

Osvrt na metode za određivanje joda u biološkom materijalu

M. Dubravčić

Centralni Higijenski Zavod, Zagreb

UVOD

Otkad je ustanovljeno, da tireoideja sadržava u većem procentu elemenat jod (Baumann, 1895.) i otkad se je funkcija ove žlijezde počela povezivati s metabolizmom joda, kvantitativno određivanje joda u različnom biološkom materijalu postaje važan analitički zadatak. Mnoga pitanja u vezi s poremećajima u funkciji tireoideje, a naročito vrlo aktuelno pitanje etiologije endemične gušavosti, mogu se rješavati samo na temelju pouzdanih analitičkih podataka, od kojih su najvažniji podaci o sadržaju joda u krvi i tireoideji, pa u hrani i u ekskretima.

Podaci iz literature o sadržaju joda u biološkom materijalu u mnogo se slučajeva toliko razlikuju, da se često nameće pitanje njihove vjerodostojnosti. Ne samo da su različitim metodama na istom materijalu dobiveni različiti rezultati, nego i ista metoda u rukama drugog analitičara može dati rezultate, koji se veoma razlikuju. Ove nam činjenice nalažu, da s mnogo opreza pristupamo razmatranju analitičkih podataka.

Od prvih sistematskih radova Chatina (1851.) pa do danas učinjeno je mnogo na usavršavanju metoda za određivanje joda u organskom materijalu. Ipak do danas još nije pošlo za rukom svladati sve teškoće i izraditi sasvim sigurne i pouzdane analitičke metode. Naročito tamo, gdje je sadržaj joda malen (na pr. u hrani), dobivaju se često i uz veliko zalaganje analitičara rezultati sumnjive vrijednosti. Kako se sada i u našoj zemlji prilazi organiziranoj akciji za suzbijanje endemične gušavosti i u isto vrijeme nastoji, da se cijeli problem što više naučno osvijetli, smatrao sam korisnim da se osvrnem na dosadašnje metode za određivanje joda. U ovom sam referatu nastojao dati pregled i kritiku tih metoda, naročito s obzirom na točnost i graničnu osjetljivost pojedinih analitičkih operacija. Iako je ovaj osvrt izrađen pretežno na osnovu podataka iz literature, a tek manjim dijelom na osnovu vlastitih laboratorijskih iskustava, smatram ipak, da će zajedno s popisom literature, koji prilažem, moći poslužiti našim stručnjacima, naročito kemičarima, kao orijentacija u postavljanju i rješavanju analitičkih problema određivanja joda.

KARAKTERISTIKE ODREĐIVANJA JODA

Bitne karakteristike analize joda u biološkom materijalu jesu: (1) velike varijacije materijala u sadržaju joda, (2) vrlo male količine joda, koje često određujemo, i (3) nestabilnost elementarnog joda.

Kod kritičkog razmatranja rezultata dobivenih suvremenim metodama za određivanje joda moramo, u prvome redu, imati pred očima vrstu i porijeklo materijala, o kojem se radi, s obzirom na vrlo velike razlike u sadržaju joda. Kao i kod svakog mjerenja tako i ovdje možemo dobiti realne rezultate samo onda, ako su pogreške mjerenja manje od veličina, koje mjerimo.

Da bismo pokazali, u kojim približnim granicama varira sadržaj joda, navest ćemo nekoliko primjera:

Količina joda u mg/kg suhe tvari	Biološki materijal
1) od 100—10.000	morske biljke, tireoideja (oko 1500 mg),
2) „ 1— 10	morske životinje (ribe, raci, školjke),
3) „ 0,1— 1	krv, mlijeko, a tek u rjeđim slučajevima i životinjsko meso, te neke biljke,
4) manja od 0,1	veći dio namirnica biljnog i životinjskog porijekla.

Kako ćemo vidjeti u toku daljeg izlaganja, pogreške većine današnjih metoda prelaze 0,1 mg po kilogramu suhe tvari. Prema tome, realne rezultate možemo očekivati za prvu i drugu grupu, rezultate relativne točnosti za treću grupu, dok kod materijala, koji pripada u četvrtu grupu, ne možemo, uglavnom, očekivati realnih rezultata. A upravo je biološki materijal treće i četvrte grupe interesantan s medicinskog gledišta.

Glavne teškoće, koje se pojavljuju u toku analitičkog postupka, su teškoće pri procesu razgradnje (mineralizacije) organske tvari. Razgradnju organske tvari treba do kraja (kvantitativno) provesti, da bi se samo određivanje joda moglo izvesti bez smetnji. Tamo, gdje je ovaj element prisutan u vrlo malim koncentracijama, potrebno je mineralizirati razmjerno veliku količinu organske tvari. Pritom je vrlo teško jod kvantitativno vezati i spriječiti gubitke. Osjetljivim reakcijama, kojima određujemo jod, mogu, nadalje, smetati i anorganske soli, koje zaostaju kao produkti mineralizacije. Isto tako mogu smetati i razmjerno velike količine kemikalija, koje se dodaju pri mineralizaciji. Utjecaj spomenutih gubitaka ili smetnji na rezultat bit će to značajniji, što manje joda imamo u materijalu, koji ispituujemo.

Dalje moramo, upravo zbog malih količina joda, posvetiti izvanrednu brigu i tome, da se uzorak prije ili za vrijeme analize ne bi onečistio jodom ili drugim tvarima, koje smetaju pri određivanju joda.

Već iz ovoga, što smo dosada spomenuli, jasno je, da u centrima, koji će proučavati problem gušavosti i vršiti serijske analize joda u različnom materijalu, moramo osigurati za to specijalne uvjete rada. Iskustva mnogih autora potvrđuju, da je za postizavanje pouzdanih rezultata potrebno osigurati:

a) *potpunu izolaciju čitavog analitičkog postupka, jer se točni rezultati ne mogu postići, ako se analiza izvodi u blizini drugih kemijskih procesa, od kojih prijete onečišćenje (plinovi, dim, prašina ili čak jod);*

b) *dobro uveden analitički postupak sa svim potrebnim materijalom i izvježbanim analitičarom;*

c) *savršeno čist laboratorijski pribor, kao i u tu svrhu naročito pročišćene reagencije.*

ANALITICKE METODE I NJIHOVE FAZE

Tri osnovne faze u obradi materijala razabiramo kod većine dosad poznatih metoda za određivanje joda. Najprije dolazi razgradnja organske tvari oksidacijom, zatim slijedi odjeljivanje joda od produkata oksidacije, te konačno, kao treća faza, samo određivanje joda jednom od metoda anorganske kvantitativne analize.

