

OPTIMALIZACE FOTOMETRICKÉ METODY STANOVENÍ JODU V POTRAVINÁCH

JANA RUDOLFOVÁ^a, LADISLAV ČURDA^a
a RICHARD KOPLÍK^b

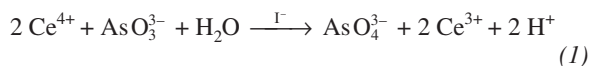
^aÚstav technologie mléka a tuků, ^bÚstav chemie a analýzy potravin, Vysoká škola chemicko-technologická, Technická 5, 166 28 Praha 6, e-mail: jana.rudolfova@vscht.cz

Došlo dne 2.VII.2001

Klíčová slova: jod, spektrofotometrie, mléko, Sandellova-Kolthoffova reakce

Úvod

Problematika stanovení jodu v biologickém materiálu je aktuální již od 50. let, kdy se začaly řešit problémy jodového deficitu fortifikací kuchyňské soli jodidem draselným a v popředí zájmu bylo zjištění obsahu jodu vázaného na bílkoviny v krevním séru¹. V té době již byla známa metoda založená na Sandellově-Kolthoffově reakci (I), která využívá k nepřímému stanovení katalyticky účinného jodidu spektrofotometrické měření poklesu intenzity žlutého zbarvení v důsledku koncentračního úbytku ceričitých iontů.



Tento princip stanovení se v různých modifikacích používá dodnes. Běžnější jsou postupy, u nichž se reakce po určité době ukončí přidáním činidla, které zredukuje dosud nezreagované ceričité ionty a vyvolá spektrofotometricky měřitelné zbarvení. Nejčastěji se používá brucin² (vznikají načervenalé chinoidní formy) nebo železnatá sůl a následně thiokyanatan³ (vzniká červený komplex $[\text{Fe}(\text{SCN})_n]^{3-n}$).

Vlastnímu stanovení jodu v biologických materiálech musí předcházet mineralizace. V případě mineralizace na suché cestě s použitím alkalických činidel byly testovány možnosti použití hydrogenuhličitanu sodného¹, hydroxidu draselného⁴⁻⁶, uhličitanu sodného spolu se síranem zinečnatým³ a síranu zinečnatého spolu s hydroxidem draselným a několika krystalky chlorečnanu draselného². Z různých způsobů mineralizace kyselinami byly používány rozklady chromsírovou směsí¹, směsí kyseliny chloristé, sírové a dusičné^{4,7} či manganistanem draselným v kyselém prostředí¹. V České republice byl optimalizován postup podle Bednáře² s alkalickou mineralizací a použitím brucinu k ukončení katalyzované reakce⁸. Z důvodu eliminace jedovatého brucinu byl na našem pracovišti optimalizován postup podle Tušla³, který používá k ukončení reakce železnatou sůl v kombinaci s thiokyanatanem, a stanovení předchází kyselá mineralizace podle Wiechena a Kocka⁷. Mineralizace kyselinami je méně riziková z hlediska kontaminace než mineralizace alkalická. Je však náročnější z hlediska bezpečnosti práce, protože se využívá prudkého oxidačního účinku kyseliny chloristé. Během kyselá mineralizace

dojde k oxidaci všech forem jodu ve vzorku na kyselinu jodičnou. Prvním krokem stanovení je pak redukce kyseliny jodičné na jodid, který má katalytickou aktivitu v reakci mezi arsenitanovými a ceričitými ionty. K tomu se využije část přítomných arsenitanových iontů; proto musí být v reakční směsi v nadbytku.

Experimentální část

Materiál a metody

Kyseliny o čistotě p.p. (HClO_4 – 70 %, H_2SO_4 – 95–97 %, HNO_3 – 65 %), používané k rozkladu vzorků, byly zakoupeny u firmy Analytika (ČR), $(\text{NH}_4)_4\text{Ce}(\text{SO}_4)_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ (99,0 %) a As_2O_3 (99,5 %) o čistotě p.a. u firmy Merck (Německo). Ostatní chemikálie byly o čistotě p.a. (Penta Chrudim, ČR). Pro přípravu roztoků a mytí nádobí byla používána demineralizovaná voda. Před začátkem práce bylo nejprve všechno skleněné nádobí dekontaminováno⁷ vymytím 10% roztokem peroxodisíranu amonného v 96% kyselině sírové, důkladně opláchnuto demineralizovanou vodou a vysušeno v horkovzdušné sušárně při 110 °C.

Pro ověřování správnosti optimalizované metody byl použit standardní referenční materiál sušeného odstředěného mléka CRM 063R (Community Bureau of Reference, Belgie) s certifikovaným obsahem jodu $810 \pm 50 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ sušiny. Pro zjišťování vlivu mineralizace na spolehlivost výsledků bylo použito obnovené (10 hm.%) odstředěné mléko (JČM, závod Strakonice, ČR).

