf de 1,5 mL (Figura 1). Por los pequeños volúmenes de muestra utilizados llamaremos a esta técnica microdestilación isotérmica la que abreviaremos como μDI .

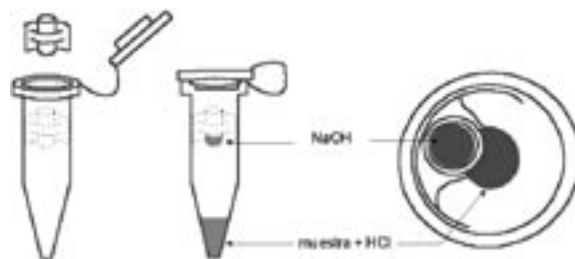


Figura 1: dispositivo para destilación isotérmica del flúor.

Por su amplia difusión nos concentraremos en los métodos potenciométricos.

Métodos potenciométricos

La concentración de fluoruro puede ser determinada mediante potencimetría directa utilizando un electrodo de ion específico. Este electrodo consta de un cristal de fluoruro de lantano que separa una solución de referencia de la solución en la que se desea determinar la concentración de fluoruro.⁶ La sensibilidad de este electrodo radica en la integridad del cristal del fluoruro de lantano, la presencia de la solución interna y del funcionamiento en posición vertical. Como se observa en la Fig. 2, la posición invertida produce discontinuidad del circuito. Existen algunos fabricantes de electrodos que proveen productos con capacidad de funcionamiento invertido pero son de menor vida útil. Este electrodo puede utilizarse sumergido en soluciones junto con un electrodo de referencia (macrotécnica) o bien, si el volumen utilizado es menor a 1 mL, se utilizan soportes adecuados para este fin (microtécnica).

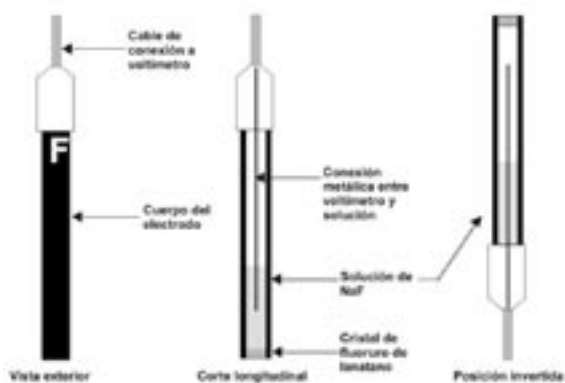


Figura 2: electrodo de ion específico sensible al fluoruro.

Al colocar este electrodo en contacto con una solución de fluoruro se produce una asimetría en la distribución de iones fluoruro a ambos lados que desarrolla un potencial, el cual puede medirse conectando el electrodo de fluoruro a un electrodo de referencia de Ag/AgCl. Se debe adicionar a las muestras un *buffer* (TISAB) que ajusta la fuerza iónica de las muestras, ajusta el pH para evitar las interferencias producidas por el ion oxhidrilo, y compleja cationes trivalentes. El potencial medido sigue la ecuación de Nernst en el rango de concentraciones 1 mol/L a 10^{-5} mol/L. Por debajo de esta última concentración la respuesta deja de ser lineal.

El límite de detección del electrodo es variable pero siempre es inferior a 1 micromol/L.

Este procedimiento requiere de al menos 1 mL de muestra con soportes adecuados, ó 5 mL si se trabaja con un recipiente convencional. Sin embargo, se han realizado intentos de maximizar la utilización del electrodo adaptándolo a muestras de volúmenes reducidos. Como paradigma de este aprovechamiento del electrodo se puede citar el trabajo de Hallsworth, desarrollado para la medición de muestras con flúor en matrices complejas como el hueso y diente.⁷ La técnica permite medir volúmenes de solución tan pequeños como 1 μ L y es confiable si la misma se lleva a cabo como mínimo por quintuplicado, con un error menor al 12%.

Medición de flúor en muestras biológicas

Tanto el tamaño como la complejidad de la muestra (matriz) determinan el tipo de técnica a aplicar. La Tabla 1 resume los principales casos.

Tabla 1: Tamaño de la muestra, concentración y técnica a aplicar para la medición de flúor.

Matriz	Tamaño muestra	[Flúor] μ mol/L	Técnica
simple	mayor de 1 mL	mayor de 0,45	macrotécnica potenciométrica
	menor de 1 mL	mayor de 0,45	microtécnica potenciométrica
	independiente	menor de 0,45	microtécnica potenciométrica con μ DI
compleja	independiente	independiente	microtécnica potenciométrico con μ DI

En el laboratorio clínico es común la medición de flúor en orina y en plasma de manera de controlar el tratamiento con algún compuesto que contenga flúor.



