

Evaluación de un procedimiento para la determinación de yodo en orina por cromatografía líquida de alta resolución*

M. Espada Sáenz-Torre, I. Marzana Sanz, M^a. Unceta Suárez

Resumen

Se ha desarrollado un procedimiento automatizado para la determinación en rutina de yodo en orina por cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa usando par iónico con detección electroquímica y electrodo de plata. El procedimiento se realiza a un flujo de 1 mL/min y una diferencia de potencial de 0,10 V. El tiempo de retención para el yodo es 5,5 min. La preparación de la muestra se realiza por un sistema semiautomático usando un sistema de filtración al vacío. El límite de detección es de 0,04 $\mu\text{mol/L}$. La precisión intra e interserial para una mezcla de orinas fue 4,5 % y 7,9 % respectivamente a una concentración de 0,43 $\mu\text{mol/L}$. La recuperación media de yodo añadido fue de 102%. Para comparar con un procedimiento colorimétrico por digestión ácida se procesan muestras de orina por ambos procedimientos: HPLC y colorimétrico obteniendo resultados prácticamente idénticos $r=0,99$; $y=-0,02+1,06x$; $S_{y/x}=0,07 \mu\text{mol/L}$. En conclusión, el procedimiento por cromatografía líquida de alta resolución es exacto y relativamente simple para determinar concentraciones de yodo urinario.

Introducción

El yodo es un micronutriente esencial para todas las especies animales. El ser humano necesita entre 40 y 200 μg diarios de yodo para su normal desarrollo y crecimiento y para la conservación de la salud (1). Los trastornos causados por deficiencia de yodo constituyen un gran problema de salud pública a escala mundial ya que son muchos los millones de individuos que viven en áreas en las que existe esta deficiencia y están repartidos por prácticamente todo el planeta. Aproximadamente mil millones de personas tienen riesgo de padecer deficiencia de yodo en todo el mundo, especialmente en Asia, África y Latinoamérica.

Los casos de deficiencia de yodo han desaparecido prácticamente en América del Norte y en varios países de Europa gracias a los cambios producidos en la tecnología y distribución de los alimentos y a la introducción de programas de yodación.

*Este trabajo corresponde a una comunicación científica presentada y premiada en el XVIII Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular, celebrado en Puerto de la Cruz, Tenerife el 19, 20 y 21 de Mayo de 1999.

Summary

We propose an automated method for the routine analysis of urinary iodine, using paired-ion reversed phase high performance liquid chromatography with electrochemical detection and a silver working electrode. Assay conditions include a flow rate of 1.0 mL/min and an operating potential of 0.10 V. The retention time for iodine is 5.5 min. Sample preparation can be semiautomated by use of a reduced-pressure manifold. The detection threshold was 0.04 $\mu\text{mol/L}$. The within-run and between-run precision for a pooled urine sample was 4.5% and 7.9% respectively at 0.43 $\mu\text{mol/L}$ iodide. The average recovery of added iodine was 102%. For comparison with a colorimetric method, we measured urine samples by both HPLC and a acid digestion method. The results for urinary iodine determined by the two methods were nearly identical ($r=0.99$; $y=-0.02+1.06x$; $S_{y/x}=0.07 \mu\text{mol/L}$). We conclude that iodine in urine can be accurately and simple determined by the more convenient HPLC assay.

Sin embargo, el bocio endémico constituye todavía un problema importante en Alemania, Austria, España, Francia, Grecia, Italia, Rumania y Turquía (2). Además, existe el riesgo de hipotiroidismo y cretinismo por marcada deficiencia de ingesta de yodo en áreas muy localizadas de España (3).