Do tenkostěnných zkumavek o objemu 40 ml se naváží vzorky (0,2 g v přepočtu na sušinu), v případě kalibrační řady se napipetují 2 ml standardního roztoku KIO_3 (koncentrace jodu 25–250 $\text{ng} \cdot \text{ml}^{-1}$), resp. 2 ml vody v případě slepého pokusu, a přidá se 9 ml mineralizační směsi kyselin (72 obj.% H_2SO_4 , 17 obj.% HClO_4 a 11 obj.% HNO_3). Do zkumavek se vloží nálevky o průměru 5 cm. Rozklad probíhá v bloku Digestion System 20 – Digester 1015 (Tecator, Švédsko) a je řízen programovaným nárůstem teploty během 3,5 h až na 200 °C s prodlevou 4 h při této teplotě (Autostep Controller 1012, Tecator, Švédsko). Po vychladnutí a probublání mineralizátů dusíkem se roztoky kvantitativně převedou do 25 ml odměrných baněk a doplní vodou po značku.

Ke stanovení se odebírají 2 ml zředěného mineralizátu, přidá se směsný arsenitanový roztok [75 ml vody + 50 ml 20 % NaCl + 25 ml roztoku arsenitanu ($0,495 \text{ g As}_2\text{O}_3 + 0,4 \text{ g NaOH}$ ve 100 ml roztoku) + 250 ml roztoku H_2SO_4 o koncentraci 4 $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$] a po důkladném promíchání se reakce zahájí přidáním roztoku ceričité soli (1,34 g $(\text{NH}_4)_4\text{Ce}(\text{SO}_4)_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ ve 100 ml roztoku). Zkumavka se vloží do vodní lázně o dané teplotě a průběh reakce je zastaven po určité době přidáním roztoku železnaté soli (1,5 g $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ ve 100 ml roztoku) a roztoku thiokyanatanu (4 g KSCN ve 100 ml roztoku). Dávkované objemy roztoku železnaté soli a thiokyanatanu byly v jednotlivých variantách provedení vždy shodné s objemem ceričité soli. Po 5 min se proměří absorbance v 1 cm kyvetě při 460 nm proti vodě (UV-VIS spektrofotometr Carry 50, Varian, Austrálie). Ze závislosti rozdílů logaritmů absorbancí slepého vzorku a kalibračního roztoku na hmotnosti jodu v reakční směsi se sestrojí lineární kalibrační křivka, ze které se odečte obsah jodu ve vzorcích.

Způsoby optimalizace metody

Průběh Sandellovy-Kolthoffovy reakce ovlivňuje molární poměr arsenitanových a ceričitých iontů, teplota a doba reakce. U každého z těchto parametrů byly zvoleny čtyři hodnoty a jejich vliv byl otestován šestnácti pokusy vybranými na základě Taguchiho plánování experimentů⁹ (tab. I a II).

Vybrané podmínky byly vyzkoušeny na kalibrační závislosti o rozsahu 0–20 ng I v reakční směsi. Správnost výsledků optimalizovaného postupu byla ověřována stanovením obsahu jodu v referenčním materiálu sušeného odstředěného mléka BCR: CRM 063R a byl proveden test výťažnosti se dvěma standardními přísadkami jodičnanu draselného. Na závěr byl zjišťován vliv vlastního stanovení a vliv mineralizace na výsledek s použitím analýzy rozptýlu^{10,11} (počítačový program QM STAT, verze 1.1). Vzorek obnoveného odstředěného mléka byl desetkrát zmineralizován a v každém mineralizátu byl třikrát stanoven obsah jodu.

Výsledky a diskuse

Z výsledků šestnácti experimentů vyplývá, že správná volba reakčního poměru AsO_3^{3-} a Ce^{4+} je pro stanovení zásad-

Tabulka I

Volba testovaných hodnot parametrů

Parametr	1	2	3	4
A čas [min]	30	40	50	60
B teplota [°C]	30	40	50	60
C objem roztoku AsO_3^{3-} [ml]	3	4	5	6
D objem roztoku Ce^{4+} [ml]	0,25	0,3	0,4	0,5

