

Iodine Determination in Hair with Acid Digestion and Microplate Reading Procedure

Somayeh Shokri¹, Azadeh Rasooli¹,
Mehdi Hedayati^{2*}

1. M. A. in Biochemistry, Department of Biochemistry,
Faculty of Sciences, Payame Noor University, Tehran, Iran

2. Ph. D., in Biochemistry, Payame Noor University,
Tehran, Iran

3. Associate Professor, Cellular & Molecular Research
Center, Research Institute for Endocrine Sciences, Shahid
Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

(Received: Dec. 28, 2016 - Accepted: May 14, 2018)

سنجش میزان ید در موی سر به روش هضم اسیدی و خوانش میکروپلیتی

سمیه شکری^۱، آزاده رسولی^۱، مهدی هدایتی^{۲*}

۱. کارشناس ارشد بیوشیمی، دانشگاه پیام نور واحد تهران شرق

۲. دکتری بیوشیمی، دانشگاه پیام نور واحد تهران شرق

۳. دانشیار بیوشیمی، مرکز تحقیقات سلولی مولکولی، پژوهشکده علوم غدد

درون‌رین، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۱۰/۸ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۲/۲۴)

Abstract

After iron, iodine deficiency is the most common nutritional deficiency in third world countries. Today, the urinary iodine which indicates the recent iodine status is the only biological indicator for iodine. Therefore, providing a long-term indicator for assessing iodine status is an essential matter. In this study, by using the well-known Sandell-Kolthoff reaction the iodine levels were simultaneously measured in hair and urine of 50 samples. The precision, accuracy, and sensitivity of the assay were also evaluated. Acid digestion was sufficiently accurate. Intra and inter-assay coefficients were less than 10 and 12 percent, respectively. Based on the recovery and recycling tests, the recovery percentage of the applied method was 90 to 110 percent which indicates an acceptable accuracy for this study. This method can digest the hair samples in an acidic environment and has enough efficiency to remove interfering and iodine releasing agents in the samples. Moreover, this method has sufficiently precision, accuracy, and sensitivity required for the measurement of iodine in the hair samples. In addition, using of acidic digestion, reduces the risk of alkaline medium for digestion and the time of long-term ashing methods. It also increases the safety of the used method.

Keywords: Hair, Iodine, Acid Digestion, Sandell-Kolthoff.

چکیده

امروزه، کمبود ید پس از آهن، شایعترین کمبود تغذیه‌ای در کشورهای جهان سوم است. در حال حاضر تنها شاخص بیولوژیکی ید، میزان ید در ادرار است که نشان‌دهنده وضعیت دریافت اخیر ید است و شاخصی برای ارزیابی طولانی مدت ید وجود ندارد. به همین دلیل شناسایی و طراحی یک شاخص بیولوژیکی برای ارزیابی بلندمدت وضعیت ید ضرورت دارد. در این مطالعه، از اندازه‌گیری میزان ید در نمونه موی سر با استفاده از واکنش معروف سندل کالتهف به روی ۵۰ نمونه موی سر و نمونه ادرار افراد به طور همزمان بهره گرفته شد. دقت، صحت و حساسیت روش سنجش به روش هضم اسیدی مورد بررسی قرار گرفت. روش هضم اسیدی از دقت کافی برخوردار بود. درصد ضرایب تغییرات درون آزمونی و برون آزمونی به ترتیب کمتر از ۱۰ و ۱۲ درصد محاسبه شد. بر اساس آزمون‌های بازیافت و توازی، درصد باز-یافت در محدوده ۹۰ تا ۱۱۰ درصد بود که حاکی از صحت قابل قبول روش مورد مطالعه است. این روش قادر به هضم نمونه موی سر در محیط اسیدی است و کارایی لازم برای حذف مواد مداخله‌گر و آزادکننده ید را در نمونه‌های مذکور دارد. به علاوه از دقت، صحت و حساسیت لازم برای اندازه‌گیری ید در نمونه موی سر برخوردار است. در ضمن، استفاده از محیط اسیدی، خطر ناشی از هضم در محیط‌های قلیایی و زمان طولانی روش‌های خاکسترسازی را کاهش داده، ایمنی روش را افزایش می‌دهد.

واژه‌های کلیدی: موی سر، ید، هضم اسیدی، روش سندل کالتهف.