Iako u svakoj pojedinoj metodi čine ove faze povezanu cjelinu, koja bi se jedva smjela fragmentarno promatrati, ipak ćemo, radi boljeg pregleda nad cjelokupnim područjem analize joda, opisati svaku fazu napose i iznijeti način, na koji pojedini autori rješavaju probleme dotične faze.

I. Razgradnja organske tvari

a) Otvoreno sagorijevanje

Najjednostavniji način razgradnje organske tvari je obično otvoreno spaljivanje materijala. Ovaj način ne dolazi u našem slučaju u obzir, jer neizbježno dovodi do velikih gubitaka. Jodni spojevi, naročito organski, nepostojani su kod viših temperatura i raspadanjem oslobađaju u većini slučajeva elementarni jod. Ovaj element već i kod sobne temperature pokazuje visoku tenziju para, pa je razumljivo, da kod viših temperatura dolazi do gubitaka. Veličina ovih gubitaka zavisi kako od fizičkih i kemijskih osobina materijala, koji gori, tako i od prilika, koje vladaju pri sagorijevanju (temperatura, brzina zagrijavanja, cirkulacija zraka i t. d.). Sve ove uvjete ne možemo uvijek definirati niti reproducirati, pa je jasno, da će i veličine gubitaka varirati *od slučaja do slučaja*. Iako su neki autori²⁴ dobili zadovoljavajuće rezultate spaljivanjem krumpira u mufolnoj peći kod 450°C, ipak se ovaj način spaljivanja nije mogao primijeniti na drugi materijal, kao na pr. na žitarice ili mlijeko.³⁵

Nije nam poznato, da bi se bilo koja od novijih metoda služila ovim načinom razgradnje organske tvari.

b) Spaljivanje s alkalijama

Drugi način razgradnje organske tvari je spaljivanje (»taljenje«) s alkalijama. Alkalije vežu jod kemijski te tako smanjuju gubitke. Već je francuski kemičar Chatin upotrebio kalium-karbonat pri spaljivanju uzoraka hrane, u kojoj je želio odrediti jod. Vrsta i količina alkalija, koju su primijenili različiti analitičari, dosta se razlikuje, što zavisi, uz ostalo, i od materijala, koji se spaljuje.

Hilty i Wilson¹⁴ na 1 g suhe tvari tireoideje upotrebljavaju oko 470 mg-ekvivalenta natrium-karbonata; Mc Cullagh²⁵ na istu količinu organske tvari seruma upotrebljava oko 130 mg-ekv. kalium-hidroksida, a Sappington⁴¹ oko 40 mg-ekv. natrium-karbonata. Za vezanje joda u 1 g pulveriziranih algi upotrebljava Čmelik⁷ 45 mg-ekv. kalium-hidroksida. Harvey¹³, koji je postavio standardnu englesku metodu, smanjuje još više količinu alkalija. Pri određivanju joda u mlijeku, krvi i biljnom materijalu on upotrebljava oko 10 mg-ekv. natrium-hidroksida po 1 g suhe tvari, ali ističe, da to smanjenje ne smije ići ispod 6 mg-ekv. zbog opasnosti, da dođe do gubitaka joda.

Temperature spaljivanja, što ih navode pojedini autori, dosta se razlikuju, iako su u svakom propisu postavljene kao točno određene maksimalne temperature. Dok Mc Cullagh ne prelazi 385°, dotle Sappington ide i do 600°, iako pritom upotrebljava mnogo manju količinu alkalija.

Cini se, da je prethodna saponifikacija masti važna za smanjivanje gubitaka. Tako Almquist i Given¹ pri spaljivanju jaja s povišenim sadržajem joda navode, da se gubici joda mogu svesti na vrlo mali procenat, ako se prije toga izvrši saponifikacija masti kuhanjem uzorka u alkoholnoj lužini 24 sata. I Harvey vrši saponifikaciju masti u mlijeku, koje ostavi da stoji s lužinom 6 dana na sobnoj temperaturi.

Pri spaljivanju organske tvari s alkalijama dolazi do nekih teškoća. Organska se tvar često ne spali kvantitativno, pa nastaju smetnje i pogreške pri određivanju joda u posljednjoj fazi. Teškoće nastaju naročito onda, kad smo zbog malih količina joda primorani spaliti veću količinu organske tvari uz više alkalija. Tada je potrebno ponavljano izluživanje pepela i sagorijevanje preostale organske tvari, što sve zajedno odugovlači proces. Tako se na pr. samo za izvedbu faze spaljivanja mlijeka (s prethodnim osapunjenjem masti) po Harveyu utroši oko 10 radnih dana.

Da bi se ubrzalo sagorijevanje materijala, dodaju neki autori oksidanse, kao na pr. kalium-nitrat. Hilty i Wilson¹⁴ tvrde međutim, da se ostaci ovakvog oksidansa daju teško odstraniti i da kod metoda, koje upotrebljavaju ovaj način razgradnje^{12, 17, 32}, dolazi zbog toga često do pogrešaka.

Česti izvor pogrešnih rezultata pri ovom načinu spaljivanja može biti i u tome, što alkalije obično sadržavaju neke male količine joda. Za analize organske tvari, u kojoj se očekuju minimalne količine ovoga elementa, potrebno je lužinu prije posebno očistiti. Harvey¹³ je opisao dva takva načina čišćenja lužine: ili elektrolizom (specijalni aparat sa živinom elektrodom) ili deseterokratnom ekstrakcijom s acetonom, koji ne sadržava joda.

