

## WALIDACJA METODY OZNACZANIA JODU W ŻYWNOŚCI I MATERIALE BIOLOGICZNYM\*

Robert Gąsior, Marta Szczypuła

Institut Zootechniki Państwowy Instytut Badawczy, Centralne Laboratorium, 32-083 Balice k. Krakowa

*Scharakteryzowano metodę oznaczania zawartości jodu w produktach żywnościowych pochodzenia zwierzęcego i materiale biologicznym. Badania walidacyjne przeprowadzono na 36 próbkach mleka płynnego, 9 próbkach mleka w proszku, 21 próbkach żółtka, 20 próbkach mięsa i 12 próbkach osocza. Powtarzalność i odtwarzalność metody nie przekraczały 9% i 16%. Niepewność metody ( $P \leq 0,05$ ) uwzględniająca błędy powtarzalności/odtworzalności, czystości wzorca, odzysku oraz szkła miarowego wynosiła 2% (produkty żywnościowe) i 16% (osocze krwi). Granica oznaczenia ilościowego w oznaczanym roztworze próbki wynosiła 0,009  $\mu\text{g}$  jodu. Podczas wykonywania rutynowych analiz powinna być sprawdzana powtarzalność, która nie powinna przekraczać granicy powtarzalności wynoszącej 18% (produkty żywnościowe) i 12% (osocze krwi).*

Badania zawartości jodu w materiale zwierzęcym i roślinnym, a w szczególności w żywności mają istotne znaczenie w żywieniu ludzi oraz zwierząt i wpływają na ich zdrowie. Jod jest jednym z pierwiastków odpowiedzialnych za regulację przemiany materii i elementem składowym hormonów wytwarzanych przez gruczoł tarczycy. Hormony tarczycy wpływają przede wszystkim na kontrolę przemiany tłuszczów i węglowodanów, a także na układ mięśniowy i nerwowy. Największą zawartością jodu charakteryzują się produkty pochodzenia morskiego, w tym ryby, a ponadto skorupiaki i mięczaki. Wiadomo także, że źródłem tego pierwiastka są niektóre wody mineralne, mleko i jego przetwory oraz jaja. Mimo że jod jest dość powszechnie występującym składnikiem w żywności, a jego całodobowe zapotrzebowanie przez człowieka jest niskie (osoby małe i dorosłe – od 100 do 150  $\mu\text{g}$ , kobiety w ciąży – około 200  $\mu\text{g}$ ), to ze względu na substancje, które ograniczają przyswajalność jodu, zawarte na przykład w roślinach kapustnych, istnieje problem niedoboru tego pierwiastka. Polska należy do krajów, których całe terytorium jest objęte niedoborem jodu, ale najbardziej jest to odczuwalne na terenach górzystych. Przeciwdziała się temu prowadząc profilaktykę zapobiegania

---

\*Praca wykonana w ramach działalności statutowej IZ PIB, temat nr 2122.1.

schorzeniom tarczycy, polegającej na ustawowym jodowaniu soli stołowej, w celu zwiększenia pobrania jodu przez ludność całego kraju. Jednak ujemne skutki nadmiernego spożycia soli przez Polaków zmuszają do redukcji jej spożycia, a w konsekwencji także jodu. Rodzi to konieczność poszukiwania naturalnych, spożywanych powszechnie produktów zawierających jod, takich jak mleko i jego przetwory (Brzóska i in., 2001; Brzóska, 2008; Brzóska i in., 2009). Zaburzenia na tle niedoboru jodu najczęściej prowadzą do niedoczynności tarczycy objawiającej się wolem endemicznym, opóźnieniem rozwoju psychofizycznego oraz zwiększoną śmiertelnością wśród dzieci.

Istnieje przynajmniej kilka metod oznaczania jodu, w tym wykorzystujących technikę ICP (Fecher i in., 1998), chromatografię jonowymienną (Hurst i in., 1983) czy też technikę aktywacji neutronowej (Xiaolin i in., 1998). Sprawdzone i jedną z powszechniej stosowanych jest kinetyczno-kolorymetryczna metoda oznaczania tego pierwiastka z wykorzystaniem katalizowanej przez jod reakcji Sandella–Kolthoffa (Górski i Bobek, 1960; Toledo i in., 2002). Brak jest jednak publikacji, które przedstawiałyby charakterystykę tej metody z uwzględnieniem takich parametrów, jak: powtarzalność, odtwarzalność, granica powtarzalności, granica oznaczenia ilościowego, odzysk, niepewność. Parametry te, ogólnie opisane w literaturze (Arendarski, 2003; Dobecki, 2004; Ellison i in., 2000) są elementami walidacji i mają na celu wykazanie poprawności stosowanej metody zgodnie z zasadami Dobrej Praktyki Laboratoryjnej i wymaganiami normy PN-EN ISO/IEC 17025 (2005). Dodatkowym elementem walidacji jest również wykonanie analiz dostępnych materiałów referencyjnych i określenie odzysku jodu z badanej próbki. Niektóre prace zawierają szczegółowe opisy charakterystyki metod analitycznych oznaczeń w paszach i żywności (Ake i in., 1998; Kramer i in., 1997; Bütikofer i in., 1991), ale nie obejmują zagadnień dotyczących szacowania niepewności. Zagadnienia te są natomiast omawiane w pracach Gąsiora i in. (2005), Gąsiora i Pieszki (2006), Gąsiora i Ślusarczyk (2006), Gąsiora i in. (2009). Badania walidacyjne są niezwykle istotne, ponieważ pomagają lepiej poznać ograniczenia danej metody. Na ich podstawie można również określić sposoby kontrolowania jakości wyników podczas wykonywania rutynowych analiz.