Por otra parte, se ha demostrado que las poblaciones de recién nacidos de ciudades europeas con bajo aporte de yodo presentan elevadas frecuencias de disminución transitoria de la función tiroidea (hipertirotropinemia transitoria), hecho preocupante en un periodo tan crítico para el desarrollo cerebral (4). El hipotiroidismo durante la gestación, aún leve o moderado, puede afectar adversamente al feto. En este sentido, un reciente estudio ha demostrado la existencia de una clara alteración del desarrollo neuropsicológico secundario a deficiencias tiroideas maternas leves (5). La *Endocrine Society* muy preocupada con este tipo de situaciones ha enviado a la comunidad científica una serie de recomendaciones referidas al diagnóstico y tratamiento de este tipo de problemas durante el embarazo. Estudios previos publicados (6) señalan que en aquellos neonatos cuya concentración de tirotrópina en el cribado es superior a 5 mIU/L (aun sin alcanzar el valor discriminante) presentan un leve grado de deficiencia de yodo. Estudios de los mismos autores muestran que sus madres tienen una clara deficiencia de yodo, según se comprueba por la determinación de la excreción urinaria de yodo. Esto conduce a la necesidad de estudiar a estas madres con el consiguiente tratamiento de

aquellas deficientes en yodo, evitando además que posibles futuros embarazos produzcan posibles problemas neurológicos en sus hijos como los anteriormente señalados.

Las encuestas epidemiológicas para detectar trastornos causados por deficiencia de yodo y establecer su gravedad en una población determinada se basan en el estudio de la prevalencia de bocio y de la excreción urinaria media de yodo (7) y habitualmente se suelen llevar a cabo en escolares (8).

Se propone un procedimiento automatizado para el análisis rutinario de yodo en orina por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en fase reversa por par iónico con detección electroquímica.

Material y Métodos

Instrumentación

El equipo cromatográfico está compuesto por una bomba binaria 510, inyector automático 717 plus con sistema de refrigeración a 4°C, detector electroquímico 464 con electrodo de referencia Ag/ClAg y electrodo de trabajo de plata, módulo de control de temperatura y horno, estación de datos Millennium, todo ello de Waters Chromatography S.A. (Milford, MA, EEUU).

La columna de fase reversa es una Resolve C18, 3,9x150mm, 90A, 5µm (Waters Chromatography S.A.; ref: Wato85711) integrada en horno a 35°C.

Reactivos y Fungibles

Columnas polares de extracción sólida C₁₈ Sep Pak plus (Waters Chromatography S.A.; ref: Wato 20515); metanol grado HPLC (Scharlau Chemie S.A.; ref: Me0306); yoduro potásico purísimo de grado analítico (Fluka Chemical; ref.: 60400); fosfato disódico 12 H₂O (Merck, Darmstadt, Alemania; ref.: 106579); ácido ortofosfórico (Merck; ref.: 100573); ácido etilendinitrotetraacético Titriplex III (Merck; ref.: 84180250); di-n-butilamina (Sigma chemical Co., St.Louis, EEUU; ref.: D-2883); reactivo de par iónico pic A tetrabutil amonio fosfato (Waters Cromatografía S.A.; ref.: Wato085101).

Los reactivos se conservan a temperatura ambiente. El reactivo de par iónico se puede almacenar hasta un año a temperatura ambiente si permanece sin abrir.

Preparación de la fase móvil

Está compuesta por Na₂ HPO₄ 12H₂O 10 mmol/L, Titriplex III 1 mmol/L, di-n-butilamina 6 mmol/L y tetrabutilamoniofosfato 10 mmol/L preparados todos con agua de grado HPLC.

Agitar la mezcla durante 5 minutos y ajustar el pH a 7 con ácido ortofosfórico al 85%.

Filtrar con filtros Millipore (ref.: HVLPO4700) y desgasificar en ultrasonidos durante 5 minutos. Poner en el reservorio de la fase móvil lo que se vaya a consumir en el día y almacenar el resto en nevera a 4°C, teniendo la precaución de sacarlo para que se atempere antes del uso. Este reservorio está conectado a un desgasificador de membrana que asegura una desgasificación continua de la fase móvil.

