

## STANOVENÍ JODU V BIOLOGICKÉM MATERIÁLU METODOU HPLC S ELEKTROCHEMICKÝM DETEKTOREM

ALENA HEJTMÁNKOVÁ<sup>a</sup>, MARIE VEJDOVÁ<sup>b</sup>  
a EVA TRNKOVÁ<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Katedra chemie, Česká zemědělská univerzita, Kamýcká 129, 165 21 Praha 6, <sup>b</sup> MILCOM a.s. – Výzkumný ústav mlékárenský, Ke Dvoru 12, 160 00 Praha 6  
Hejtmank@af.czu.cz

Došlo 3.8.04, přepracováno 29.4.05, přijato 31.5.05.

Klíčová slova: jod, HPLC, elektrochemický detektor, biologický materiál, mineralizace

### Úvod

Problematika stanovení jodu v biologickém materiálu je aktuální již od druhé poloviny minulého století, kdy začaly být řešeny problémy jodového deficitu zaváděním jodované soli do potravního řetězce. Průzkumy, které provedl Endokrinologický ústav v Praze začátkem 90. let 20. století však ukázaly, že až 50 % obyvatel ČR trpí různě závažným nedostatkem jodu v důsledku klesající spotřeby jodované soli<sup>1</sup>. V této souvislosti se do popředí opět dostává problematika stanovení tohoto důležitého mikroelementu. V České republice je ke stanovení jodu nejčastěji používána spektrofotometrická metoda<sup>2</sup> založená na Sandellových-Kolthoffových reakcích<sup>3</sup> po předchozí alkalické mineralizaci vzorku, optimalizované podle Fiedlerové<sup>4</sup>. Sandellovy-Kolthoffovy reakce využívá ke stanovení jodu v potravinách po modifikované kyselé mineralizaci vzorku<sup>5,6</sup> i Rudolfová<sup>7,8</sup>.

V roce 2001 Česká zemědělská a potravinářská inspekce (ČZPI) se sídlem v Brně úspěšně uspořádala mezilaboratorní validaci metody stanovení jodu v potravinách podle Sandella-Kolthoffa pro čtyři druhy poživatin<sup>9</sup>. Těto validace se účastnily i dvě laboratoře, jejichž výsledky byly vyloučeny ze souboru dat pro mezilaboratorní validaci, protože byly získány metodou principiálně odlišnou od validované. Přesto výsledky stanovení poskytnuté těmito metodami jsou v dobré shodě s výsledky validované metody.

Jednou z těchto metod je stanovení jodu v biologickém materiálu metodou iontově párové vysokoúčinné kapalinové chromatografie s elektrochemickou detekcí (HPLC-ED), která byla zavedena a ověřena ve Společné laboratoři České zemědělské univerzity a Výzkumného ústavu mlékárenského (ČZU-VÚM) na Fakultě

agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů ČZU v Praze. Testovaná metoda vychází z prozatímni technické normy mezinárodní mlékařské federace IDF-Standard 167:1994, jejíž předmětem je stanovení jodu v čerstvém mléce nebo v sušeném mléce po rekonstituci<sup>10</sup>. Po odstranění nerozpustných a vysokomolekulárních částic centrifugací a následně filtrací přes membránový filtr se vzorek mléka přímo dávkuje do kapalinového chromatografu. Vlastní stanovení je prováděno na koloně s reverzní fází Partisphere C-18, 5  $\mu\text{m}$ , 110  $\times$  4,7 mm nebo jejím ekvivalentem s mobilní fází – vodný roztok 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> obsahující 1,0 mM hexadecyltrimethylamonium-chlorid/acetonitril (68:32 v/v, pH 6,8; průtok mobilní fáze 2 ml min<sup>-1</sup>) – se zařazeným elektrochemickým detektorem (DC nebo pulsní amperometrický režim, pracovní elektroda Ag v rozsahu napětí 0–50 mV, referenční elektroda Ag/AgCl).

Kromě iontově párové HPLC lze z metod kapalinové chromatografie ke stanovení jodu v biologickém materiálu využít i iontově výměnnou HPLC s elektrochemickou<sup>11,12</sup> nebo spektrofotometrickou<sup>13,14</sup> detekcí. Iontově výměnnou vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií s elektrochemickou detekcí ke stanovení jodu v potravinách obecně popsali Kuwahira a Asai<sup>11</sup>. Před vlastním stanovením byl každý vzorek mineralizován přidávkou 4 M hydroxidu draselného a 25% dusičnanu draselného a spalován v muflové peci nejdříve při teplotě 100 °C a potom při teplotě 550 °C po dobu celkem 5 h. Mineralizát byl rozpuštěn v destilované vodě, rozpouštění bylo podpořeno umístěním zkumavky do ultrazvukové lázně. Vlastní stanovení bylo provedeno na koloně Shodex IC-524A (mobilní fáze: 100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> obsahující 5 mM ethylendiamin, průtok mobilní fáze 1,5 ml min<sup>-1</sup>) se zařazeným elektrochemickým detektorem (pracovní elektroda Ag, vložena napětí 60 mV, referenční elektroda Ag/AgCl).