Celem pracy była walidacja metody oznaczania jodu w produktach żywnościowych pochodzenia zwierzęcego (mleko, mięso, jaja) i materiale biologicznym (osocze krwi).

W niniejszej pracy zwalidowano metodę polegającą na spaleniu materiału z dodatkiem węgla potasu w piecu elektrycznym, rozpuszczeniu popiołu w kwasach i oznaczeniu jodu metodą kinetyczno-kolorymetryczną z dodatkiem wzorca wewnętrznego.

### **Materiał i metody**

Zasada walidowanej metody polega na wykorzystaniu katalizowanej przez jony jodkowe (I<sup>-</sup>) reakcji oksydacyjno-redukcyjnej pomiędzy jonami ceru i arsenu, opisywanej jako:  $2\text{Ce}^{+4} + \text{As}^{+3} \rightarrow 2\text{Ce}^{+3} + \text{As}^{+5}$ , a następnie oznaczeniu zmieniającej się w czasie, ekstynkcji badanego roztworu, przy długości fali 420 nm.

**Odczynniki i aparatura**

Użyto następujących odczynników:  $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ , NaOH,  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , roztwór arsenianu (III) sodu (POCH, Gliwice), HCl,  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (Chempur, Piekary Śląskie),  $(\text{NH}_4)_4\text{Ce}(\text{SO}_4)_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$  (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), standard jodu (Merck, Darmstadt, Niemcy). Przygotowano je w sposób podany poniżej:

- a) 10%  $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$  (100 g  $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$  / 1000 ml  $\text{H}_2\text{O}$ ),
- b) 0,5 M NaOH (20 g NaOH / 1000 ml  $\text{H}_2\text{O}$ ),
- c) 2 M  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (27,64 g bezwodnego  $\text{K}_2\text{CO}_3$  / 100 ml  $\text{H}_2\text{O}$ ),
- d) 2 M HCl (160 ml HCl stęż. c. wł. 1,19 / 1000 ml  $\text{H}_2\text{O}$ ),
- e) 3,5 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (194 ml stęż.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  / 1000 ml  $\text{H}_2\text{O}$ ),
- f)  $\text{H}_2\text{SO}_4$  do ceru (230 ml 3,5 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  rozcieńczono  $\text{H}_2\text{O}$  w kolbie do 1000 ml),
- g)  $(\text{NH}_4)_4\text{Ce}(\text{SO}_4)_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$  – siarczan (VI) cerowo (IV)-amonowy-dwuhydrat rozpuszczamy w takiej ilości  $\text{H}_2\text{SO}_4$  do ceru, aby 1 ml roztworu rozcieńczony wodą do 8 ml wykazywał na fotometrze ekstynkcję około 0,7 (2,25 g ceru / 250 ml  $\text{H}_2\text{SO}_4$  do ceru),
- h) roztwór arsenianu (III) sodu (3,51 g  $\text{As}_2\text{O}_3$  oraz 1,755 g NaOH rozcieńczono  $\text{H}_2\text{O}$  w kolbie do 1000 ml),
- i) roztwór wzorcowy jodu I : 1000  $\mu\text{g}$  J/ml (130,8 mg wysuszonego KJ cz.d.a / 100 ml  $\text{H}_2\text{O}$ ),
- j) roztwór wzorcowy jodu II : 5  $\mu\text{g}$  J/ml (5 ml roztworu I rozcieńczono  $\text{H}_2\text{O}$  do 1000 ml),
- k) roztwór wzorcowy jodu III : 0,04  $\mu\text{g}$  J/ml (4 ml roztworu II rozcieńczono  $\text{H}_2\text{O}$  do 500 ml),
- l) roztwór do rozcieńczeń : 2 ml 2M HCl + 2 ml 3,5M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  + 5 ml wody redestylowanej + 1 ml 2 M  $\text{K}_2\text{CO}_3$