Procedimiento

El método para la determinación del yodo en orina por cromatografía líquida de alta resolución con detección electroquímica se basa en una extracción previa del yodo de la orina con cartuchos polares y posterior separación en el cromatógrafo de los iones yoduro formándose un par iónico entre el compuesto iónico (yoduro de la orina) y el reactivo de par iónico que se añade a la fase móvil. Se forma una especie electrónicamente neutra que se puede separar en columnas de fase reversa y se detecta con detector electroquímico. (9-11)

Especímenes

La muestra procede de orina fresca espontánea. Se recogerá sobre un vaso de orina correspondiente a la mitad de la micción despreciando tanto el principio como el final. Se enviará al laboratorio en tubo con tapón de cierre hermético.

En caso de no procesar la orina al momento los tubos permanecerán en nevera a 4°C hasta el momento del análisis si se va a realizar en las próximas 24 horas ó a -20°C utilizando en este caso tubos para guardar alícuotas de 10 mL, para periodos de conservación más largos.

Preparación de la muestra

Antes de inyectar en el cromatógrafo las muestras de orina se pasan a través de columnas polares de extracción sólida C₁₈ Sep Pak plus. Previamente, las columnas se han de acondicionar con 10 mL de metanol y 10 mL de agua grado HPLC. Una vez acondicionadas las columnas se pasan sobre ellas 3 mL de orina. Los primeros 2 mL del eluato se desechan y el tercero se recoge. Estas operaciones de acondicionamiento y elución se automatizan usando un sistema Vacuum Manifold. Para la determinación de la concentración de yodo en orina se inyectan en el cromatógrafo 50 µL de la fracción recogida y 50 µL de los calibradores.

Análisis

El análisis cromatográfico se lleva a cabo mediante elución isocrática en columna de fase reversa integrada en horno a 35°C a un flujo de 1 mL/min. La detección electroquímica se realiza a una diferencia de potencial de 0,10 V frente al electrodo de referencia. La sensibilidad del detector es de 50 nA = 100 mV.

Curva de calibración de yoduros

Se prepara una curva de calibración partiendo de una solución madre de KI 100 µg/mL (equivalente a 0,010 g de yoduros). Se conserva en refrigeración durante un tiempo máximo de 15 días.

Se prepara una solución de 1 µg/mL a partir de la cual se obtienen los estándares de 0,16; 0,4; 0,8; 1,2 y 1,6 µmol/L. Esta operación se realiza diariamente.

Cálculo de los resultados

Los datos se procesan automáticamente en la estación de datos Millennium que dispone de varios sistemas de cálculo, utilizándose en este caso la representación lineal por el método de ajuste de mínimos cuadrados.

El cálculo de la concentración de iones yoduro de las muestras se realiza comparando con la curva de calibración, representando en el eje de abscisas la concentración de los estándares de yoduro y en el eje de ordenadas la respuesta del detector en voltios. Interpolando en la curva el valor de la altura de pico, obtenemos la concentración de yoduro correspondiente a la concentración de yodo de la muestra.

Resultados

El tiempo de retención para el yodo es de 5,5 minutos y el tiempo de análisis para cada muestra es de 7,5 minutos, pudiéndose procesar 8 muestras cada hora aproximadamente. El pretratamiento de las muestras con la elución semiautomatizada permite preparar aproximadamente 50 muestras cada hora.

A partir de una solución acuosa de yoduros de 788 µmol/L se prepara otra solución acuosa más diluida de 7,88 µmol/L a partir de la cual se han obtenido preparaciones con concentraciones de yoduros comprendidas entre 0,2 µmol/L y 1,6

$\mu\text{mol/L}$. A todas las preparaciones se les midió la concentración de yoduros por triplicado y en series distintas.

Por inspección visual observamos que la respuesta del detector es lineal desde $0,20 \mu\text{mol/L}$ a $1,6 \mu\text{mol/L}$ (figura 1). Muestras con concentraciones superiores de yodo se deben diluir. Se hizo una regresión lineal del intervalo considerado lineal por inspección visual, obteniéndose una recta que responde a la ecuación $y = -0,033 + 0,032x$; $r = 0,995$; $S_{y/x} = 0,02 \mu\text{mol/L}$.