Ve srovnání s validovanou metodou stanovení jodu podle Sandella-Kolthoffa při chromatografickém stanovení odpadá jodidy katalyzovaná reakce mezi arsenitanovými a ceričitými ionty, která vyžaduje vedle naprosto přesného dodržení reakčních podmínek i dokonale čisté sklo. K vlastní analýze se používá přímo naředěný mineralizát. Právě nedodržení reakčních podmínek v Sandellových-Kolthoffových reakcích je pravděpodobně příčinou poměrně častého neúspěchu při stanovení jodu validovanou metodou.

### Experimentální část

#### Materiál a metody

Použité chemikálie (KOH, ZnSO<sub>4</sub>, KClO<sub>3</sub>, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12 H<sub>2</sub>O) byly čistoty p.a. (Lachema, Brno), KI čistoty p.a., CH<sub>3</sub>CN čistoty gradient grade pro chromatografii LiChrosolv<sup>®</sup> (Merck, Darmstadt), CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>15</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>Cl (25% vodný roztok) (Sigma-Aldrich). Pro přípravu roztoků a mytí nádobí byla použita redestilovaná a demineralizovaná voda.

Vzorky biologického materiálu (referenční materiál, čerstvé mléko odebrané přímo na farmách, mléčné výrobky, maso a masné výrobky zakoupené v tržní síti) pro stanovení jodu byly podrobeny alkalickému tavení za přítomnosti KOH, ZnSO<sub>4</sub> a KClO<sub>3</sub> podle postupu Fiedlerové<sup>4</sup>. Vlastní stanovení jodu bylo prováděno na stavebnicovém kapalinovém chromatografu firmy Waters (vysokotlaké čerpadlo Waters 616, automatický dávkovač Waters 717) na koloně Nova-Pak C-18, 4 μm, 60 Å, 150 × 3,9 mm, při teplotě 30 °C. Mobilní fázi tvořil vodný roztok 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> obsahující 1,0 mM hexadecyltrimethylamoniumchlorid/acetonitril (68:32 v/v, pH 6,8; průtok mobilní fáze 1 ml min<sup>-1</sup>). Detekce byla prováděna pulsním elektrochemickým detektorem Waters 464 v DC režimu (na elektrody je vloženo konstantní stejnosměrné napětí 5 mV a měří se výsledný proud v závislosti na čase) s pracovní elektrodou Ag a referenční elektrodou Ag/AgCl).

## Výsledky a diskuse

Pro ověření správnosti popisované metody byly použity certifikované referenční materiály: sušené odstředěné mléko BCR 063R s certifikovaným obsahem jodu 0,81 ± 0,05 μg g<sup>-1</sup> sušiny a hovězí játra BCR 185 s indikativní hodnotou jodu 105 ng g<sup>-1</sup> sušiny. Výrobce obou referenčních materiálů je Community Bureau of Reference, Belgie. Výsledky experimentálního stanovení jodu v certifikovaných referenčních materiálech metodou HPLC jsou uvedeny v tabulce I.

V roce 2001 proběhla pod vedením ČZPI v Brně validace stanovení jodu v potravinách podle Sandella-Kolthoffa. Na obsah jodu byly analyzovány multivitaminový nápoj v prášku (vzorek A), instantní černý čaj (vzorek B), instantní směs pro ochucení mléka (vzorek C) a bylinková sůl obohacená jodem (vzorek D). Všechny vzorky byly souběžně analyzovány i vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií s elektrochemickou detekcí, ale

výsledky nebyly zahrnuty do souboru dat pro mezilaboratorní validaci testované metody, protože byly získány principiálně odlišnou metodou. Validace metody se účastnilo jen velmi málo laboratoří (8), což ukazuje na obtížnost validovaného stanovení, a proto z hlediska matematické statistiky není soubor primárních dat dostatečně reprezentativní. Přesto lze na základě porovnání výsledků analýzy obsahu jodu ve vzorcích A–D metodou HPLC s elektrochemickou detekcí s výsledkem statistického zpracování dat, získaných při mezilaboratorní validaci metody podle Sandella-Kolthoffa (viz Tab. II), chromatografické stanovení jodu s elektrochemickou detekcí považovat za vyhovující metodu pro stanovení jodu. Výsledky analýzy HPLC vzorků C a D se plně shodují s výsledky validované metody a analýzu HPLC vzorků A a B lze vzhledem k velkému rozpětí výsledků validované metody a malému počtu analýz rovněž považovat za uspokojivou. Vzhledem k výše uvedeným výhodám lze iontově párovou vysokoúčinnou chromatografií s elektrochemickou detekcí navr-