Do analiz używano wodę redestylowaną. Roztwory wzorcowe I i II przechowywane w ciemni i w lodówce były trwałe kilka miesięcy. Roztwór wzorcowy jodu III przygotowywano co miesiąc i również przechowywano w lodówce (+2°C do +8°C). Ponadto, wykonywano kontrolę odczynników. Roztwór  $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$  sprawdzano w ten sposób, że 10 ml roztworu rozcieńczano wodą do objętości 50–70 (ml) i miareczkowano 0,5 N NaOH w obecności kilku kropel fenoloftaleiny do barwy różowej; na zmiareczkowanie potrzeba 10,8–11,2 ml 0,5 N NaOH. Z kolei 2 M roztwór  $\text{K}_2\text{CO}_3$  sprawdzano w ten sposób, że do 1 ml tego roztworu ostrożnie dodawano 2 ml 2 M roztworu HCl w obecności oranżu metylowego. Po wykonaniu tych czynności roztwór powinien mieć kolor pomarańczowy.

Oprócz podstawowego wyposażenia laboratoryjnego wykorzystano: spektrofotometr, piec do spalań z regulacją temperatury, homogenizator, suszarkę, łaźnię wodną, wirówkę, liofilizator.

**Przygotowanie próbki badanego materiału i próby ślepej, oznaczanie zawartości jodu**

Mięso do analizy mielono w młynku i mieszano do jego ujednorodnienia i do czasu analizy przechowywano w temperaturze około -18°C. Mleko, jeśli było przechowywane w zamrażarce rozmrażano i mieszano przecikiem szklanym lub homogenizowano w homogenizatorze. Żółtka przed analizą liofilizowano.

Do probówek ogniotrwałych o pojemności 25 ml pipetowano 7 ml wody, dodawano 1 ml 10%  $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$  oraz 1 ml 0,5 M NaOH, po czym mieszano pręcikiem szklanym. Koloidalną zawiesinę  $\text{Zn(OH)}_2$  wirowano przez 5 min przy 3000 obr./min, płyn z nad osadu zlewano, dodawano 10 ml wody redestylowanej, mieszano i wirowano. Osad przepłukiwano jeszcze dwukrotnie. Do probówek z osadem dodawano próbkę (1 ml mleka lub naważkę próbki stałej w ilości 0,1 g do 0,2 g, w zależności od spodziewanej zawartości jodu) oraz 1 ml 2 M  $\text{K}_2\text{CO}_3$ . Po wymieszaniu pręcikiem szklanym i spłukaniu go niewielką ilością wody, zawartość próbki suszono przez 12 godzin, najpierw w temp.  $60^\circ\text{C}$ , potem w temp.  $100^\circ\text{C}$  (1 h) i  $200^\circ\text{C}$  (2 h). Stopniowe podnoszenie temperatury ma na celu zmniejszenie strat jodu. Następnie próbkę spalano w piecu (1,5 h,  $250^\circ\text{C}$ ), po czym kontynuowano spalanie podnosząc temperaturę do  $580^\circ\text{C} \pm 20^\circ\text{C}$  (3,5–4 h), do uzyskania koloru szarego lub lekko żółtego. Po spaleniu próbkę pozostawiano na noc do ostudzenia, a następnie ostrożnie zwilżano 1 ml wody, zobojętniano 2 ml 2 M HCl i po wymieszaniu ruchem kolistym dodawano 2 ml 3,5 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  i 5 ml wody, po czym ponownie mieszano (pręcikiem szklanym). Ilość ml, do których rozcieńczono próbkę po spaleniu wynosi więc:  $b=2 \text{ ml } 2 \text{ M HCl} + 2 \text{ ml } 3,5 \text{ M H}_2\text{SO}_4 + 6 \text{ ml wody redestylowanej}=10$  (**Obliczenia**). Próbkę wirowano przez 5 min przy 4000 obr./min. W razie konieczności roztwór dodatkowo rozcieńczano (krotność rozcieńczenia  $r$ , **Obliczenia**) za pomocą wcześniej przygotowanego roztworu do rozcieńczeń (I).