مقدمه

یُد یک ماده معدنی کم نیاز و ضروری است و یکی از اجزای مورد نیاز برای عملکرد صحیح غده تیروئید است. این عنصر در ساختمان هورمون‌های تیروکسین و تری‌ید و تیرونین یافت می‌شود. هورمون‌های تیروئیدی اعمال متابولیکی مختلفی را به عهده دارند که شامل تأثیر بر سوخت‌وساز چربی‌ها، کربوهیدرات و پروتئین، رشد و تولید مثل، مصرف اکسیژن و تنظیم میزان متابولیسم پایه است. کمبود یُد سبب کمبود هورمون‌های تیروئیدی می‌شود. این امر باعث اختلال در تکامل جسمی و ذهنی در کودکان و گواتر در بزرگسالان می‌شود (Salarkia et al., 2003). کمبود یُد یک مشکل جهانی است. مطالعه‌ای نشان می‌دهد که ۳۰٪ از جمعیت جهان در مناطقی با کمبود یُد زندگی می‌کنند. کمبود یُد خفیف در زنان ممکن است باعث اختلال توجه و بیش‌فعالی (ADHD) در کودکان آنها شود (Azizi et al., 2003). خوشبختانه کمبود یُد نه تنها قابل پیشگیری‌ترین علت عقب افتادگی ذهنی محسوب می‌شود، بلکه برطرف کردن آن نیز از لحاظ فناوری ساده است (Furnee et al., 1997). روش‌های متعددی برای سنجش میزان یُد گزارش شده است. کروماتوگرافی تبادل یونی، فعال‌سازی سریع نوترونی، الکترودهای یون‌گزين، فلورسانس اشعه ایکس، کروماتوگرافی گاز مایع، طیف‌سنجی جرمی، فعال‌سازی رادیواکتیوی، کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا و جذب اتمی غیرمستقیم از مهمترین این روش‌ها هستند. همه روش‌های فوق، نیازمند آماده‌سازی نمونه هستند. این روش‌ها که به تجزیه دستگاهی معروفند، دارای محدودیت‌هایی از قبیل هزینه بالای خرید دستگاه‌ها، هزینه بالای تأمین و نگهداری دستگاه‌ها، نیاز به کارکنان مجرب و متخصص، هزینه پرسنلی بالا و هزینه مواد مصرفی بالا به همراه سرعت اندازه‌گیری پایین هستند و برای مراکز کوچک و یا برنامه‌های بزرگ مانند برنامه‌های پایش ادواری مناسب نیستند.

البته نباید فراموش کرد که روش‌های دستگاهی بویژه طیف‌سنجی جرمی که بیشتر با روش‌هایی مانند غربال مولکولی، تبادل یونی، فعال‌سازی نوترونی، رقیق‌سازی ایزوتوپی و یا سایر روش‌ها جفت می‌شوند، از درستی بالایی برخوردار هستند و به عنوان روش مرجع در نظر گرفته می‌شوند (Garry et al., 1973; Benotti et al., 1965; Ohashi et al., 2000; Dunn et al., 1998; Rendl et al., 1998; Yamaki et al., 2009; Ristic-Medic et al., 2009).

هنوز واکنش ساده و کارآمد سندل کالتوف، یکی از مناسبترین روش‌های سنجش یُد محسوب می‌شود. نقش کاتالیزوری یُد در واکنش تبدیل سربک (+۴) زرد رنگ به سروی (+۳) بیرنگ مبنای این اندازه‌گیری‌ها است (Sandell & Kolthoff, 1937). از آنجا که بیش از ۹۰٪ یُد دریافتی از طرق ادرار دفع می‌شود، سنجش یُد در نمونه ادرار شاخص خوبی برای تعیین وضعیت یُد دریافتی است (May et al., 1997). اما میزان دفع یُد در ادرار، در روزهای مختلف و حتی طی یک روز متغیر است. بنابراین ما نیاز به بررسی طولانی‌مدت میزان یُد در بدن داریم؛ چرا که سنجش یُد در ادرار فقط از دریافت اخیر یُد توسط فرد آگاهی می‌دهد، در حالی که سنجش یُد در موی سر به طور متوسط، اطلاع چند ماهه از وضعیت یُد در بدن را به دنبال خواهد داشت (Berislav et al., 2014). بنابراین، هدف از این مطالعه، فراهم کردن روشی برای هضم نمونه موی سر، تعیین حساسیت، دقت، صحت روش به‌کار گرفته برای سنجش یُد در موی سر است.