Tabulka I  
Stanovení jodu v referenčním materiálu

Parametr	Hodnota	
	BCR 063	BCR 185
Počet analýz	15	10
Jednotky	μg g <sup>-1</sup>	ng g <sup>-1</sup>
Certifikovaná hodnota či indikativní* hodnota	0,81	105*
Nejistota	0,05	–
Rozsah experimentálních hodnot	0,761–0,845	93–107
Průměr	0,814	101
Relativní směrodatná odchylka, %	4,49	8,74

Tabulka II  
Výsledky mezilaboratorní validace metody stanovení jodu podle Sandella-Kolthoffa

Statistické parametry	Vzorek A	Vzorek B	Vzorek C	Vzorek D
Počet laboratoří zahrnutých do výpočtu	6	8	7	6
Počet odlehlých laboratoří	2	0	1	2
Průměr, mg kg <sup>-1</sup>	41,33	27,77	48,02	9,75
Směrodatná odchylka opakovatelnosti, mg kg <sup>-1</sup>	0,807	1,423	1,019	0,638
Relativní směrodatná odchylka opakovatelnosti, %	1,95	5,12	2,12	6,55
Směrodatná odchylka reprodukovatelnosti, mg kg <sup>-1</sup>	2,667	4,576	4,976	1,610
Relativní směrodatná odchylka reprodukovatelnosti, %	6,45	16,48	10,36	16,50
Rozsah, mg kg <sup>-1</sup>	37,60–45,51	21,47–37,49	41,35–55,10	8,15–12,22
Průměr stanovení metodou HPLC, mg kg <sup>-1</sup>	47,66	19,67	51,66	10,30
Směrodatná odchylka opakovatelnosti, mg kg <sup>-1</sup>	0,07	0,11	0,21	1,62
Relativní směrodatná odchylka opakovatelnosti, %	0,14	0,56	0,41	15,73

Tabulka III  
Obsah jodu ve vybraných potravinách živočišného původu

Výrobek	Obsah jodu <sup>a</sup> [ $\mu\text{g kg}^{-1}$ ]	Průměr [ $\mu\text{g kg}^{-1}$ ]	$S_R$ <sup>b</sup> [%]
Mléko čerstvé (7 farem ČR)	53 – 605	242	11,0
Trojské mléko	117 – 229	176	9,4
Jogurt	177 – 341	266	9,3
Měkký tvaroh	338 – 443	403	4,5
Tvrký tvaroh	390 – 891	576	12,3
Tavený sýr Maratonec	133 – 282	204	17,3
Sýr eidamského typu Želetavské plátky	284 – 488	391	11,8
Balkánský sýr	173 – 271	202	5,7
Vepřová kýta	105 – 171	130	12,1
Vepřová plec	80 – 153	106	12,0
Vepřová játra	107 – 182	158	17,9
Vepřové srdce	99 – 169	132	13,2
Vepřová ledvina	82 – 206	138	16,2
Hovězí kýta	69 – 160	112	17,5
Hovězí plec	65 – 170	112	11,9
Hovězí játra	50 – 182	114	13,1
Kuřecí prsa	< MD	< MD	–
Kuřecí srdce	163 – 245	191	15,2
Kuřecí játra	62 – 265	144	13,2
Aljašská treska	124 – 243	193	4,7
File	608 – 725	656	9,4
Pstruh	408 – 531	479	13,3
Kapr	230 – 358	302	13,6
Losos libový	320 – 500	427	14,1
Losos tučný	657 – 819	719	12,0
Lososová paštika	193 – 318	272	16,3
Rybičky v konzervě – Jadran	282 – 363	320	12,7
Špekáček	64 – 71	68	5,5
Šunka drůbeží	437 – 464	448	3,2
Salám Vysočina	52 – 58	55	6,9
Salám šunkový	53 – 69	59	14,6

<sup>a</sup> Mez detekce (MD) = 54  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ; <sup>b</sup>  $S_R$  – relativní směrodatná odchylka opakovatelnosti

nout jako metodu alternativní ke klasickému stanovení jodu s využitím Sandellovy-Kolthoffovy reakce.

Mez detekce byla vyhodnocena z kalibrační závislosti sestavené v rozsahu 1–105 ng jodu v 1 ml kalibračního roztoku standardním statistickým postupem v programu Excel<sup>15</sup>. Rovnice regresní přímky závislosti odezvy detektoru  $D$  [mV s] na koncentraci jodu v roztoku [ $\text{ng ml}^{-1}$ ] má tvar  $D = 12541c$  a koeficient determinace  $R^2 = 0,9965$ .