Iako alkalije pri spaljivanju vežu veći dio joda, ipak nam ni one ne osiguravaju potpuno zadržavanje joda³⁰. Harvey je izradio metode za određivanje joda u biljnom materijalu, krvi i mlijeku, ali se iz njegovih rezultata vidi, da dolazi uvijek do izvjesnih gubitaka u toj fazi rada. Isti autor ističe, da se gubici joda mogu jako povećati spaljivanjem većih količina organske tvari. Zato on smatra, da se ovim načinom spaljivanja mogu vršiti analize samo onog materijala, koji sadržava barem 0,1 mg ili više joda po kg suhe tvari. Fellenberg, koji je mnogo radio na određivanju joda ovim načinom spaljivanja, spominje¹⁰, da je morao izvesti uvijek veći broj analiza istog uzorka, jer su se rezultati obično dosta razlikovali. Kao najpouzdanije vrijednosti uzimao je on od svih dobivenih rezultata najveće. Fellenberg navodi i to, da su gubici bili veći tamo, gdje je materijal sadržavao više natrium-klorida. Zbog svih tih nedostataka spaljivanja s alkalijama spomenuti autor prelazi 1930. g.⁹ na spaljivanje u zatvorenom sistemu po uzoru na Mc Clendona.

c) Spaljivanje u zatvorenim uređajima

Kako spaljivanje s alkalijama ne dovodi do potpunog vezanja joda, nastojali su neki autori da izrade aparature, gdje bi organski materijal sagorijevao u zatvorenim uređajima. Takvi uređaji osiguravaju potpuno zadržavanje joda i zbog toga

su zgodni naročito tamo, gdje treba spaliti veću količinu organske tvari ili gdje imamo takvu tvar, kod koje spaljivanje u otvorenim posudama neminovno dovodi do većeg gubitka joda.

Mc Clendon²²⁻²⁶ je sa svojim suradnicima od 1923. g. dalje usavršavao način spaljivanja u cijevi od silicium-dioksida («silica-tube») u struji kisika. Sagorjevne plinove provodio je kroz apsorpcione posude s lužnatom otopinom. Za razliku od taljenja s alkalijama ovdje spaljivanje ide dosta brzo i uz veće količine organske tvari. Pače, nekoliko se kilograma hrane može spaliti u većim cijevima (cijevi imaju koji put i preko 1 metar duljine i 10 cm promjera). Međutim, i ovdje je potrebno spaljivanje izvesti u dvije etape: ostatak nakon isparavanja apsorpcione tekućine mora se ponovo spaliti zbog preostale, nesagorjele organske tvari. Neki autori prigovaraju, da isparavanje apsorpcione tekućine, kao i vode, kojom je ispran aparat, dosta dugo traje, a naročito upozoravaju, da pritom može doći do gubitaka joda¹⁸. Ove gubitke pripisuju prisutnosti nitrita, koji nastaju pri visokoj temperaturi u cijevi, oksidacijom dušika iz zraka. Nitriti oksidiraju jodide do elementarnog joda, koji se gubi pri isparavanju apsorpcione tekućine.

Posljednji tip Mc Clendonove aparature, koliko smo iz pristupačne literature mogli doznati, datira iz 1938. g.²⁷ Tu je spomenuta aparatura već znatno dotjerana, smanjena i prilagođena za spaljivanje manjih količina materijala — oko 5 g. Spaljivanje se vrši u platinskoj cijevi, koja katalitički pospješuje oksidaciju. Cijev se prije toga isplahne ugljičnim dioksidom, da se odstrani zrak, a s njime i dušik, koji stvara nitrite. Za vrijeme sagorijevanja pužni transporter postepeno nadodaje materijal. Sagorjevni se plinovi vode kroz apsorpcionu tekućinu (0°C), u kojoj se uz lužinu nalazi i natrium-azid. Ovaj azid ima zadaću da razgradi eventualno stvorene nitrite i da u isto vrijeme reducira elementarni jod do jodida. Autor navodi, da se po njegovoj metodi mogu određivati još uzorci sa 0,2 µg (= 0,0002 mg) joda.

Da je ovaj način spaljivanja vrlo prikladan, tvrde mnogi autori, koji su ga prihvatili uz neke izmjene.^{10, 31, 35, 45}

Ovdje moramo spomenuti i neke druge mogućnosti spaljivanja u zatvorenim sistemima. Tako je Karns¹⁶ konstruirao naročitu bocu, u kojoj se proces spaljivanja odvija nešto sporije i može se regulirati, tako da su se mogli upotrebiti i mnogo manji uređaji za apsorpciju od uređaja po Mc Clendonu.

Konačno ćemo spomenuti i pokušaj spaljivanja u kalorimetrijskoj bombi u atmosferi kisika. Spector i Hamilton⁴³ stavljaju u bombu nešto lužine, koja treba da apsorbira i veže jod. Isti autori zahtijevaju, da suhi uzorak materijala, koji se spaljuje, sadržava barem 2—5 µg joda. Ako uzmemo u obzir, da je maksimalno dopušteno opterećenje bombe, u kojoj su spomenuti autori vršili spaljivanje («Parr-oxygen bomb»), dano sa 1,5 g, znači, da je ovaj način određivanja prikladan tek za materijal sa oko 2 mg joda po kilogramu suhe tvari. Čini se, da se materijal s manjim količinama joda ne može spaljivati ovim načinom^{22,*}).

d) Razgradnja mokrim putem

»Mokro sagorijevanje« je razgradnja organske tvari u kiseloj sredini pomoću jakih oksidansa, kao kromne kiseline, kalium-permanganata ili vodikova peroksida. Ovaj način ima tu prednost, da se vrši u zatvorenom sistemu, t. j. u staklenoj posudi, pa nema bojazni, da bi jod mogao pobjeći.

Mnogi autori izradili su metode i konstruirali aparature, u kojima vrše mokro saogrijevanje, a i kasnija destilacija joda. Tako Pfeiffer³⁴ upotrebljava vodikov peroksid i sumpornu kiselinu, te jednu modifikaciju Corleisove aparature s apsorpcionim uređajem. Peroksid u sumporno kiseloj sredini oksidira organsku tvar i u isto vrijeme iz organskih i anorganskih spojeva oslobađa elementarni jod. Oslobođeni jod destilira se i hvata u alkaličnu otopinu u predlošku. Međutim razgradnja organske tvari s peroksidom ne ide do kraja. Teškoće se javljaju naročito kod oksidacije masti, jer njihovih razgradni produkti destiliraju zajedno s jodom. Da upotpuni spaljivanje, spomenuti autor vodi destilacione pare kroz užarenu cijev, gdje izgaraju i posljednji ostaci organske tvari.