El límite de detección considerando una relación señal/ruido de 3 es $0,04 \mu\text{mol/L}$.

Para el cálculo de la imprecisión se procesaron tres muestras de diferentes concentraciones diez veces en la misma serie y a su vez en diez días diferentes obteniéndose los resultados expresados en la tabla I.

El estudio de la recuperación se efectúa por adición de diferentes concentraciones de yodo a una misma muestra de orina,

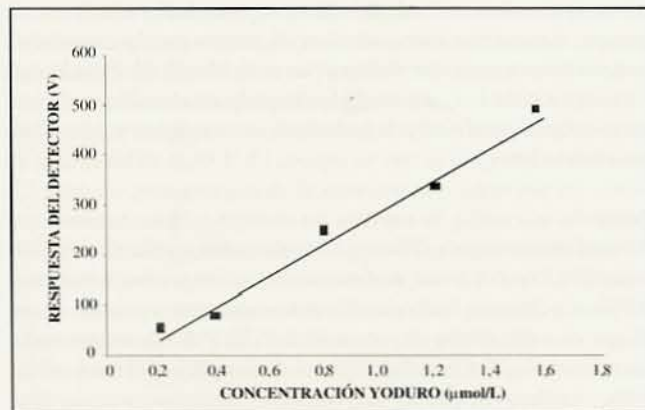


Figura 1. Curva de calibración

obteniendo un valor medio de 102%, según se detalla en la tabla II

A su vez, para comprobar los posibles efectos de las interferencias por compuestos desconocidos de la orina se suple-

Tabla I. Estudio de imprecisión

Intraserial				Interserial			
n	\bar{x} $\mu\text{mol/L}$	s $\mu\text{mol/L}$	CV %	n	\bar{x} $\mu\text{mol/L}$	s $\mu\text{mol/L}$	CV %
10	0,43	0,02	4,5	10	0,42	0,03	7,9
10	0,85	0,02	3,2	10	0,88	0,03	3,5
10	1,73	0,10	2,0	10	1,74	0,13	2,5

mentan cuatro muestras de orina con concentraciones crecientes de yodo desde $0,20 \mu\text{mol/L}$ hasta $0,79 \mu\text{mol/L}$. Se calculan las pendientes de las curvas entre las cantidades añadidas y las medidas para cada muestra no encontrándose

Tabla II. Estudio de recuperación

V. teórico $\mu\text{mol/L}$	V. medido $\mu\text{mol/L}$	%
0,41	0,39	104
0,76	0,78	97
1,00	0,99	101
1,43	1,40	102

diferencias significativas. La media de las pendientes es de 1,02 sugiriendo una ausencia de efectos interferentes e indicando que la recuperación del yodo es completa, lo que está en clara coincidencia con las pruebas de recuperación realizadas.

Para el estudio de la comparación de procedimientos se han incluido un total de 25 muestras de orina con concentraciones de yodo a lo largo del intervalo de trabajo. A todas ellas se les ha determinado, en paralelo, la concentración de yodo por el procedimiento objeto de estudio(y) y por el método colorimétrico del ácido clórico de Zak modificado por Benotti y Benotti (12) (x). Los resultados obtenidos en la comparación de procedimientos establecen una correlación ($r = 0,99$; $y = -0,02 + 1,06x$; $S_{y/x} = 0,07 \mu\text{mol/L}$) donde $a = 0,02$ con un intervalo de confianza(i.c.)= $(-0,087-0,135)$, y $b = 1,06$ con un i.c.= $(0,964-1,15)$. La ordenada en el origen y la pendiente, así como sus respectivos intervalos de confianza revelan que ni la pendiente ni la ordenada en el origen difieren significativamente de 1 y 0 respectivamente. Los resultados obtenidos muestran una fuerte correlación.