مواد و روش‌ها

دستگاه‌ها و تجهیزات

دستگاه حرارت‌دهنده الکتریکی یا هیتینگ بلاک (شرکت ابی‌سی، آلمان)، ترازوی آنالیتیک (سارتریوس، آلمان)، دستگاه پلیت ریدر (سان رایز، تکن آ ۵۰۸۲، اتریش) و سمپلر چند شاخه (کمپانی اپندرف آلمان) برای انجام این مطالعه مورد استفاده قرار گرفت.

مواد شیمیایی

همه مواد شیمیایی مورد نیاز با درجه خلوص بالا شامل کلرید سدیم، یدات پتاسیم، تری اکسید آرسنیک، کلرات پتاسیم، اسید پرکلریک ۷۲٪، سریم سولفات تترا آمونیوم و اسید سولفوریک از شرکت سیگما آلدريج آلمان تهیه شدند. آب مقطر دیونیزه با دستگاه اسمز معکوس (کمپانی OES آمریکا مدل SDL8L) و میکروپلیت‌های ۹۶ چاهکی الیزا نیز از کمپانی نانک دانمارک تهیه شد.

محلول معرف هضم اسیدی

برای تهیه اسید کلریک میزان ۵۰۰ گرم کلرات پتاسیم در ۹۱۰ لیتر آب مقطر حل و یک ساعت در حمام آب جوش حرارت داده شد و سپس ۳۷۵ میلی لیتر اسید پرکلریک آهسته با هم زدن مداوم افزوده شد. محلول فوق، یک شبانه روز در دمای یخچال نگهداری و سپس اسیدکلریک از رسوب پرکلرات پتاسیم به کمک کاغذ صافی جدا و در دمای ۴ درجه نگهداری شد.

محلول اسید آرسنیک

برای تهیه محلول اسید آرسنیک، ۱/۸ گرم کلرید سدیم و ۹ گرم تری اکسید آرسنیک در ۸۳ میلی لیتر اسید سولفوریک غلیظ حل و با آب مقطر به حجم یک لیتر رسانده شد.

محلول سولفات آمونیم سربک

محلول فوق با انحلال ۶ گرم سولفات آمونیم سربک در ۷۳۰ میلی لیتر آب مقطر و ۲۷۰ میلی لیتر اسید سولفوریک غلیظ تهیه شد.

استانداردهای ید

ابتدا با انحلال ۱/۶۸۶ گرم یدات پتاسیم در یک لیتر آب مقطر، محلول غلیظ ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی لیتر استاندارد ید تهیه و سپس محلول‌های استاندارد با غلظت‌های ۲۰، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰، ۴۰۰ میکروگرم

در لیتر از آن تهیه شد.

نمونه مورد بررسی

تعداد ۱۰۰ نمونه موی سر مورد نیاز به حجم ۲۰ میلی گرم از مراجعین داوطلبی که برای بررسی میزان ید، به پژوهشکده علوم غدد درون ریز و متابولیسم دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی- درمانی شهید بهشتی مراجعه کرده بودند، اخذ شد.

بهینه‌سازی شرایط هضم اسیدی

شرایط بهینه (زمان، دما) براساس آزمون بازیافت در ۱۰ نمونه به روش ذیل تعیین شد:

به منظور هضم، نمونه‌ها پس از اضافه کردن ۱ میلی لیتر از معرف هضم کننده به ۲۰ میلی گرم نمونه مو، یک ساعت در دمای ۱۱۰ درجه سانتیگراد انکوبه شدند. نمونه‌ها سپس در زیر هود مجهز به تله پرکلریک تا رسیدن به دمای اتاق خنک شدند و به مقدار ۳/۵ میلی لیتر اسید آرسنیک به نمونه‌ها اضافه و ۱۵ دقیقه انکوبه شد و سپس مقدار ۲۰۰ میکرو لیتر از نمونه هضم شده، به چاهک‌های میکروپلیت ۹۶ چاهکی پلی استیرنی (ساخت کمپانی نانک، دانمارک) انتقال داده شد و به همه چاهک‌ها ۵۰ میکرو لیتر محلول سربک افزوده شد. بعد از گذشت ۲۰ دقیقه، جذب نوری چاهک‌ها توسط دستگاه الیزا ریدر در طول موج ۴۵۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. با رسم میانگین مقادیر جذب نوری کالیبراتورها روی محور عمودی و غلظت کالیبراتورها روی محور افقی، منحنی استاندارد ترسیم شد.