*) To smo mogli potvrditi spaljivanjima hrane u kalorimetrijskoj bombi, koja su vršena na našem Zavodu. Pritom smo u uzorcima od 1 g, u koje smo dodali 30 µg joda, mogli ovaj element određiti približno kvantitativno. Pri dodavanju manjih količina joda relativni su se gubici veoma povećali.

Leipert²⁰ je izradio dotjeraniju aparaturu, a za oksidaciju upotrebljava krom-trioksid sa sumpornom kiselinom. Ovaj način razgradnje upotrebljava se u mnogim novijim metodama^{2, 3, 4, 5, 8, 15, 21, 44, 47}.

Riggs i Man³⁶ smatraju oksidaciju s krom-sumpornom kiselinom nezgodnom, jer se po njihovu iskustvu češće događalo, da krom prijeđe u predložak i da pravi smetnje pri daljem određivanju. Zbog toga ovi autori vrše oksidaciju s kalijum-permanganatom, koji i ako prijeđe u predložak, ne će praviti smetnje, budući da se destilatu kasnije dodaje permanganat (po Groaku) za oksidaciju joda. Isti način oksidacije upotrebljavaju i Spector i Hamilton⁴² za razgradnju ostataka organske tvari poslije spaljivanja u kalorimetrijskoj bombi. Ovi autori ističu, da je permanganat prikladniji od krom-trioksida i zbog toga, jer se lakše čisti od tragova joda.

Za mokro spaljivanje izrađene su, kako vidimo, mnoge metode. Sve one imaju, pored svoje zajedničke prednosti da se vrše u zatvorenom sistemu, i svojih zajedničkih nedostataka. Jedan je taj, što je taj način razgradnje nužno vezan na kasniju destilaciju joda, a time i na sve nedostatke ove vrlo osjetljive i nesigurne operacije. Staklene aparature za izvođenje spaljivanja i destilacije joda često su dosta komplicirane i nezgodne za rukovanje. Jedan od čestih prigovora je nepotpuna razgradnja masti, koje su otporne i prema najjačim oksidansima. Ova posljednja smetnja dolazi naročito do izražaja u materijalu, koji sadržava više masti, kao što je to na pr. mlijeko ili meso.

Mokro spaljivanje danas se mnogo primjenjuje za određivanje joda u krvi. Ovaj način razgradnje nije, međutim, moguće primijeniti na materijal s manjim količinama joda zbog toga, što bi se morali upotrebiti veći uzorci, a time i suviše velike količine reagensa za oksidaciju.

II. Odjeljivanje joda od produkata oksidacije

Odjeljivanje joda provodi se tamo, gdje bi produkti oksidacije svojom velikom količinom ili svojim kemijskim svojstvima smetali reakciji, kojom na kraju određujemo jod.

a) Destilacija

Odieljivanje destilacijom potrebno je provesti nakon svakog mokrog spaljivanja. Brojne metode, kojima se izvodi ovaj način spaljivanja i odjeljivanja joda, razlikuju se među sobom često samo u nekim detaljima. Autori su ovih metoda redovno došli do loših iskustava s ranijim izvedbama destilacije, pa nastoje da nekim izmjenama u konstrukciji aparata, tehnicima rada ili izboru kemikalija povećaju sigurnost provođenja ove osjetljive operacije.

Jod, koji je pri razgradnji organske tvari jakim oksidansima (krom-trioksidom ili permanganatom) oksidiran na viši oksidacioni stupani (jodat ili perjodat), treba reducirati do elementarnog joda i zagrijavanjem predestilirati u predložak s alkaličnom otopinom. Glavni problem kod redukcije jodata je taj, da se dobrim izborom vrste i količine redukcionog sredstva postigne upravo onaj redukciono-oksidacioni potencijal otopine, koji omogućava, da se sav jod prevede u elementarno stanje. Potrebno je, naime, da se reducira suvišak oksidansa, ali i da u isto vrijeme ne dođamo previše reducensa, jer bi se i jod mogao reducirati do nehlapljivog jodida. Od potencijala otopine, kod kojega se vrši destilacija, zavisi i to, hoće li se izlučiti u elementarnom stanju i drugi halogeni, koji mogu također destilirati i praviti smetnje kod konačne determinacije joda.

Leipert²⁰ vrši redukciju jodata s arsenastom kiselinom. Čini se ipak, da se ovaj način redukcije nije pokazao dobrim, jer se novije metode služe drugim reducensima.

Riggs i Man nakon oksidacije s permanganatom reduciraju oksalnom kiselinom. Isti reducens primjenjuju Talbot i suradnici⁴⁶. Nezgoda je, da se pri ovom načinu redukcije stvaraju veće količine ugljikova dioksida.³⁵

Druga, prilično brojna grupa autora vrši redukciju s fosforastom kiselinom. Tako ovaj način redukcije upotrebljavaju Fashena i Trevorrow, kao i mnogi drugi autori^{2, 4, 5, 15, 21, 47} poslije razgradnje organske tvari s krom-sumpornom kiselinom, a neki opet i poslije razgradnje bombom i permanganatom⁴³. Prema izjavama samih autora ovih metoda gubici kod destilacije bili bi do 15%, ali su koji puta i veći. Tako Chaney⁴ navodi, da je radeći s jednom određenom fosforastom kiselinom dobi-

vao samo oko 25% od dodanog joda. Tom prilikom, kaže autor, pomogao mu je dodatak vodikova superoksida. Ali deset godina kasnije⁵ ovaj autor još uvijek nije zadovoljan s fosforastom kiselinom. On spominje arsenastu kiselinu i peroksid kao eventualne dodatke fosforastoj kiselini, ali ostavlja problem otvoren obećavajući, da će o tome još pisati. Interesantna je tvrdnja Thomasa i suradnika⁴⁸, da su Charneyom metodom destilacije dobili niske i promjenljive rezultate, koji su se kretali od 10 do 80%. Na istom se mjestu navodi, da su i neki drugi autori došli do sličnih iskustava.

Ovi navodi, uz neka iskustva, koja su prošlih godina stečena i u našem Zavodu, dovode nas do zaključka, da su mokro spaljivanje i naknadna destilacija vrlo nesigurne operacije pri određivanju joda.

