

Клинические рекомендации

МИКРОМЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЙОДА В МОЧЕ

М.И. Арбузова¹, А.А. Махмудов², Г.А. Герасимов³, А.В. Ильин¹¹ ФГУ Эндокринологический научный центр Росмедтехнологий МЗ и СР РФ² Центр по контролю за профилактикой и заболеваемостью (США)³ Международный совет по контролю за йоддефицитными заболеваниями

Концентрация йода в моче — прямой количественный показатель текущего потребления йода в популяции. Наиболее распространенным методом определения йода в моче является церий-арсенитный метод с предварительной обработкой образцов раствором персульфата аммония.

Цель исследования. Разработка модификации данного метода для уменьшения образования токсичных продуктов реакции. Описанный метод имеет хорошие характеристики (чувствительность метода — 11 мкг/л, CV < 10%, коэффициент корреляции с референсным методом составляет 0,99); количество образующихся в процессе реакции токсичных веществ уменьшается в 3 раза, себестоимость исследования снижается вследствие уменьшения расхода реактивов и деионизированной воды.

Micromethod of Iodine Measurement in Urine

M. Arbuzova, A. Makhmudov, G. Gerasimov, A. Ilyin

¹ Federal Endocrinological Research Centre of Russia, Moscow² National Centre for Disease Control and Prevention, USA³ International Council for the Control of Iodine Deficiency Disorder

Iodine concentration in urine is the direct quantity indicator of the current consumption of iodine in the population. The most widespread method of determination of iodine in urine is cerium-arsenic method with preliminary processing samples of urine using the solution ammonium persulfate. The purpose of work was to develop updating of the given method for reduction of the formation of toxic products of the reaction. Described method has good characteristics (the limit of the detection of this method 11 ug/l, CV < 10 %, the coefficient of the correlation with reference method 0.99), the amount of toxic substances formed during reaction decreases in 3 times, the cost price of research is reduced owing to reduction of the volume of reagents and water.

Введение

Содержание йода в моче является прямым количественным показателем текущего потребления йода населением и хорошим биохимическим маркером распространенности йоддефицитных заболеваний в отдельно взятом регионе. Рекомендуемый международными организациями по контролю за йоддефицитными заболеваниями персульфатный способ обработки образцов мочи при определении йода церий-арсенитным методом [2, 4], обладая несомненными преимуществами перед перхлоратным способом, имеет вместе с тем ряд недостатков. В частности, метод требует большого расхода реактивов, что сопровождается образованием значительного количества токсичных продуктов реакции. В последнее время появился ряд микрометодов, например микропланшетный метод Ohashi et al. [3], который позволяет значительно уменьшить образование токсич-

ных продуктов и хорошо коррелирует с методом масс-спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой (ICP-MS), являющимся в настоящее время для определения йодурии референсным [1]. К сожалению, стоимость этих наборов достаточно велика, и доступность их для нашей страны осложняется к тому же таможенными требованиями.

В России компания “БиохимМак” предлагает набор оборудования для собственной модификации метода определения йодурии. Однако корреляция его с общепринятым методом [2] недостаточна для получения точных результатов ($p = 0,75$; $n = 104$ против необходимого $p \geq 0,95$). Целью нашей работы было создать модификацию персульфатного способа определения йода в моче, позволяющую не только уменьшить расход реактивов, но и быть адекватной предъявляемым к подобным методам требованиям [2].

Материал и методы

Средства измерений и вспомогательные устройства

- Проточный фотометр или спектрофотометр для измерения оптической плотности при длине волны 405 Нм с погрешностью определения не более $\pm 1\%$.
- Алюминиевый термоблок для пробирок (“Термо-48”, “Биоком”), обеспечивающий температуру нагрева 100–120 °С, с погрешностью ± 1 °С.*
- Весы аналитические, 2-й класс точности по ГОСТ 21104.*
- Миксер (вортекс).
- Колбы мерные, наливные, 2-й класса точности, объем – 500 и 1000 мл по ГОСТ 17170.
- Микропробирки полипропиленовые, объем 1,5 мл, с крышками на замках (фирма “Эппендорф”, Германия), соответствующие ячейкам термоблока.
- Автоматические пипетки на 50–200, 100–1000 мкл по ГОСТ 17170.*
- Эрленмейеровские колбы (125 и 500 мл).
- Наконечники – 10–100 мкл.
- Наконечники – 100–1000 мкл.

Реактивы

Исходные реактивы [2] должны быть свободны от йода. В работе использовались реактивы и деионизированная вода 1-го класса фирмы Fluka (Швейцария). При допустимом следовом содержании йода в реактивах данного метода значение оптической плотности калибровочной пробы с нулевым стандартом при комнатной температуре 25 °С и времени церий-арсенитной реакции 30 мин было $2,0 \pm 0,1 D$.

Реактивы для определения общего йода данным методом представляют собой предварительно приготовленные растворы. Необходимые растворы готовили согласно рекомендациям [2]. Соотношение конечной концентрации мышьяка и церия в реакционной среде составляло 9 : 1 (табл. 1).