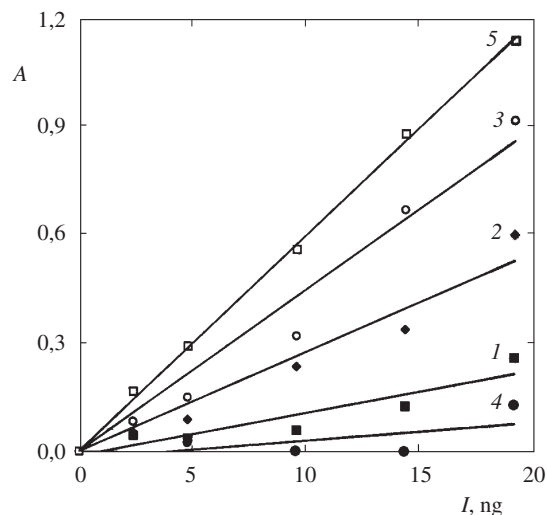
Tabulka II

Zvolené kombinace parametrů

Experiment	A	B	C	D	Molární poměr $\text{AsO}_3^{3-} : \text{Ce}^{4+}$
1	1	1	1	1	1,8:1
2	1	2	2	2	2,0:1
3	1	3	3	3	1,8:1
4	1	4	4	4	1,8:1
5	2	1	2	3	1,5:1
6	2	2	1	4	0,9:1
7	2	3	4	1	3,5:1
8	2	4	3	2	2,5:1
9	3	1	4	2	3,0:1
10	3	2	3	1	3,0:1
11	3	3	2	4	1,2:1
12	3	4	1	3	1,1:1
13	4	1	3	4	1,5:1
14	4	2	4	3	2,2:1
15	4	3	1	2	1,5:1
16	4	4	2	1	2,4:1

ni. V případě experimentů č. 7, 8, 9, 10, 14 a 16 je reakční poměr velmi vysoký (větší než 2:1) a za daných podmínek (vyšší teplota, delší čas, případně kombinace obou faktorů) dojde i u roztoků s velmi nízkým obsahem jodu ke zreagování velkého množství přítomných ceričitých iontů a naměřené absorbance se pro celou kalibrační řadu pohybují ve velmi úzkém intervalu nízkých hodnot. Získané kalibrace i po logaritmické transformaci vykazují značné odchylky od linearity a citlivost měření je malá. Tento případ je v obr. 1 zastoupen křivkou 1. Nevýhodný reakční poměr byl prokázán také u experimentů č. 1, 2, 3 a 4, protože průběh kalibrační křivky i přes celkem mírné podmínky stanovení (s výjimkou pokusu č. 4) není optimální (obr. 1, křivka 2). V případě exp. č. 11 byla získána vysoká směrnice kalibrační křivky, ale absorbance slepého pokusu i kalibračních roztoků jsou příliš vysoké, a proto více zatížené chybou měření přístroje (obr. 1, křivka 3). Kalibrační závislost získaná experimentem č. 6 (obr. 1, křivka 4) názorně dokazuje nadbytek ceričitých iontů oproti arsenitanovým (1:0,9). Vhodný reakční poměr byl zvolen u experimentů č. 5, 12, 13 a 15; pro zvolený rozsah kalibrační řady je nejvhodnější použití podmínek exp. 12 nebo 15, protože v těchto případech bylo dosaženo vysoké směrnice kalibrační křivky. Jako ideální (obr. 1, křivka 5) byly nakonec zvoleny podmínky exp. č. 15 (3 ml AsO_3^{3-} , 0,3 ml Ce^{4+} , 60 min, 50 °C), protože je lépe pracovat s menším reakčním objemem (z praktického i ekonomického hlediska) po delší dobu při nižší teplotě. Za těchto optimalizovaných podmínek se absorbance roztoků pohybovaly v rozmezí 0,14 (20 ng jodu) až 1,95 (slepý pokus). Později bylo ověřeno, že při potřebě rozšíření kalibrační řady na 0–40 ng jodu v reakční směsi stačí snížit teplotu na 30 °C a dobu reakce na 35 min při zachování optimálního dávkování roztoků. Podobného efektu by bylo dosaženo s využitím podmínek experimentu č. 5 nebo 13, ale spotřeba chemikálií by byla vyšší.

V referenčním materiálu byl deklarován obsah jodu v sušině 810±50 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$. Průměrná hodnota celkem deseti stanovení obsahu jodu činila 698 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ vzorku o sušině 95,2 %,



Obr. 1. Příklady naměřených kalibračních závislostí rozdílů logaritmů absorbancí slepého vzorku a kalibračního roztoku (A) na hmotnosti jodu (I) v reakční směsi (1 – exp. č. 9, 2 – exp. č. 3, 3 – exp. č. 11, 4 – exp. č. 6, 5 – exp. č. 15)

Tabulka III
Stanovení jodu v referenčním materiálu a test výtěžnosti

Vzorek CRM	Přídavek KIO ₃ [ng I]	Jod [μg.kg ⁻¹]	SD (n = 10) [μg.kg ⁻¹]	Výtěžnost (n = 5) [%]
1	0	698	50	–
2	60	956	–	107±14
3	180	1514	–	105±10