Mez detekce je 4,55 ng jodu v 1 ml mineralizátu, lineární dynamický rozsah je 0–250  $\text{ng ml}^{-1}$ .

Ověřenou metodou iontově párové HPLC s elektrochemickou detekcí byly v průběhu let 2000–2003 opakovaně stanoveny obsahy jodu ve vybraných vzorcích masa, mléka a masných a mléčných výrobců. Jednotlivé vzorky byly analyzovány ve třech paralelních opakováních s průměrnou relativní směrodatnou odchylkou 11,7 %. Rozmezí stanovených hladin jodu v analyzovaných vzorcích potravin udává tabulka III.

## Závěr

Správnost stanovení jodu v biologickém materiálu vysokoučinnou kapalinovou chromatografií s elektrochemickou detekcí po alkalické mineralizaci vzorku byla ověřena analýzou referenčních materiálů a dobrou shodou výsledků stanovení jodu ve čtyřech vzorcích poživatin testovanou metodou. Paralelní výsledky byly získány v rámci mezilaboratorní validace metody stanovení jodu v potravinách podle Sandella-Kolthoffa. Metoda je vhodná pro mineralizáty s obsahem jodu nejméně 4,55 ng v 1 ml mineralizátu. Metodou HPLC-ED byl stanoven obsah jodu v různých potravinách živočišného původu.

*Autoři děkují Grantové agentuře MŠMT za finanční podporu (výzkumné záměry MSM 4121 00003 a MSM 6046070901) při řešení uvedené problematiky.*

## LITERATURA

1. Řehůřková I., Ruprich J., Borkovcová I., Müllerová I.: *Mikroelementy '98: Sborník přednášek XXXII. Semináře o metodice stanovení a významu stopových prvků v biologickém materiálu, Řež u Prahy 2.–4.9. 1998*, (Helán J., ed.) str. 95. 2 THETA, Český Těšín 1998.
2. Bednář J., Röhling S., Vohnout S.: *Česk. Farm.* 56, 1426 (1964).
3. Sandell E. B., Kolthoff I. M.: *J. Am. Chem. Soc.* 56, 1426 (1934).
4. Fiedlerová V.: *Czech J. Food Sci.* 16, 163 (1998).
5. Tušl J.: *Chem. Listy* 70, 533 (1976).
6. Wiechen A., Kock B.: *Fresenius Z. Anal. Chem.* 319, 569 (1984).
7. Rudolfová J., Čurda L., Koplík R.: *Chem. Listy* 95, 642 (2001).
8. Rudolfová J., Čurda L., Koplík R.: *Mikroelementy 2000: Sborník přednášek XXXIV. Semináře o metodice*

*stanovení a významu stopových prvků v biologickém materiálu, Zámek Liblice 5.–7.9. 2000*, (Helán J., ed.) str. 73. 2 THETA, Český Těšín 2000.

9. Zpráva z mezilaboratorní validace metody stanovení jodu v potravinách. Krajský inspektorát ČZPI v Brně, Brno 2001.
10. IDF Standard 167:1994 – Milk and dried milk–determination of iodide content – high-performance liquid chromatographic method. /www.fil-idf.org/
11. Kuwahira H., Asai, Y.: *J. Food Hyg. Soc. Jpn.* 35, 253 (1994).
12. Chadha R. K., Lawrence J. F.: *J. Chromatogr.* 518, 268 (1990).
13. Hurst W. J., Snyder K. P., Martin R. A. Jr.: *J. Liq. Chromatogr.* 6, 2067 (1983).
14. Schwehr K. A., Santschi P. H.: *Anal. Chim. Acta* 482, 59 (2003).
15. Meloun M., Militký J.: *Statistické zpracování experimentálních dat*. Plus, Praha 1994.

**A. Hejtmánková<sup>a</sup>, M. Vejdová<sup>b</sup>, and E. Trnková<sup>a</sup>**  
<sup>a</sup>*Department of Chemistry, University of Agriculture, Prague,* <sup>b</sup>*Dairy Research Institute, Prague):* **Determination of Iodine in Biological Samples by High-Performance Liquid Chromatography with Electrochemical Detection**

The accuracy of iodine determination in biological samples by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection (HPLC-ED), after preliminary alkaline dry ashing, was verified by analysis of reference materials as well as by good agreement with the results obtained in interlaboratory validation of a spectrophotometric method based on the Sandell-Kolthoff reaction. The HPLC method is suitable for mineralizates containing not less than 4.55 ng I/ ml. The method was used for determination of iodine in milk and meat as well as in milk and meat products.