Od toga moramo izuzeti destilaciju po McClendonu²⁷, koja se provodi pod drugim okolnostima. Tu se, kako smo prije čuli, spaljuje organska tvar u cijevi, a jod u formi jodida zaostaje u apsorpcionoj tekućini. Iz ove se tekućine razmjerno slabim oksidansom — feri-kloridom i sumpornom kiselinom — oslobađa jod i destilira u predložak s otopinom bromne vode. Prema rezultatima, koje je spomenuti autor postigao svojom metodom, čini se, da faza destilacije daje ovdje bolje rezultate nego u drugim metodama. Razgradnja se je ovdje provela u cijevi, a ne u destilacionoj tikvici, pa nema suviška reagensa (oksidansa ili reducensa), koji bi ometao destilaciju. Slične uvjete kod destilacije postiže i McCullagh³⁰, ali on prije provodi razgradnju organske tvari taljenjem s alkalijama.

b) Ekstrakcija alkoholom

Drugi način odjeljivanja joda od produkata razgradnje organske tvari je ekstrakcija alkoholom. Ona se provodi nakon spaljivanja ondje, gdje male količine joda treba odijeliti od velike mase alkalija i produkata sagorijevanja. Harvey je pokazao, da se jodidi mogu kvantitativno ekstrahirati alkoholom iz zasićene vodene otopine kalium-karbonata. Isti autor, međutim, upozorava, da se isparavanjem alkohola stvaraju aldehidne smole, koje zaostaju kao neisparivi ostatak i koje treba spaliti posebno. Ovo spaljivanje dovodi do mogućnosti gubitka joda, koji nije više vezan na veliku količinu alkalija. Spomenuti autor postavio je točne uvjete, pod kojima se mora vršiti ekstrakcija alkoholom, isparavanje alkohola i spaljivanje ostatka, da bi se postigli zadovoljavajući rezultati.

Neki prigovaraju alkoholnoj ekstrakciji da je nepotpuna³⁶. Vjerojatno je to posljedica oksidacije jednog dijela joda na jodat za vrijeme spaljivanja, naročito onda, kad se pri spaljivanju upotrebljavaju oksidansi. Jodati, naime, za razliku od jodida, nisu topljivi u alkoholu i ne mogu se, prema tome, ekstrahirati.

Treba spomenuti, da ima pokušaja, da se kombiniraju oba načina odjeljivanja joda. Tako McCullagh poslije spaljivanja s alkalijama provodi najprije ekstrakciju alkoholom, a zatim, nakon isparavanja alkohola i spaljivanja ostatka, još i destilaciju. Jasno je, da se u tom kombiniranom postupku sumiraju ne samo prednosti nego i nedostaci pojedinih operacija. Ne raspoložemo, nažalost, detaljnijim podacima o uspjehnosti ove metode.

Postupak ekstrakcije možemo u nekim slučajevima i izostaviti. To je moguće onda, kad materijal, koji ispituujemo, sadržava veće količine joda. Tako imamo, na primjer, metode za određivanje joda u morskim biljkama⁷, u tireoideji^{14, 41} ili u jajima s naročito visokim sadržajem joda¹. Ovdje se odmah poslije spaljivanja s alkalijama i neutralizacije prelazi na konačno određivanje joda, jer nema bojazni, da bi produkti sagorijevanja relativno male količine organske tvari mogli smetati.

III. Određivanje joda

Nakon potpune razgradnje organske tvari i nakon odjeljivanja joda od produkata razgradnje dolazimo konačno i do treće faze ove analize — do samog određivanja joda. Prethodne dvije faze služe samo zato, da bi se jod iz organskog materijala doveo u onu formu, u kojoj ga možemo odrediti jednim od uobičajenih postupaka anorganske kvantitativne analize. Iako su analitički postupci za određivanje joda u anorganskoj formi, uglavnom, već prije postavljeni, ipak ih moramo ovdje ukratko razmotriti, jer se na ove postupke postavljaju u našem slučaju ekstremni zahtjevi s obzirom na osjetljivost i točnost. Osim toga upravo su zbog određivanja joda u biološkom materijalu i bile usavršene mnoge metode za anorganski jod.

a) Titracija tiosulfatom

Najčešći je način određivanja joda po Winkleru⁵², odnosno po Fellenbergu⁹: oksidacija jodida s klorom, odnosno bromnom vodom na jodat, koji oslobađa ekvivalentnu količinu joda iz suviška dodanog kalijum jodida, te titracija oslobodenog joda tiosulfatom uz škrob kao indikator. Ovim postupkom oksidacije (klorom ili bromom) dobivamo šest puta veću količinu joda za titraciju od one, koja se je prvotno nalazila u uzorku.

Harvey¹³ je ispitivao utjecaj različitih faktora na oksidaciju joda s bromnom vodom. On je ustanovio, da volumen tekućine, aciditet, način i duljina zagrijavanja te količina bromida, koji se stvaraju redukcijom broma mogu jako utjecati na ishod oksidacije. Autor drži, da i prašina ili sumporni dioksid u laboratorijskoj atmosferi mogu djelovati reduktivno na jednu kiselinu i uzrokovati gubitke joda. I količina nitrita igra značajnu ulogu. Nitriti se redovno stvaraju pri spaljivanju u atmosferi kisika ili tamo, gdje se kao oksidans upotrebljavaju nitriti. Vrlo male količine nitrita mogu povoljno utjecati na oksidaciju joda, jer oksidiraju jodide do elementarnog joda, koji se dalje oksidira s bromom³⁷. Veće količine nitrita, naprotiv, dovode do gubitka joda³⁵. Mnogo zavisi i od odnosa količine nitrita u usporedbi s količinom broma. Suvišak broma smanjuje gubitke, koji bi nastali zbog prisutnosti nitrita¹³. Da bismo izbjegli dodavanje broma u suvišku i zatim njegovo dugotrajno iskuhavanje, uklanjamo radije prisutne nitrite kvantitativno još prije oksidacije s bromom. To postizemo natrijevim azidom ili bisulfitom. Također je vrlo važno, da u tekućini, koja se obrađuje bromnom vodom, ne bude ni tragova organske tvari, jer se u tom slučaju dobivaju pogrešni rezultati.^{7, 13}

Upotreba klorne vode kao oksidansa ima nekih prednosti u slučaju prisutnosti nitrita⁴⁵, ali zato ima i mnoge nedostatke (potreba svježije otopine, nesigurna titracija, oksidacija prisutnih bromida i t. d.)³⁵

Zbog svih spomenutih teškoća postupak oksidacije joda bromnom, odnosno klornom vodom traži detaljno propisanu tehniku rada.