Na każdą próbkę przygotowano po dwie kolby Erlenmayera (25 ml). Do każdej z nich dodawano po 2 ml arsenianu (III) sodu. Dodatkowo przygotowano 4 erlenmajerki z 2 ml arsenianu (III) sodu w każdej, na próbę ślełą. Do nieparzystych kolbek dodawano po 1 ml wody, zaś do parzystych po 1 ml roztworu wzorcowego jodu III. Z probówek po ostatnim wirowaniu i ewentualnym rozcieńczeniu odmierzano do każdej z kolbek po 4 ml cieczy sklarowanej nad osadem ( $c$ , **Obliczenia**), a do kolb Erlenmayera na próbę ślełą dodawano po 4 ml roztworu do rozcieńczeń (I). Zawartość kolbek mieszano, wstawiano do łaźni wodnej ( $25^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ ), a po 30 min wykonywano pomiar spektrofotometryczny. Dokładnie co minutę dodawano do kolbek po 1 ml roztworu  $(\text{NH}_4)_4\text{Ce}(\text{SO}_4)_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ , mieszano i mierzono ekstynkcję przy długości fali 420 nm wobec kuwety z wodą. Odczytywane wartości ekstynkcji to:  $E_1$  – dla kolbki z wodą i  $E_2$  – dla kolbki z roztworem wzorcowym jodu. Po każdym pomiarze roztwór z kuwety wylewano, a kolbkę z resztą płynu ponownie termostatowano w łaźni wodnej. Po upływie 30 min. od pierwszego odczytu mierzono na spektrofotometrze ekstynkcję pozostałego płynu w kolbkach i odczytywano ekstynkcję  $E_3$  i  $E_4$  – dla kolbki z roztworem wzorcowym jodu.

### Obliczenia

Ogólnie, zawartość jodu liczone według wzoru:

$$J = C \times \frac{\log E_1 - \log E_3}{(\log E_2 - \log E_4) - (\log E_1 - \log E_3)}$$

przy czym:

$J$  = oznaczona w 4 ml próbki wziętej do analizy zawartość jodu w ( $\mu\text{g}$ ),

$C$  = stężenie jodu w roztworze wzorcowym ( $\mu\text{g/ml}$ ),

$E_1$  = ekstynkcja początkowa próbki bez roztworu wzorcowego,

$E_2$  = ekstynkcja początkowa próbki z roztworem wzorcowym,

$E_3$  = ekstynkcja końcowa próbki bez roztworu wzorcowego,

$E_4$  = ekstynkcja końcowa próbki z roztworem wzorcowym.

Ostateczną zawartość jodu w mleku  $X$  ( $\mu\text{g}/100$  ml) lub w próbkach stałych  $X'$  ( $\text{mg}/\text{kg}$ ) liczonego wg wzorów:

$$X = (J - J') \times \frac{100 \times b}{a \times c \times 0,01 \times R} \times r$$

$$X' = (J - J') \times \frac{b}{a \times c \times 0,01 \times R} \times r$$

gdzie:

$a$  = ilość próbki wzięta do analizy (ml) lub (g),

$b$  = ilość (ml) mieszaniny, do których rozcieńczono próbkę po spaleniu,

$c$  = ilość (ml) płynu pobranego do oznaczenia,

$J'$  = oznaczona zawartość jodu w ślepej próbie ( $\mu\text{g}$ ),

$R$  = odzysk (%),

$r$  = krotność rozcieńczenia.

Jeśli masę próbki stałej (sypkiej) wyraża się w mg ( $a_{\text{mg}}$ ) oraz jeśli  $b$  i  $c$  wynoszą według powyższej metodyki odpowiednio 10 ml i 4 ml, to zawartość jodu w próbce ( $\mu\text{g}/\text{g}$  lub  $\text{mg}/\text{kg}$ ) wyraża się wzorem:

$$(J - J') \times \frac{2500}{a_{\text{mg}} \times 0,01 \times R} \times r$$

### Walidacja

Badania powtarzalności przeprowadzono na 86 podwójnych próbkach produktów żywnościowych pochodzenia zwierzęcego i 12 próbkach osocza krwi, tj. mleka płynnego (świeże krowie mleko i pasteryzowane, zakupione w kartonach, łącznie 36 szt.), mleka w proszku (9 szt.), żółtek jaj kurzych (21 szt.), mięsa (ryby, mięso piersiowe kurcząt i konserwy mięsne, łącznie 20 szt.) i osocza krwi bydłowej (12 szt.). Badania odtwarzalności przeprowadzono na 24 próbkach produktów żywnościowych i 6 próbkach osocza krwi przeanalizowanych w powtórzeniu przez dwie osoby w różnym czasie. Powtarzalność ( $CV_{\text{rep}}$ , tab. 1) określano jako nie mniejszą niż współczynnik zmienności pojedynczych oznaczeń przeprowadzonych tą samą metodą, w badaniach identycznego materiału, w tym samym laboratorium, przez tego samego laboranta, w tym samym czasie. Odtwarzalność ( $CV_{\text{reprod}}$ , tab. 1) określano jako nie mniejszą niż współczynnik zmienności pojedynczych oznaczeń przeprowadzonych tą samą metodą, w badaniach identycznego materiału, w tym samym laboratorium, przez dwóch laborantów, w różnym czasie. Współczynnik zmienności  $CV_{kn}$  dla  $k$  próbek analizowanych w  $n$  powtórzeniach był liczony z wzoru:

$$CV_{kn} = \sqrt{\frac{\sum_k CV_{n2}^2}{k}}$$

gdzie:

współczynnik zmienności ( $CV_{n2}$ ) oznaczenia próbki w powtórzeniu ( $n=2$ ) obliczono ze wzoru:

$$CV_{n2} = 100 \times \frac{SD_{n2}}{X_{sr}}$$

gdzie:

$SD_{n2}$  – odchylenie standardowe z dwóch pomiarów danej próbki,

$X_{sr}$  – średnia z dwóch pomiarów danej próbki.

Jako kryterium powtórzenia oznaczeń (granica powtarzalności) przyjęto podwojony współczynnik zmienności dla powtarzalności. Wynik korygowano o ślepą próbę przez odjęcie jej od zawartości jodu w badanej próbce, a granicę oznaczalności  $X_{ozn}$  wyznaczono z wzoru  $X_{ozn} = n \times SD$ , gdzie  $SD$  jest odchyleniem standardowym zawartości jodu w ślepej próbce przeprowadzonej przez procedurę przygotowania próbki. Sprawdzono również liniowość zależności różnicy logarytmów ekstynkcji  $y = \log E_1 - \log E_3$  od stężenia jodu  $x$  dodanego do próbówki reakcyjnej.

Tabela 1. Parametry walidacyjne metody oznaczania jodu w żywności i osoczu krwi  
Table 1. Validation parameters of the method for iodine determination in food and blood plasma

Badany materiał Analysed material	Powtarzalność Repeatability $CV_{rep}$ (%)	Odtwarzalność Reproducibility $CV_{reprod}$ (%)	Przyjęta powtarzalność /granica powtarzalności/ Assumed repeatability /limit of repeatability/ (%)	Odtwarzalność Przyjęta Assumed rep rod- cibility (%)	Niepewność standardowa powtarzalności/ odtwarzalności Standard uncertainty of repeatability/ reproducibility ( $u1\%$ )
Żywność/Food:					
mleko płynne liquid milk	5,5	15,8	9 /18/	16	11,3
mleko w proszku powdered milk	7,7	6,7			
żółtka/yolks	8,0	8,1			
mięso/meat	9,1	9,1			
Osocze krwi Blood plasma	5,5	5,6	6/12/	7	4,9

Określono główne czynniki niepewności (wyrażone w postaci względnej, %), takie jak: niepewność powtarzalności/odtwarzalności ( $u1\%$ ), niepewność czystości zakupionego wzorca ( $u2\%$ ) oraz niepewności związane z odzyskiem ( $u3\%$ ) i niedokładnością pipet ( $u4\%$ ) oraz kolbek ( $u5\%$ ), składające się na niepewność opisaną metody. Niepewności przed ich złożeniem wyrażano jako niepewności

standardowe  $u_i\%$  (poziom ufności 68%,  $P \leq 0,32$ ). Standardową niepewność złożoną metody  $u_c\%$  liczono w oparciu o zasadę propagacji niepewności z wzoru:

$$u_c\% = \sqrt{u1\%^2 + u2\%^2 + u3\%^2 + u4\%^2 + u5\%^2}$$

Standardowa niepewność powtarzalności/odtwarzalności zawierająca większość błędów, w tym przygotowania próbki zdefiniowano jako nie mniejszą niż wartość współczynnika zmienności średniej arytmetycznej z analiz danej próbki, przy czym za współczynnik zmienności przyjęto wartość maksymalną z powtarzalności i odtwarzalności. Dla analiz wykonywanych w powtórzeniu ( $n=2$ ) standardowa niepewność powtarzalności/odtwarzalności wynosi:

$$\frac{V_{odtw}}{n^{1/2}}$$

Niepewności standardowe dotyczące czystości wzorca oraz używanych kolb i pipet (tylko w części związanej z obciążeniem, nie ujętym w powtarzalności-odtwarzalności) były liczone na podstawie określonych wartości błędów granicznych  $a_i$  (wyrażonych w postaci względnej, %). W przypadku kolbek i pipet, wartości  $a_i$  były szacowane na podstawie przyjętej w laboratorium procedury kalibracyjnej i wynikających z niej założeń. W przypadku czystości wzorców wartości  $a_i$  zostały oszacowane na podstawie deklaracji producenta. Przy założeniu o symetrycznym rozkładzie prostokątnym średnich wartości mierzonych wokół wartości prawdziwej (nominalnej) w przedziale wyznaczonym przez  $a_i$ , niepewności  $u_i\%$  są określane wzorem  $u_i\% = a_i / \sqrt{3}$  (Ellison i in., 2000). W trakcie analizy używano kilku pipet i kolbek, więc czynnik niepewności związany z niedokładnością pipet oraz czynnik niepewności związany z niedokładnością kolbek liczono składając poszczególne składowe zgodnie z zasadą propagacji. Niepewność odzysku liczono jako współczynnik zmienności średniej arytmetycznej z wartości odzysków wyznaczonych podczas walidacji. Niepewność metody  $U_c\%$ , po rozszerzeniu na 95% poziom ufności ( $P \leq 0,05$ ), liczono mnożąc standardową niepewność złożoną metody  $u_c\%$  przez współczynnik rozszerzenia  $k=2$  (Ellison i in., 2000).

Dodatковым elementem walidacji było porównanie wyników uzyskanych w analizach dwóch materiałów referencyjnych mleka: BCR 151, BCR 063R oraz jednego materiału referencyjnego mięsa BCR-422 (European Commission, Institute for Reference Materials and Measurements, Belgium), z wartościami referencyjnymi przypisanymi tym materiałom (5,35  $\mu\text{g/g}$  suchej masy, 0,81  $\mu\text{g/g}$  i 4,95  $\mu\text{g/g}$ , odpowiednio dla: BCR 151, BCR 063R i BCR-422). Na podstawie tych materiałów oraz zastosowania metody dodatku wzorca jodu do próbki określono odzysk. Wzorzec KJ dodawano do próbki na wczesnym etapie jej przygotowania (suszenie, spalanie). W ramach badań odzysku wykonano łącznie 29 analiz materiałów referencyjnych i 36 analiz metodą dodatku wzorca.

## Wyniki

Podczas walidacji metody, na podstawie analiz materiałów o różnych zawartościach jodu określono następujące zakresy oznaczania: od około 2,25 µg/100 ml do 111 µg/100 ml (mleko płynne), od 0,3 µg/g do 6 µg/g (żółtka), od 0,1 µg/g do 6 µg/g (mleko w proszku), od 0,1 µg/g do 32 µg/g (mięso i konserwy mięsne) i od 2,25 µg/g do 11 µg/g (osocze krwi). Graniczna zawartość jodu dająca się w sposób wystarczająco pewny oznaczyć odpowiada czterokrotnej wartości odchylenia standardowego SD ślepej próby i wynosi 0,009 µg jodu w oznaczanym roztworze.

Wartości dotyczące powtarzalności, odtwarzalności, granicy powtarzalności i niepewność standardową powtarzalności/odtworzalności zebrano w tabeli 1, natomiast budżet niepewności zawierający wszystkie poznane istotne czynniki niepewności, standardową niepewność złożoną i niepewność złożoną rozszerzoną dla analiz wykonywanych w powtórzeniu ( $n=2$ ) w tabeli 2. Krzywa kalibracji wykonana na podstawie sporządzonych roztworów wzorcowych jodu jest prostą spełniającą równanie funkcji liniowej  $y = ax+b$  ( $y$  jest różnicą logarytmów ekstynkcji pomiarów na początku i po określonym czasie reakcji,  $x$  zawartością jodu w badanym roztworze),  $z$  wartością kwadratu współczynnika korelacji  $r^2$  nie mniejszą niż 0,99. Zakresy robocze oznaczeń odpowiadają zawartościom jodu (µg w oznaczanym roztworze) w zakresie od 0,004 do 0,120. Odzysk określony na podstawie analiz materiałów referencyjnych i metodą dodatku znanej ilości wzorca do próbek badanych materiałów żywnościowych był bardzo podobny i wynosił odpowiednio: 82% ( $n=29$ ) i 85% ( $n=36$ ).

Tabela 2. Budżet niepewności standardowych oraz standardowa niepewność złożona  $u_c\%$  (68% poziom ufności) i niepewność złożona rozszerzona  $U_c\%$  (95% poziom ufności,  $k=2$ ),  $n=2$  \*  
Table 2. Standard uncertainty budget, combined standard uncertainty  $u_c\%$  (68% confidence level) and combined expanded uncertainty  $U_c\%$  (95% confidence level,  $k=2$ ),  $n=2$  \*

Badany materiał Analysed material	$u1\%*$	$u2%*$	$u3%*$	$u4%*$	$u5%*$	$u_c\%$	$U_c\%$ ( $k=2$ )
Żywność/Food **	11,3	0,3	5,8	2,5	0,3	13	26
Osocze krwi Blood plasma	4,9	0,3	5,8	2,5	0,3	8	16

\* Wyjaśnienia oznaczeń znajdują się w tekście rozdziału Materiał i metody.