Conservación de las muestras

Las muestras acuosas pueden ser guardadas en heladera o a -20°C en recipientes de plástico. Las muestras sólidas como heces, huesos, uñas y dientes se pueden guardar temperatura ambiente, libres de humedad.⁸

Medición de flúor en orina

La orina es un fluido donde por lo general no existen concentraciones importantes de metales trivalentes que complejen el fluoruro. Por lo tanto, la medición potenciométrica de fluoruro puede llevarse a cabo ajustando el pH de la muestra y la fuerza iónica con el agregado de un 10% de un *buffer* que ajuste fuerza iónica y pH. El método utiliza un electrodo de ion específico y testigos de NaF diluidos en agua destilada.

Medición de flúor en plasma

Las concentraciones de fluoruro en plasma oscilan entre 0,5 y 1 $\mu\text{mol/L}$ para poblaciones no expuestas, mientras que para poblaciones expuestas se pueden encontrar valores de 2-10 μM , dependiendo este valor del volumen de distribución del fluoruro y de la función renal.

Por lo tanto, se pueden hacer mediciones aplicando μDI y posterior lectura con microtécnica potenciométrica, con lo cual se eliminan los problemas de las bajas concentraciones.

Medición de F⁻ y flúor ligado a proteínas en plasma

Esta técnica permite medir el flúor ligado a proteínas y el flúor difusible (compuestos con flúor que atraviesan membranas de diálisis). Por potenciometría con μDI del ultrafiltrado se mide el flúor iónico y el flúor ligado a compuestos de bajo peso molecular (dependiendo el corte de la membrana de ultrafiltración) y por microtécnica potenciométrica con μDI del plasma entero se mide el fluoruro, flúor ligado a compuestos de bajo peso molecular y flúor ligado a proteínas. Por diferencia entre ambas se mide el flúor ligado a proteínas.⁵ El flúor difusible corresponde al fluoruro de la muestra más el flúor unido a compuestos de bajo peso molecular, compuestos que pueden encontrarse por ejemplo en el tratamiento con MFP.

Determinación de flúor ácido lábil y flúor ácido resistente

La determinación de la concentración de compuestos con flúor, donde el flúor no es detectado por el electrodo, es un problema habitual en el laboratorio. Una muestra además de fluoruro (F⁻) puede

contener FAL y FAR.

Para su determinación se debe realizar destilación isotérmica de la muestra con ácido sulfúrico: tanto el FAL como el fluoruro se desprenderán como ácido fluorhídrico, obteniéndose la concentración de FAL y F⁻. La concentración de FAL se obtendrá por diferencia entre la concentración medida luego de destilación y la concentración medida por potenciometría directa (F⁻).

La determinación de FAR requiere un proceso de mineralización de la muestra, por ejemplo por calcinación, posterior solubilización y medición potenciométrica. Con este procedimiento se obtiene el valor de flúor total de la muestra. Si en una alícuota se mide FAL y en otra fluoruro, por diferencia entre el valor de flúor total y FAL más fluoruro se puede obtener el valor de FAR.

Determinación de monofluorofosfato

El monofluorofosfato de sodio (MFP, Na_2PFO_3) es una sal ampliamente utilizada en forma de comprimidos en el tratamiento de la osteoporosis y como aditivo en pastas dentífricas, para la prevención de caries dentales.⁹ El flúor se halla ligado al fosfato por un enlace covalente. Este enlace, a diferencia de los enlaces F-C es inestable y puede ser degradado por hidrólisis. El proceso se lleva a cabo por acción enzimática,¹⁰ por la acción de ácidos¹⁰ o espontáneamente.^{11,12}

Luego de una dosis de MFP, en el plasma existen dos fracciones de flúor: fluoruro y flúor ligado a proteínas por enlace ácido lábil.^{13,14} En el hueso de ratas tratadas con MFP se encuentra fluoruro, flúor ácido lábil y flúor ácido resistente.^{15,16} El estudio de la farmacocinética del monofluorofosfato ha planteado un desafío en lo que respecta a las técnicas de medición. La medición de MFP en soluciones se puede realizar potenciométricamente luego de la destilación del flúor, luego de la hidrólisis ácida del compuesto, o bien luego de la hidrólisis enzimática.

Medición de monofluorofosfato por hidrólisis enzimática

Esta técnica fue desarrollada para el estudio de la estabilidad y farmacocinética del MFP.¹⁷

La técnica es aplicable a soluciones acuosas o a muestras sólidas previa disolución en agua destilada. Una alícuota de la muestra acuosa se somete a la hidrólisis por la acción de la enzima fosfatasa alcalina intestinal de rata. Se realiza la medición potenciométrica de fluoruro en las muestras con

y sin tratamiento enzimático. La diferencia entre la concentración de fluoruro de la muestra tratada con fosfatasa alcalina intestinal y la alícuota sin tratar permite hallar la concentración de MFP en la muestra.