Tabulka IV
Výsledky stanovení jodu (μg.kg⁻¹) ve vzorcích obnoveného mléka I–X

Měření	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X
1	214	199	186	186	177	167	138	186	175	146
2	206	188	200	183	170	191	150	174	187	165
3	220	199	208	184	194	159	170	176	181	156

Tabulka V
Výsledky analýzy rozptylu

Rozptyl	Počet stupňů volnosti	F	F _{krit.}
Meziskupinový	1025	9	9,542
Reziduální	107,5	20	–
Celkový	392,4	29	–

čili 733 μg.kg⁻¹ sušiny. Tato hodnota odpovídá 90 % střední hodnoty deklarovaného obsahu a leží těsně pod dolní hranicí intervalu spolehlivosti certifikované hodnoty. Tento rozdíl je patrně důsledkem ztrát jodu při mineralizaci organické hmoty. Sloučeniny jodu obsažené ve vzorku mléka se při rozkladu z malé části přeměňují na těkavé formy, které unikají z reakční směsi. Výtěžnost jodu byla testována na hladině 60 a 180 ng jodu přidaného ve formě KIO₃ k navážce CRM. Každý mineralizát vzorku byl analyzován pětkrát. Stanovené hodnoty se pohybovaly v intervalech 107±14 %, resp. 105±10 % předpokládané hodnoty. Výsledky stanovení obsahu jodu v referenčním materiálu včetně výsledků testu výtěžnosti shrnuje tab. III.

Stanovením obsahu jodu v deseti mineralizátech vzorku obnoveného mléka byl zjišťován vliv dílčích kroků analytického postupu na výsledek (viz tab. IV). Analýzou rozptylu (tab. V) bylo prokázáno, že mineralizace je statisticky významným faktorem ovlivňujícím výsledek stanovení (rozptyl mezi skupinami je významný). Naproti tomu paralelní stano-

vení jodu ve stejném mineralizátu nepřispívá k celkovému rozptylu dat významnou měrou.

Závěr

Testováním různých reakčních podmínek spektrofotometrické metody stanovení jodu založené na Sandellově-Kolthoffově reakci byl zjištěn optimální molární poměr arsenitanu a ceričitých iontů (3:2). Kombinaci teploty a doby reakce je možné přizpůsobit podle požadovaného rozsahu kalibrační řady. Správnost výsledků optimalizovaného postupu byla ověřována analýzou certifikovaného referenčního materiálu a stanovením výtěžnosti jodu přidaného ve formě jodičnanu draselného. Bylo zjištěno, že statisticky významný podíl na celkovém rozptylu stanovení má mineralizace.

LITERATURA

- Zak B., Willard H. H., Myers G. B., Boyle A. J.: *Anal. Chem.* 24, 1345 (1952).
- Bednář J., Röhling S., Vohnout S.: *Cesk. Farm.* 13, 203 (1964).
- Tušl J.: *Chem. Listy* 70, 533 (1976).
- Ayiannidis A. K., Voulgaropoulos A. N.: *Analyst* 113, 153 (1988).
- Malmstadt H. V., Hadjiioannou T. P.: *Anal. Chem.* 35, 2157 (1963).
- Gökmen I. G., Dağ h G.: *Analyst* 120, 2005 (1995).
- Wiechen A., Kock B.: *Fresenius' J. Anal. Chem.* 319, 569 (1984).
- Fiedlerová V.: *Czech J. Food Sci.* 16, 163 (1998).
- Montgomery D. C.: *Taguchi's Contributions to Experimental Design and Quality Engineering. Design and Analysis of Experiments*. Wiley, New York 1991.
- Eckschlagler K., Horsák I., Kodejš Z.: *Vyhodnocování analytických výsledků a metod*. SNTL, Praha 1980.
- Balatka S.: *Inženýrská statistika pro ekonomy*. VŠCHT, Praha 2000.

J. Rudolfová^a, L. Čurda^a, and R. Koplík^b (^a*Department of Dairy and Fat Technology*, ^b*Department of Food Chemistry and Analysis*, *Institute of Chemical Technology, Prague*):
Optimization of Photometric Method for Iodine Determination in Foods

Determination of trace amounts of iodine in food samples was performed by a spectrophotometric method based on the Sandell-Kolthoff reaction catalysed by iodide ions. Samples were decomposed by wet digestion using a HNO₃–HClO₄–H₂SO₄ mixture. The amounts of reagents as well as reaction temperature and time were optimised. The accuracy of the method was tested by examination of the iodine recovery and by analysis of a certified reference material. It was found by the analysis of variance that mineralization had a statistically more significant effect on the assay accuracy than the catalytic reaction itself.