\*\* Niepewności poszczególnych produktów żywnościowych nie przekraczały wartości podanych w tabeli.

\* For explanations, see Material and Methods section.

\*\* Uncertainties of individual food products did not exceed the values given in the Table.



### Omówienie wyników

Opisana i zwalidowana w niniejszej pracy metoda jest bardzo czuła. Pozwala ona na ilościowe oznaczenie zawartości jodu w 1 ml próbki płynnej nawet na poziomie około 0,02 µg, a w 1 g próbki stałej na poziomie około 0,07 µg.

Na niepewność metody składają się główne czynniki niepewności, takie jak: niepewność powtarzalności/odtwarzalności, niepewność czystości zakupionego wzorca, niepewności odzysku, a także związanej z niedokładnością (obciążeniem rozumianym jako różnica między wartością rzeczywistą a wartością nominalną) pipet i użytych do analizy kolb miarowych. Wyżej wymienione elementy można potraktować jako odrębne czynniki niepewności, które wpływają na złożoną niepewność metody. Pozostałe elementy niepewności związane z precyzją pipet i kolb miarowych, a także precyzją ważenia zostały już uwzględnione w powtarzalności-odtwarzalności i dlatego nie wchodzi one do budżetu niepewności jako odrębne jego czynniki (Gąsior i in., 2009). Takie postępowanie jest zgodne z uwagami Ellisona i in. (2000) o unikaniu podwójnego liczenia składowych niepewności. Co więcej, niepewność kalibracji (krzywej wzorcowej) również nie jest wyszczególniona w budżecie niepewności jako odrębny element. Dzieje się tak dlatego, bo opisana metoda polega na obliczaniu zawartości jodu w odniesieniu do dodanego wzorca do każdej próbki (jest to integralna część metody), a więc błędy zależności sygnału spektrofotometrycznego od stężenia jodu także są już zawarte w powtarzalności/odtwarzalności. W niepewności powtarzalności/odtwarzalności zawarta jest większość błędów przygotowania próbki i samego pomiaru spektrofotometrycznego. Jednak istotne jest to, że błędy te są automatycznie uwzględnione w tej niepewności tylko wówczas, jeżeli obliczane z dwóch powtórzeń wyniki dotyczą oznaczeń jodu w dwóch równoległe naważonych próbkach. Gdyby bowiem próbka była naważona bez powtórzeń, a otrzymany roztwór przeznaczony do pomiaru spektrofotometrycznego był analizowany dwukrotnie, to wtedy niepewność powtarzalności/odtwarzalności obejmowałaby tylko błąd samego oznaczenia na aparacie (Gąsior i in., 2007). Wymienione powyżej czynniki niepewności są najistotniejsze i wnoszą, zgodnie z zasadą propagacji Gaussa (Ellison i in., 2000), największy wkład w wartość niepewności metody dla analiz wykonanych w jednym laboratorium. Niepewność metody ( $P \leq 0,05$ ) wraz z wynikiem (średnia z pomiarów) ma znaczenie praktyczne przy jego interpretacji i określa przedział tolerancji w jakim powinna się znaleźć z prawdopodobieństwem 95% rzeczywista wartość wyniku oznaczenia. Niepewność powinna być kontrolowana przy każdej analizie próbek przez sprawdzanie powtarzalności, która nie powinna przekraczać określonej w czasie walidacji granicy powtarzalności.

Zaletą opisanej procedury przygotowania próbki i oznaczania jodu na spektrofotometrze jest możliwość zmiany czasu reakcji (między pomiarami spektrofotometrycznymi) oraz temperatury reakcji, w zależności od zawartości jodu w próbce (im większa zawartość jodu tym krótszy czas reakcji i/lub niższa temperatura). Trzeba też jednak pamiętać, że nie należy razem spalać próbek znacznie różniących się zawartością jodu, gdyż jod z próbek o wyższej zawartości może zanieczyścić próbki z małą zawartością tego pierwiastka. Zwalidowana metoda cechuje się wystarczającą wiarygodnością oraz dokładnością i precyzją, co

zostało potwierdzone wynikami walidacji. Należy wszakże dodać, że podane parametry charakterystyki mogą się zmieniać w zależności od zakresów zawartości jodu i rodzaju oznaczanych materiałów, a niepewność metody można zmniejszyć przez zwiększenie ilości oznaczeń przypadających na jedną próbkę ( $n \geq 2$ ).