Oksidacijom dobiveni jodat izlučuje nam iz suviška dodanog kalium-jodida šesterostruku količinu elementarnog joda. Taj titriramo otopinom tiosulfata uz škrob. Upotrebljavamo obično N/1000 otopinu tiosulfata i mikrobiretu, jer već 0,01 ml ove otopine odgovara količini od 0,212 μg joda. Rezumljivo je, da bi bilo koji oksidirajući agens, koji bi se pored jodata našao u otopini, mogao povećati rezultat titracije (na pr. Fe^{++} , Cl_2 , Br_2 , BrO_3' , NO_3' , i t. d.), a isto tako bi reduktivne tvari mogle sniziti rezultat (na pr. organske tvari, NO_2' , Br' i t. d.). I bez ovih izvanrednih utjecaja rezultat je titracije obično nešto niži, pa se uzima korekcija. Po Reithu³⁵ je ona 0,1 μg joda na svaki mililitar tekućine nakon titracije, a po Harveyu samo 0,06 μg po mililitru. Kako se obično radi barem sa 2 ml tekućine, to redovna korekcija rezultata titracije iznosi oko 0,2 μg . To znači, da jod tek u toj koncentraciji (povećanoj 6 puta postupkom oksidacije) daje boju sa škrobom.*

Veličina korekcije kao i mnoštvo izvora pogrešaka kod ovog načina određivanja joda dovodi nas do zaključka, da moramo s rezervom gledati na rezultate, koji nisu veći od nekoliko desetina mikrograma joda.

Mjesto oksidacije s klorom, odnosno bromnom vodom upotrebljava se u novije vrijeme mnogo Groakov način oksidacije s kalium-permanganatom^{11, 43}. Princip ove metode je slijedeći: jod se permanganatom i sumpornom kiselinom oksidira na jodat, a zatim se suvišak permanganata ukloni pomoću dušične kiseline, a ova opet pomoću uree (karbamida). Iako je ovaj način oksidacije prema dosadašnjim rezultatima dosta siguran, pojavljuju se neke smetnje zbog velike količine soli, koje unosimo ovim postupkom. Tako se sada smije upotrebljavati samo vrlo mali višak kalium-jodida, jer se inače zbog prisutnosti soli dobiva sa škrobom nesiguran prelaz plave boje u bezbojno (crvenkasta međunijansa)⁵⁰. Izlučeni jod titrira se i ovdje sa tiosulfatom^{36, 43} ili se boja jod-škroba mjeri fotoelektričnim kolorimetrom⁴⁶. Niti ovim se načinom, međutim, ne mogu određivati količine joda manje od 0,2 μg , jer i ovdje o tom odlučuje osjetljivost reakcije jod-škrob.

Hilty i Wilson izvode titraciju joda sa ceri-sulfatom (uz o-phenantrolin), da bi time izbjegli pogreške, koje nastaju kod titracije s tiosulfatom zbog djelovanja pre-

*) Ovu graničnu osjetljivost reakcije jod-škrob teško je postići. Praktično možemo uzeti, da se boja javlja kod 0,3—0,4 μg jodatnog joda u 2 ml tekućine.

ostalih oksidacionih agensa na višak kalium-jodida. Ipak se ni ovom metodom, iako sigurnijom, ne postiže bolja granična osjetljivost, to više, što ovdje prije ne povećavamo oksidacijom količinu joda.

Slično je, čini se, i s drugim reakcijama, koje dolaze u obzir za određivanje joda. To je titracija arsenastom kiselinom, Sb^{+++} , Sn^{++} , CNS' , zatim formaldehidom, aldazama, acetonom ili hidrokintonom⁶.

McClendon provodi elektrometrijsku titraciju joda s tiosulfatom, koja je prema navodima autora i do 1000 puta osjetljivija od obične titracije uz škrob.

b) Fotometriiranje otopina joda

Drugu mogućnost određivanja joda pruža intenzivna boja ovog elementa u organskim otapalima. I ovdje se obično provodi oksidacija joda na jodat, kako bi se dobile veće vrijednosti. Izlučeni jod se ekstrahira ugljikovim bisulfidom, ugljikovim tetrakloridom ili kloroformom i zatim uspoređuje kolorimetrijski s poznatim standardima^{35, 1, 15}. Iako nam ovaj način omogućuje neposredni uvid u prisutnost joda, osjetljivost tih metoda nije tako velika kao osjetljivost onih, koje se temelje na boji jod-škrob. Međutim je apsorpcija otopina joda u ultravioletnom području spektra obično veća nego u vidljivom području. Tako Custer i Natelson⁶ pronalaze, da otopina joda u toluolu, benzolu i otopini kalium-jodida najjače apsorbira upravo u ultravioletnom području. Iako autori provode prije još i oksidaciju joda permanganatom, najmanja količina joda, koja se može odrediti ovom metodom, ipak nije manja od 0,2 μg .

Slične rezultate postigli su i Shahrok i Chesbro⁴², koji u ultravioletnom području određuju apsorpciju otopine joda u ugljikovu tetrakloridu.

c) Katalitička metoda

Osim spomenutih klasičnih načina određivanja joda (titrimetrijskih, odnosno kolorimetrijskih) upotrebljava se posljednjih desetak godina jedna izvanredno osjetljiva kinetička metoda. To je redukcija ceri-sulfata s arsenastom kiselinom, gdje jod igra ulogu katalizatora.^{2, 4, 5, 19, 38, 41, 48} Ovu reakciju su Sandell i Kolthoff^{39, 40} ispitali i prilagodili za kvantitativno određivanje joda. Chaney je ovu reakciju primijenio na određivanje joda u krvi. Ovaj autor je i mnogo tehnički dotjerao mjerenje stupnja redukcije ceri-sulfata, tako da je konstruirao specijalni fotoelektrični kolorimetar s ugrađenim termostatom i konstantnom automatskom registracijom promjene boje reakcione tekućine.