Образцы мочи

Для определения концентрации общего йода используют только утреннюю или дневную порцию мочи. Сбор образцов производят в пластмассовые стаканы. Затем пробы переносят в пробирки, которые плотно закрывают и номеруют. Образцы можно хранить при $t = 4-8$ °С не более 5 сут или в замороженном виде не более 3 мес.

При поступлении образцов в лабораторию проводится их сортировка. Обычно составляются партии, которые удобны для определения (количество образцов в партии зависит от интервала добавления

Таблица 1. Конечная концентрация компонентов, входящих в состав реакционной среды

Реагент	Концентрация, ммоль/л
Мышьяк триоксид	36,0
Церий аммоний сульфат	4,0
Натрий хлорид	309,3
Серная кислота	719,4
Аммоний персульфат	160,0
Натрий гидроксид	125,9

в пробы раствора церия сульфата). В нашем случае партия обычно состояла из 90 реакционных пробирок (12 стандартных растворов, 6 контрольных образцов и 72 образца мочи) и при 30-секундном интервале требовала 4 ч работы. Вторая, такая же партия добавляет еще 1 ч, то есть опытный исследователь может в неделю выполнять до 700 анализов.

Контрольные образцы мочи

Представляли собой сливные образцы мочи, в которых проведено определение концентрации йода не менее 5–10 раз в серию и не менее чем в 10 сериях для вычисления средней величины, внутрисерийного и межсерийного CV. Использовались контрольные образцы с 3 концентрациями йода (низкая, средняя и высокая). Стандартный референсный материал SRM® 2670a был получен из Центра по контролю за профилактикой и заболеваемостью (США).

Метод измерения

Определение общего йода в моче выполняется путем фотометрии реакционной среды за фиксированный интервал времени.

Принцип метода

Определение микроколичеств йода (в виде йодид-йона) основано на его каталитическом действии на процесс восстановления церия (IV) мышьяком (III) (реакция Санделла–Кольтхоффа) [5]. Скорость уменьшения интенсивности окраски раствора церия (IV) зависит от содержания йода и измеряется фотометрически при длине волны 405 Нм.

Ход определения

Определение концентрации общего йода в моче выполняют в 2 этапа. Все процедуры проводятся в вытяжном шкафу.

1-й этап: подготовка проб. Подготовка проб заключается в последовательной обработке образцов окислительной смесью (раствор персульфата аммо-

*Приборы и устройства получены при финансовой поддержке представительства Детского фонда ООН в России.

Таблица 2. Точность метода

Вид исследования	Концентрация йода в образце	$M \pm 2SD$, мкг/л	CV, %
Серия (n = 8)	Низкая	$25,3 \pm 0,94$	1,86
	Средняя	$87,4 \pm 1,4^*$	0,85*
	Высокая	$110,7 \pm 1,72$	0,78
Изо дня в день (n = 20)	Низкая	$276,5 \pm 3,86$	0,76
	Средняя	$24,8 \pm 1,66$	3,21
	Высокая	$111,3 \pm 4,64$	2,08
	Высокая	$276,9 \pm 10,02$	1,81

* SRMT 2670a; n = 24.

ния) при повышенной температуре с распадом всех органических компонентов мочи до неорганического состояния с высвобождением связанного йода и переходом его в йодид-йон. Калибровочные растворы йода, контрольные и исследуемые образцы необходимо довести до комнатной температуры и перемешать. В пронумерованные полипропиленовые микропробирки с крышками на замках внести калибровочные, опытные и контрольные образцы (по 0,1 мл) и раствор для обработки проб (0,2 мл). Пробирки закрыть пробками и поместить в термоблок, предварительно нагретый до 100 °С. Время обработки проб составляет 60 мин. По окончании инкубации пробирки открыть, поместить в штатив и оставить в вытяжном шкафу при комнатной температуре на 10–15 мин. Пробирки с закрытыми пробками могут храниться в течение суток до начала определения.

2-й этап: измерение концентрации йода. Подготовить к работе проточный фотометр (прогреть, установить длину волны 405 Нм). Во все пробирки внести арсенидный раствор (по 0,9 мл), перемешать и инкубировать при комнатной температуре 15 мин. Затем, в каждую пробирку поочередно с интервалом в 30 с, внести раствора церия сульфата (по 0,06 мл) и тщательно перемешать. Строго через 30 мин после внесения раствора церия сульфата в первую калибровочную пробу измерить оптическую плотность образцов при 405 Нм с интервалом в 30 с. Температурный режим в период проведения церий-арсенидной реакции и фотометрии должен быть стабильным.