### Piśmiennictwo

- Ake M., Fabre H., Malan A.K., Mandrou B. (1998). Column liquid chromatography determination of vitamins A and E in powdered milk and local flour: a validation procedure. *J. Chrom. A*, 826: 183–189.
- Arendarski J. (2003). Niepewność pomiarów. Oficyna Wydawnicza Politechniki Warszawskiej. Warszawa.
- Brzóška F. (2008). Sól i lizawki solne w żywieniu krów mlecznych oraz w profilaktyce jodowej człowieka. *Wiad. Zoot.*, 4: 9–22.
- Brzóška F., Łojewska A., Brzóška B., Zyzak W. (2001). Lizawki solne z mikroelementami w żywieniu krów mlecznych. *Ann. Warsaw Agric. Univ., Anim. Sci.*, nr spec.: 438–444.
- Brzóška F., Szybiński Z., Śliwiński B. (2009). Iodine concentration in Polish milk – variations due to season and region. *Pol. J. Endocrinol.*, 60, 6: 449–454.
- Bütikofer U., Fuchs D., Bosset J.O., Gmür W. (1991). Automated HPLC-amino acid determination of protein hydrolysates by precolumn derivatization with OPA and FMOC and comparison with classical ion exchange chromatography. *Chromatographia*, 31, 9/10: 441–447.
- Dobecki M. (2004). Zapewnienie jakości analiz chemicznych. Instytut Medycyny Pracy, Łódź.
- Ellison S.L.R., Rosslein M., Williams A. (Eds) (2000). Quantifying uncertainty in analytical measurement. *eurachem/Citac Guide 2000*.
- Fecher P.A., Goldmann I., Nagengast A. (1998). Determination of iodine in food samples by inductively coupled plasma mass spectrometry after alkaline extraction. *J. Anal. Spectr.*, 13: 977–982.
- Gąsior R., Pieszka M. (2006). Evaluation of vitamins A and E level in meat by HPLC. *Anim. Sci.*, 1, Suppl.: 88–89.
- Gąsior R., Pieszka M., Brzóška F. (2009). Validation of a method for simultaneous determination of tocopherols and tocotrienols in cereals using Normal Phase HPLC. *J. Anim. Feed Sci.*, 18: 173–192.
- Gąsior R., Szczypuła M., Sala K. (2007). Walidacja metody oznaczania azotu w paszach i materiale mięsny. *Rocz. Nauk. Zoot.*, 34, 1: 131–139.
- Gąsior R., Ślusarczyk K., Szczypuła M. (2005). Validation of a method for determining amino acids in acid hydrolysates of feeds. *Ann. Anim. Sci.*, 5, 1: 181–197.
- Gąsior R., Ślusarczyk K. (2006). Charakterystyka metody oznaczania aminokwasów siarkowych w paszach i żółtkach jaj. *Rocz. Nauk. Zoot.*, 33 (2): 241–253.
- Górski L., Bobek S. (1960). Alkaliczna metoda oznaczania jodu w osoczu krwi. *Endokrynologia Polska*, XI, 77.
- Hurst W. Jeffrey, Snyder Kevin P., Martin Jr. Robert A. (1983). The determination of iodine in milk and milk chocolate by anion HPLC. *J. Liquid Chrom. Rel. Technol.*, 1520-572X, 6, 11: 2067–2077.
- Kramer J.K.G., Blais L., Fouchard R.C., Melnyk R.A., Kallury K.M.R. (1997). A rapid method for the determination of vitamin E forms in tissues and diet by High-Performance Liquid Chromatography using a normal-phase diol column. *Lipids*, 32, 3: 323–330.
- Toledo P., Andrén A., Björck L. (2002). Composition of raw milk from sustainable production systems. *International Dairy J.*, 12: 75–80.

Xiaolin Hou, Xiangqian Feng, Qinfang Qian, Chifang Chai (1998). A study of iodine loss during the preparation and analysis of samples using  $^{131}\text{I}$  tracer and neutron activation analysis. *Analyst*, 123: 2209–2213.

Zatwierdzono do druku 28 VI 2010

ROBERT GAŚSIOR, MARTA SZCZYPUŁA

**Validation of a method for determination of iodine in food and biological material**

SUMMARY

A method for determination of iodine content in animal food products and biological material has been described. A validation study was conducted with 36 samples of liquid milk, 9 samples of powdered milk, 21 samples of yolk, 20 samples of meat and 12 samples of blood plasma. Repeatability and reproducibility of the method did not exceed 9% and 16%, respectively. Uncertainty of the method ( $P \leq 0.05$ ), including errors of repeatability/reproducibility, standard purity, recovery and calibrated glassware was 26% for food products and 16% for blood plasma. The limit of quantitation in the sample solution analysed was  $0.009 \mu\text{g}$  of iodine. During routine analyses, the repeatability should not exceed the limit of repeatability of 18% for food products and 12% for blood plasma.

Key words: validation, iodine, food, plasma