Metodom, koja je izrađena na ovom Zavodu,^{*)} a koja se također osniva na katalitičkoj redukciji ceri-sulfata, postignuta je uz jednostavnija tehnička pomagala osjetljivost od 0,002 μg u 10 ml reakcione tekućine.

ZAKLJUČAK

Osjetljivost elektrometrijske titracije joda s tiosulfatom, kao i osjetljivost katalitičke redukcije ceri-soli tolike su, da se mogu određivati količine joda, koje su manje od 0,01 μg . Kad ne bi bilo teškoća i pogrešaka u prethodnim fazama obrade materijala, mogli bismo određivati jod i u materijalu, koji smo na početku svrstali u četvrtu grupu.

0,01 μg joda, koji bismo dokazali u, recimo, 1 g suhog uzorka odgovaralo bi količini od 0,01 mg u 1 kg suhog materijala.

Gubici, međutim, koji nastaju bilo pri spaljivanju s alkalijama, odnosno pri naknadnoj ekstrakciji alkoholom, bilo kod destilacije, koju provodimo nakon mokre razgradnje, toliki su, da nam nikako ne dopuštaju da u punoj mjeri iskoristimo točnost posljednje faze određivanja joda.

Spaljivanje organske tvari u platinskoj cijevi i destilacija joda iz apsorpcione tekućine — onako, kako to izvodi McClendon — čini se, da je do danas najbolji način izvođenja prvih dviju faza.

Spomenuti autor navodi, da je mogao na taj način odrediti još 0,2 μg joda. Ako uzmemo, da je za analizu bilo upotrebljenog 5 g suhog uzorka, dobili bismo preračunano na 1 kg suhog materijala 0,04 mg joda.

*) Metoda će uskoro biti objavljena na drugom mjestu.

Nemamo, nažalost, dovoljno podataka drugih autora o tome, koliko se je ova metoda pokazala pouzdanom pri određivanju tako malih količina joda.

Ostavljajući neriješenim pitanje točnosti McClendonove metode možemo općenito uzeti, da su pogreške pri određivanju joda u biološkom materijalu veće od 0,1 mg po kilogramu suhe tvari i da se zbog toga suvremenim metodama ne mogu postići realni rezultati kod određivanja joda u materijalu četvrte grupe.

Nasuprot tome, pogreška od 0,1 mg (na kg s. tv.) beznačajna je za materijal, koji sadržava razmjerno mnogo joda (morske biljke i životinje, tireoideja), dakle onaj, koji smo svrstali u prvu i drugu grupu. Analize ovakvog materijala daju zadovoljavajuće rezultate. Iako su ovi rezultati dobiveni različitim metodama, oni se razlikuju obično za svega 10 ili 20%^{1, 7} pa smo sigurni, da su vrijednosti realne.

Prema rezultatima analiza, koje su dosada izvršene na materijalu treće grupe (mlijeko, krv), čini se, da su pogreške, koje prate razne metode, upravo nekako istoga reda kao i količina joda u tome materijalu.

Tako prema pregledu, koji su dali Riggs i Mann⁸, vidimo, da su razni autori, analizirajući krv osoba s normalnom tireoidejom, dobili vrijednosti, koje se među sobom razlikuju 2 do 4 puta. Dok se je količina joda u 100 ml krvi prema jednim kretala od 8,0 do 12,0 μg (pa i od 10,0 do 20,0 μg), prema drugima je ona iznosila svega 2,3 do 4,4 μg.

Iako su razlike među metodama dosta velike, ipak vidimo, da su se nekom određenom metodom mogli postići rezultati, koji su ležali unutar nekih, za tu metodu karakterističnih, granica. Ove granice, štoviše, nisu bile preširoke, tako da se je mogla jasno uočiti razlika u sadržaju joda u krvi osoba s patološkim promjenama na tireoideji.

Tako su na pr. Riggs i Mann dobili ove količine proteinskog joda u 100 ml krvnog seruma: kod normalnih ljudi 6,0 do 8,4 μg, kod hipotireoidizma 1,8 do 3,0 μg, a kod tireotoksikoza 9,2 do 14,5 μg.

Iz rečenog vidimo, da se kod analiza krvi mogu uspoređivati samo rezultati, koji su dobiveni jednom određenom, dobro uvedenom i iskušanom metodom. Potrebno je istaknuti, da i za dobivanje rezultata ovakve relativne vrijednosti nije važno samo to, da su postignuti istom metodom, nego i to, da se postupak izvodi uvijek pod istim okolnostima. Zato je potrebno, da su analitičke metode standardizirane u svim detaljima, da ih izvodi ista dobro uvježbana osoba i da se poduzmu mjere, koje će spriječiti svako onečišćenje — kako smo to istaknuli već u početku.

Rezultate relativne vrijednosti dobivamo i kod analize mlijeka, a možemo ih očekivati i kod ostalog materijala treće grupe.

Napomenut ćemo na kraju, da se moramo čuvati pretjeranih generalizacija u grupiranju točnosti rezultata isključivo po količini joda u materijalu, jer je lako moguće, da će se postepenim usavršavanjem metoda one sve više i više morati diferencirati i prilagoditi specifičnosti materijala. Tako će svaka metoda, odnosno svaki materijal nositi sa sobom i svoje specifične pogreške kod određivanja joda. Ipak zasada, ne ulazeći u manje razlike među pojedinim metodama, red količine joda u materijalu ostaje glavni opći kriterij za prosuđivanje realnosti rezultata.

LITERATURA

1. H. J. Almquist i J. W. Given, *Ind. Eng. Chem., Anal. Ed.* **5** (1933) 254.
2. S. B. Barker, *J. Biol. Chem.* **173** (1948) 715.
3. E. J. Baumann i N. Metzger, *J. Biol. Chem.* **121** (1937) 231.
4. A. L. Chaney, *Ind. Eng. Chem., Anal. Ed.* **12** (1940) 179.
5. A. L. Chaney, *Anal. Chem.* **22** (1950) 939.
6. J. J. Custer i S. Natelson, *Anal. Chem.* **21** (1949) 1005.
7. S. Čmelik, *Acta Adriat.* **3** (1948) No. 6.
8. G. J. Fashena i V. Trevorrow, *J. Biol. Chem.* **114** (1936) 351.
9. T. von Fellenberg, *Biochem. Z.* **139** (1923) 371.
10. T. von Fellenberg, *Biochem. Z.* **224** (1930) 170.
11. B. Gróak, *Biochem. Z.* **270** (1934) 291.
12. H. Harrington i R. Randell, *Quart. J. Pharm.* **2** (1929) 501.
13. C. O. Harvey, *Med. Research Council (Brit.) Spec. Rep. Ser. No.* 201/1935.
14. W. W. Hilty i D. T. Wilson, *Ind. Eng. Chem., Anal. Ed.* **11** (1939) 637.