Medición de flúor en uñas

La medición de flúor en uñas se utiliza como medida de la exposición crónica al flúor.^{18,19} La medida potenciométrica luego de destilación isotérmica es de sencilla realización.⁸

Medición de flúor en esmalte dental

La obtención de muestra de esmalte dental se puede hacer por método de grabado, el que puede llevarse a cabo por inmersión (aplicable a piezas dentarias extraídas) o bien in vivo aplicando el método de ventana.⁶

Además de las técnicas mencionadas, aplicables a cada tipo de muestras, existen otras técnicas dentro de las metodologías nombradas, que se han desarrollado para la medición de flúor iónico. Una breve descripción de cada una de ellas se hace a continuación.

Determinación de flúor iónico por adsorción sobre fosfato de calcio

Este método se fundamenta en la adsorción del flúor iónico sobre un precipitado de fosfato de calcio,²⁰ quedando el flúor no iónico en el sobrenadante. Básicamente consiste en tratar una muestra con fosfato de calcio, luego de un período de tiempo se centrifuga y se descarta el sobrenadante. El sedimento (fosfato de calcio con fluoruro adsorbido) es disuelto en medio ácido, finalmente la solución se ajusta a pH 6 y se mide la concentración de fluoruro con el electrodo de ion específico o colorimétricamente.

Determinación adsorción-reposición

Este método se fundamenta en la adsorción del flúor iónico sobre un precipitado de fosfato de calcio y el posterior agregado de una solución estándar de fluoruro de sodio hasta restablecer la concentración inicial utilizando un electrodo de ion específico para controlar la concentración.

Determinación potenciométrica con patrones disueltos en suero

Este método se fundamenta en la determinación potenciométrica utilizando un electrodo de ion específico. La curva de calibración se prepara disolviendo NaF en suero o plasma de perro con bajo contenido de flúor. Fue desarrollado para utiliza-

ción en clínica²¹ por su mayor sencillez, siendo poco confiables los resultados obtenidos.⁵

Método automatizado

Este método se fundamenta en la determinación potenciométrica utilizando tecnología de automatización. La curva de calibración se prepara disolviendo NaF en suero con bajo contenido de flúor. Fue desarrollado con el fin de mejorar la relación número de muestras: tiempo empleado.²² Su principal desventaja es el sistema automático requerido y la insensibilidad del electrodo ante la presencia de proteínas.

Determinación potenciométrica directa con patrones acuosos

Este método se fundamenta en la determinación potenciométrica utilizando un electrodo de ion específico. La curva de calibración se prepara disolviendo NaF en agua. Fue desarrollada para medir flúor en plasma.²³ Según sus autores es de extrema sencillez y alta reproducibilidad, siendo el inconveniente la diferencia entre la matriz de los estándares de NaF y el plasma.

Determinación potenciométrica con adición-dilución

Este método se fundamenta en la determinación potenciométrica utilizando un electrodo de ion específico. No requiere curva de calibración y los parámetros del electrodo se obtienen por adición de una cantidad conocida de fluoruro a la muestra y posterior dilución de la solución. Fue desarrollada con el fin de proveer al laboratorio clínico de una técnica confiable y sencilla para medir flúor iónico en plasma.²⁴ Según sus autores es de extrema sencillez y confiable aunque requiere demasiado tiempo de estabilización. A las concentraciones halladas en plasma normalmente no ha demostrado ser un método reproducible.⁵

Determinación potenciométrica con adición

Este método se fundamenta en la determinación potenciométrica utilizando un electrodo de ion específico y adición de una cantidad de fluoruro conocido. No requiere curva de calibración y los parámetros del electrodo se calculan previamente, considerándose un dato invariante e independiente de las condiciones de la muestra. Fue desarrollada con el fin de proporcionar un método rápido y confiable para determinar el contenido de fluoruro en alimentos.²⁵ Es un método más sencillo que el propuesto por Fuchs y col.²⁴ Requiere instrumental de laboratorio sencillo además del voltímetro y el electrodo de fluoruro.



Medición de fluoruro con corrección de flúor basal

Es habitual suponer que los reactivos utilizados en la determinación de fluoruro están libres de fluoruro. Este método²⁶ propone una manera de descontar el fluoruro presente en el blanco. La técnica utiliza un electrodo de ion específico. La ventaja de esta técnica es que descuenta el fluoruro presente en los reactivos, extendiendo la linealidad de la curva de calibración hasta 0,26 $\mu\text{mol/L}$. La desventaja es que requiere un gran volumen de muestras y de patrones.