Discusión

Los resultados demuestran claramente que el procedimiento por cromatografía líquida por par iónico es preciso y exacto siendo una buena alternativa a los procedimientos colorimétricos por digestión ácida clásicamente utilizados para determinar la concentración de yodo en orina.

Es de fácil realización y para su puesta en marcha solo es necesario un equipo de cromatografía líquida convencional disponible en muchos laboratorios.

La recuperación del yodo es excelente debido a la detección electroquímica en combinación con la cromatografía de alta resolución, demostrando la ausencia completa de interferencias.

Comparado con los pocos procedimientos de cromatografía de alta resolución publicados presenta la ventaja de trabajar en

modo isocrático a un flujo de 1 mL/min y con tiempos de retención más cortos ($5,5 \text{ min}$). Ambos factores contribuyen a disminuir los costes del proceso debido al pequeño consumo de fase móvil y a la posibilidad de procesar más muestras por hora.

En este estudio se demuestra también que los resultados son comparables a los obtenidos por los procedimientos colorimétricos por digestión ácida.

En resumen, recomendamos el empleo del procedimiento por cromatografía de alta resolución como alternativa para la práctica rutinaria por ser más sencillo, rápido y menos peligroso que los que utilizan la digestión ácida.

Correspondencia:
M. Espada Saenz-Torre
Laboratorio Salud Pública.
C)María Díaz de Haro 60.
48010 Bilbao
e-mail: laborbi-san@ej-gv.es

Bibliografía

1. National Research Council. Recommended Dietary Allowances. 10th Edition. Washington, DC: National Academy Press 1989. p.213-217.
2. Scriba PC, Beckers C, Burgi H, et al. Goitre and Iodine deficiency in Europe. Report of the Subcommittee for the Study of the endemic goitre and iodine deficiency of the European Thyroid Association. *Lancet* 1985;i:1289-93.
3. Escobar del Rey F, Morreale de Escobar G. Iodine Deficiency in Spain :A continuing concern. *Endocrinología* 1992;39:171-5.
4. Delange F. Neonatal screening for congenital hypothyroidism: Results and perspectives. *Horm Res* 1997;48:51-61.
5. Haddow JE, Palomaki GE, Allan WC, Willians JR, Hnigh GJ, Gagnon J, et al. Maternal thyroid deficiency during pregnancy and subsequent neuropsychological development of the child. *N Engl J Med* 1999;341:549-55.
6. Escobar del Rey F, Morreale de Escobar G. Yodación universal de las sal: un derecho humano de la infancia. *Endocrinología*, 1998;45:3-16.
7. Delange F, Bastani S, Benmiloud M. Definitions of endemic goiter and cretinism. Classification of goiter size and severity of endemias and survey techniques. En: Dunn JT, Pretell EA, Daza CH, Viteri FE eds. *Towards the Eradication of Endemic Goiter, Cretinism and Iodine Deficiency*: Washinton DC. PAHO/WHBO Sci Pub No.502, 1986. p.373-6.
8. Arrizabalaga JJ, Gaztambide S, Vazquez JA, Huguera I. Prevalencia de bocio y estado nutricional de yodo en los escolares de la comunidad autónoma Vasca. *Endocrinología* 1993;40:278-83
9. Rendl J, Seybold S, Borner W. Urinary iodide determined by paired-ion reversed-phase HPLC with electrochemical detection. *Clin Chem* 1994; 40:908-13
10. Odink J, Bogaards JJP, Sandman H, Egger RJ, Arkesteyn GA, De Jong P. Excretion of iodide in 24h urine as determined by ion-pair reversed-phase liquid chromatography with electrothermal detection. *J Chromatogr* 1988; 431:309-16.
11. Lookbaugh M, Krull IS, La Course WR. Determination of iodide and thiosulfate by paired-ion, reversed-phase high-performance liquid chromatography with electrochemical and conductimetric detection. *J Chromatogr* 1987;387:301-12
12. Benotti J, Benotti N. Protein-bound iodine-total iodine and butanol-extractable iodine by partial automation. *Clin Chem* 1963; 9:408-11.