15. F. G. Houston, *Anal. Chem.* **22** (1950) 493.
16. G. M. Karns, *Ind. Eng. Chem., Anal. Ed.* **4** (1932) 299 i 375.
17. E. C. Kendall, *J. Biol. Chem.* **43** (1920) 149.
18. H. v. Kolnitz i R. E. Remington, *Ind. Eng. Chem., Anal. Ed.* **5** (1933) 38.
19. A. Lein, *Endocrinology* **29** (1941) 905.
20. T. Leipert, *Biochem. Z.* **261** (1933) 261.
21. N. L. Matthews, G. M. Curtis i W. R. Brode, *Ind. Eng. Chem., Anal. Ed.* **10** (1938) 612.
22. J. F. McClendon, *J. Amer. chem. Soc.* **50** (1928) 1093.
23. J. F. McClendon, *J. Biol. Chem.* **60** (1924) 289.
24. J. F. McClendon i R. E. Remington, *J. Am. Chem. Soc.* **51** (1929) 394.
25. J. F. McClendon, R. E. Remington, H. v. Kolnitz i R. Rufe, *J. Am. Chem. Soc.* **52** (1930) 541.
26. J. F. McClendon, *J. Am. Chem. Soc.* **53** (1931) 1245.
27. J. F. McClendon, A. C. Bratton, R. V. White i W. C. Foster, *J. Biol. Chem.* **123** (1938) 699.
28. J. F. McClendon i W. C. Foster, *J. Biol. Chem.* **154** (1944) 620.
29. D. R. McCullagh, *J. Biol. Chem.* **107** (1934) 35.
30. D. R. McCullagh, i B. F. Stimmel, *J. Biol. Chem.* **116** (1936) 21.
31. J. S. McHargue, D. W. Young i W. R. Roy, *Ind. Eng. Chem., Anal. Ed.* **4** (1932) 214.
32. G. Middleton, *Analyst*, **57** (1932) 603.
33. E. W. Peel, R. H. Clark i E. C. Wagner, *Ind. Eng. Chem., Anal. Ed.* **15** (1943) 149.
34. G. Pfeiffer, *Biochem. Z.* **228** (1930) 146.
35. J. F. Reith, *Biochem. Z.* **216** (1929) 249; **224** (1930) 223.
36. D. S. Riggs i E. B. Man, *J. Biol. Chem.* **134** (1940) 193.
37. B. Rogina i M. Urch-Horvat, *Arhiv kem.* **20** (1948) 130.
38. W. T. Salter i E. A. McKay, *Endocrinology* **35** (1944) 380.
39. E. B. Sandell i I. M. Kolthoff, *J. Am. Chem. Soc.* **56** (1934) 1426.
40. E. B. Sandell, i I. M. Kolthoff, *Microchim. Acta* **1** (1937) 9.
41. T. S. Sappington i N. Halperin i W. T. Salter, *J. Pharmacol. Therap.* **81** (1944) 331.
42. B. K. Shahrok i R. M. Chesbro, *Anal. Chem.*, **21** (1940) 1003.
43. H. Spector i T. S. Hamilton, *J. Biol. Chem.* **161** (1945) 127.
44. S. Sterens, *J. Lab. Clin. Med.* **22** (1939) 1074.
45. S. Schwaibold, *Z. anal. Chem.* **78** (1929) 161; *Biochem. Z.* **240** (1931) 441.
46. N. B. Talbot, A. M. Butler, A. H. Saltzman i P. M. Rodriguez, *J. Biol. Chem.* **153** (1944) 479.
47. A. Taugog i I. L. Chaikoff, *J. Biol. Chem.* **163** (1946) 313.
48. J. W. Thomas, L. A. Shinn, H. G. Weiseman i L. A. Moore, *Anal. Chem.* **22** (1950) 726.
49. V. Trevorrow i G. J. Fashena, *J. Biol. Chem.* **110** (1935) 29.
50. H. Werner, *Z. Untersuch. Lebensm.* **60** (1930) 495.
51. L. M. White i G. E. Secor, *Anal. Chem.* **22** (1950) 1047.
52. L. W. Winkler, *Z. angew. Chem.* **28** (1915) 477, 494. *Pharm. Zentralhalle* **64** (1923) 571.

ABSTRACT

Methods for the Determination of Iodine in Biological Material

M. Dubravčić

In determining iodine in various biological material we obtain basic experimental data for the investigation of endemic goiter. However, the results obtained by various methods for the determination of iodine show very great differences. In order to enable the experts of this country, where goitre is widespread, an orientation in the choice of the method and to evaluate the results, in this discussion the author gives a critical survey of the methods for the determination of iodine and the reliability of the results which may be obtained by their application.

Biological material may be divided into four groups according to the contents of iodine:

Quantity of iodine in mg/kg of dried matter	Biological material
(1) 100 —10.000	seaplants, thyroid
(2) 1 — 10	sea animals (fish, crayfish, shellfish)
(3) 0.1— 1	blood, milk, and in some rare cases animal meat and some plants
(4) less than 0.1	most vegetables and food of animal origin

The methods for the determination of iodine were fully and critically discussed in their successive phases of material treatment (oxidation of organic matter, separation of iodine from the products of oxidation, and the very determination of iodine.)

The combustion in a platinum tube as per McClendon is considered to be the best method for oxidation of organic matter. The separation of iodine by distillation as per the same author and its electrometric titration are worth paying attention as well. The most sensitive reaction in proving and determining iodine is the catalytic reduction of ceric sulfate with arsenious acid.

As there is no method, considering jointly all the three phases of material treatment, where an error less than 0,1 mg per kg of dried matter occurs, we may conclude that actual results might be obtained only with the first two groups of biological material. With the third group of biological material (blood, milk) results of relative value are obtained, and with the fourth group (human food) no actual results at all.