Referencias

1. Lamar W. *Industr Engin Chem (Am Ed)* 1945; 17: 148.
2. Butts WC. Derivatives of inorganic anions for gas chromatography. En: Blau K, King G, eds. *Handbook of derivatives for chromatography*. Philadelphia; Heyden, 1978. Pp 411-3.
3. Taves D. Separation of fluoride by rapid diffusion using hexamethyldisiloxane. *Talanta* 1968; 15: 969-74.
4. Whitford GM. Some characteristics of fluoride analysis with the electrode. En: Myier HM, ed. *The metabolism and toxicity of fluoride*, 2nd Ed. Basel; Karger, 1996. Pp 330-3.
5. Rigalli A, Alloatti R, Puche RC. Measurement of total and diffusible serum fluoride. *J Clin Lab Analysis* 1999; 13: 151-7.
6. Vogel GL, Chow LC, Brown WE. A microanalytical procedure for the determination of calcium, phosphate and fluoride in enamel biopsy samples. *Caries Res* 1983; 17: 23-31.
7. Hallsworth AS, Weatherell JA, Deutsch D. Determination of subnanogram amounts of fluoride with the fluoride electrode. *Anal. Chem* 1976; 48: 1660-4.
8. Buzalaf MA, Caroselli EE, Cardozo de Oliveira RC, et al. Nail and bone surface as biomarkers for acute fluoride exposure in rats. *J Anal Toxicol* 2004; 28: 249-52.
9. Stephen KW. Fluoride toothpastes, rinses, and tablets. *Adv Dent Res* 1994; 8: 185-9.
10. Setnikar I, Arigoni R. Chemical stability and mode of gastrointestinal absorption of sodium monofluorophosphate. *Arzneimittelforschung* 1988; 38: 45-9.
11. Rigalli A, Iglesias AM, Puche RC. Long term stability of sodium monofluorophosphate. *Drug Dev Ind Pharm* 1995; 21: 517-21.
12. Rigalli A, Ricci D, Puche RC. Instability of sodium monofluorophosphate in effervescent tablets. *Fluoride* 2006; 39: 19-22.
13. Rigalli A, Morosano M, Puche RC. Bioavailability of fluoride administered as sodium fluoride or sodium monofluorophosphate to humans. *Arzneimittelforschung* 1996; 46: 531-3.
14. Rigalli A, Pera L, Morosano M, Masoni A, et al. In postmenopausal osteoporosis the bone increasing effect of monofluorophosphate is not depending of serum fluoride. *Medicina (B Aires)* 1999; 59: 157-61.
15. Pera L; Rigalli A, Puche RC. Fluorine bound to non collagenous proteins in the bones of rats treated with monofluorophosphate (MFP) and sodium fluoride (NaF). *Bone* 1999; 24: 532 (abstract).
16. Pera L, Brun LR, Rigalli A, Puche RC. Identification of bone 2-macroglobulin (2M) related-proteins in rats treated with MFP. Its role in fluoride (F) bioavailability. *Biocell* 2003; 27: 234 (abstract) .
17. Rigalli A, Cabrerizo M, Beinlich A, Puche RC. Gastric and intestinal absorption of monofluorophosphate and fluoride in the rat. *Arzneimittelforschung* 1994; 44: 651-5.
18. Buzalaf MA, Fukushima R, Granjeiro JM, Cury JA. Correlation between plasma and nail fluoride concentrations in rats given different levels of fluoride in water. *Fluoride* 2002; 9: 185-92.
19. Whitford GM, Sampaio FC, Arneberg P, Von der Fehr FR. Fingernail fluoride: a method for monitoring fluoride exposure. *Caries Res* 1999; 33: 462-7.
20. Venkateswarlu P, Singer L, Armstrong WD. Determination of ionic (plus ionizable) fluoride in biological fluids. Procedure based on absorption of fluoride ion on calcium phosphate. *Anal Biochem* 1971; 42: 350-9.
21. Fry BW, Taves DR. Serum fluoride analysis with the fluoride electrode. *J Lab Clin Med* 1970; 75: 1020-5.
22. Cowell DC. Automated fluoride ion determination. Determination of serum fluoride ion levels. *Annals Clin Biochem* 1977; 14: 275-8.
23. Jardillier JC, Desmet G. Étude du fluor sérique et de ses combinaisons par une technique utilisant une électrode spécifique. *Clin Chim Acta* 1973; 47: 357-63.
24. Fuchs C, Dorn D, Fuchs CA, Henning HV, et al. Fluoride determination in plasma by ion selective electrodes: a simplified method for the clinical laboratory. *Clin Chim Acta* 1975; 60: 157-67.
25. Melton JR, Hoover WI, Ayers JL. Known addition procedure for determining fluoride in feeds with an ion-specific electrode. *JAOAC* 1973; 57: 508-10.
26. Villa AE. Rapid method for determining very low fluoride concentration using an ion selective electrode. *Analyst* 1988; 113: 1299-303.