Обработка результатов измерения

Обработку результатов измерения выполняли с помощью градуировочного графика. Для этого вычисляли десятичный логарифм оптических плотностей калибровочных растворов и опытных образцов. Градуировочный график представляет собой зависимость десятичного логарифма абсорбции калибровочных растворов (ось ординат) от концентрации в них йода (ось абсцисс). Зависимость должна носить линейный характер, то есть представлять собой

прямую линию. Для каждой неизвестной пробы концентрация йода вычислялась по логарифму соответствующей абсорбции. Если логарифм абсорбции пробы оказывался ниже, чем в стандартной кривой, этот образец был разведен деионизированной водой и определен повторно. Результаты определения считаются правильными [2], если:

- градуировочный график представляет собой прямую линию. (Если линейность не получается, исследование необходимо повторить с тщательной проверкой каждого этапа определения.);

- значения контрольных проб отличаются не более чем на 10% от их средних значений.

Определение йода в моче методом ICP-MS выполнено в Центре по контролю за профилактикой и заболеваемостью (США). Обработка данных проводилась при помощи программы Microsoft Excel. Рассчитывались коэффициенты и вариации, и линейной корреляции.

Результаты и их обсуждение

Чувствительность микрометода составляет 11 мкг/л (8–14 мкг/л; n = 8; 5 серий). Для определения коэффициентов вариации (CV) в серии и изо дня в день использовали сливные образцы мочи с низким, средним и высоким содержанием йода. Для вычисления серийного CV определение йода проводилось в 8 репликах каждого образца мочи. Для вычисления межсерийного CV использовали результаты определения йода в дубликатах этих образцов мочи в течение 20 различных дней. Коэффициент вариации (CV) не превышал 5% (табл. 2).

Открываемость добавленного йода оценивали, анализируя те же сливные образцы мочи в триплетах с добавлением в них 1 объема деионизированной воды или раствора йодата калия (1000 мкг/л) в 9 объемах мочи. Открываемость добавленного йода составила 98–110% (табл. 3).

Влияние интерферирующих веществ на определение йода в моче оценивали в триплетах образцов мочи с добавлением разных концентраций веществ, которые могут содержаться в моче. Глюкоза, аскор-

Таблица 3. Открытие добавленного йода (n = 3)

[I ⁻] в исходном образце	Добавление деион. воды	Добавление KJO ₃	Открытие йода, мкг/л	Открытие йода, %
25,6	23,1	121,6	98,5	98,5
110,8	100,9	200,8	99,9	99,9
277,9	252,7	353,6	100,9	100,9

Таблица 4. Влияние глюкозы, L-аскорбиновой кислоты и FeNH₄(SO₄)₂ на измерение йода в моче (n = 3)

Йод, мкг/л	Исходный образец	Глюкоза, ммоль/л			L-аскорбиновая кислота, ммоль/л			FeNH ₄ (SO ₄) ₂ , ммоль/л		
		10,0	15,0	20,0	10,0	15,0	20,0	10,0	15,0	20,0
72,0	72,0	71,8	71,7	71,8	71,8	71,9	71,8	71,8	71,6	71,7

биновая кислота и FeNH₄(SO₄)₂ в диапазоне концентраций 0–20 ммоль/л не оказывали влияния на результаты исследования (табл. 4).

При сравнении результатов, полученных данным микрометодом и общепринятым методом [2], коэффициент корреляции составил 0,98 (n = 136). Анализ данных, полученных микрометодом и ICP-MS, в диапазоне концентраций йода от 20 мкг/л до 300 мкг/л выявил линейную зависимость; коэффициент корреляции 0,99 (n = 32).

Таким образом, предлагаемый метод имеет хорошую чувствительность (11 мкг/л), точность в пределах 0–300 мкг/л (CV < 5%), хорошо коррелирует с референсным и общепринятым методами, что позволяет использовать его для определения потребления йода в популяции [2, 4]. Следует отметить, что при этом в 3–4 раза уменьшается расход реактивов и количество токсичных продуктов реакции, а использование одноразовых реакционных пробирок исключает этап их мытья, требующего большого объема деионизированной воды.

Выводы

1. Предлагаемый микрометод определения йода в моче обладает достаточной чувствительностью

и воспроизводимостью и может быть использован для оценки потребления йода в популяции.

2. Метод позволяет уменьшить количество расходуемых реактивов и токсичных продуктов реакции в 3 раза.

3. Данный метод позволяет исключить этап мытья реакционных пробирок и уменьшить расход деионизированной воды.

Список литературы

1. Caldwell K.L., Maxwell C.B., Makhmudov A. et al. Use of inductively coupled plasma mass spectrometry to measure urinary iodine in NHANES 2000: comparison with previous methods // Clin. Chem. 2000. V. 49. P. 1019–1021.
2. Laboratory Guide to the Measurement of Iodine in Urine and Salt. Atlanta (USA), 2003.
3. Ohashi T., Yamaki V., Pandav C.S. et al. Simple microplate method for determination of urine iodine // Clin. Chem. 2000. V. 46. P. 529–536.
4. Pino S., Fang S.-L., Braverman L.E. Ammonium persulfate: a safe alternative oxidizing reagent for measuring urinary iodine // Clin. Chem. 1996. V. 42. P. 239–243.
5. Sandell E.B., Kolthoff I.M. Micro determination of iodide by a catalytic method // Microchim. Acta. 1937. V. 1. P. 9–25.