در هر میکروپلیت استانداردهایی با غلظت ۲۰، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰، ۳۰۰ و ۴۰۰ میکروگرم در لیتر استفاده شد. با رسم لگاریتم میانگین جذب نوری استانداردها روی محور عمودی و غلظت استانداردها روی محور افقی، منحنی استاندارد رسم شد. غلظت ید در نمونه‌های مو با رگرسیون خطی منحنی فوق محاسبه شد. آب مقطر دو بار تقطیر دیونیزه به عنوان استاندارد صف در نظر گرفته شد.

نمونه‌ای از منحنی استاندارد با ۱۰ بار تکرار در نمودار ۳ آورده شده است. همان گونه که در نمودار مشخص است، محدوده عملکرد منحنی استاندارد ۲ تا ۴۰ میکروگرم در دسی‌لیتر معادل ۲۰ تا ۴۰۰ میکروگرم در لیتر است.

در بررسی دقت روش، یافته‌های آزمون‌های درون‌سنجش و برون‌سنجش بر اساس جدول ۱، در خصوص دقت درون‌آزمونی ضریب تغییرات در غلظت‌های مختلف از ۸/۶ تا ۹/۴ درصد و در مورد ضریب تغییرات برون‌سنجش ۹/۹ تا ۱۱/۵ درصد به‌دست آمد.

همان‌طور که اشاره شد، حساسیت روش بر اساس غلظت مرتبط با میانگین سیگنال استاندارد صفر به علاوه دو برابر انحراف استاندارد، با میانگین جذب نوری ۱/۵۶۲ و انحراف استاندارد ۰/۱۱۵ معادل ۰/۵ میکروگرم در دسی‌لیتر یا ۵ میکروگرم در لیتر محاسبه شد.

داده‌های مربوط به بررسی درستی یافته‌ها، در جدول‌های ۲ و ۳ آورده شده است. بازیافت روش مستقیم ۹۴/۲ تا ۱۰۹/۰ و بازیافت روش غیرمستقیم ۸/۱ تا ۲۹/۰ محاسبه شد، آزمون توازی تا رقت ۳۲:۱ بررسی شد که تا ۱۶ برابر رقت نتایج قابل قبولی به‌دست آمد.

جدول ۱. یافته‌های حاصل از بررسی ضریب تغییرات

درون‌آزمونی و برون‌آزمونی با تکرار ۱۰ تایی سنجش یُد در مو به روش هضم اسیدی

غلظت	میانگین (میکروگرم در دسی لیتر)	درصد ضریب تغییرات
درون سنجش		
پایین	۱/۵	۸/۶
متوسط	۳/۸	۹/۱
بالا	۹/۶	۹/۴
برون‌سنجش		
پایین	۱/۷	۹/۹
متوسط	۳/۶	۱۰/۸
بالا	۹/۵	۱۱/۵

غلظت مربوط به میانگین سیگنال استاندارد صفر با ۱۰ بار تکرار به علاوه دو برابر انحراف استاندارد آن، مبنای تعیین حساسیت روش قرار گرفت. از رقیق‌سازی متوالی یک نمونه موی هضم‌شده نیز برای تأیید بهره گرفته شد. از آب مقطر دو بار تقطیر دیونیزه برای رقیق‌سازی استفاده شد.

به‌منظور ارزیابی اعتبار روش، دقت، درستی و حساسیت آن مورد بررسی قرار گرفت. دقت روش بر اساس آزمون‌های درون‌سنجش و برون‌سنجش نمونه‌هایی با غلظت پایین، متوسط و بالا با ۱۰ تکرار درون‌آزمونی و ۸ تکرار برون‌آزمونی، محاسبه میانگین، انحراف استاندارد و درصد ضریب تغییرات بررسی شدند. درستی روش سنجش نیز به کمک آزمون‌های بازیافت (مستقیم و غیرمستقیم) و آزمون توازی بررسی شد.

سنجش میزان یُد پس از افزایش استانداردهای مختلف به ۶ نمونه تصادفی با تکرار ۳ تایی مبنای آزمون بازیافت قرار گرفت. افزایش استاندارد صفر به‌عنوان شاهد استفاده شد.

سنجش میزان یُد در ۶ نمونه با غلظت‌های پایین، متوسط و بالا پس از رقیق‌سازی متوالی با تکرار سه‌تایی، اساس آزمون توازی قرار گرفت.

آنالیز آماری

داده‌های به‌دست آمده توسط نرم‌افزار SPSS 20 تجزیه و تحلیل شد. متغیرهای کمی به‌صورت میانگین \pm انحراف استاندارد بیان شدند.

نتایج

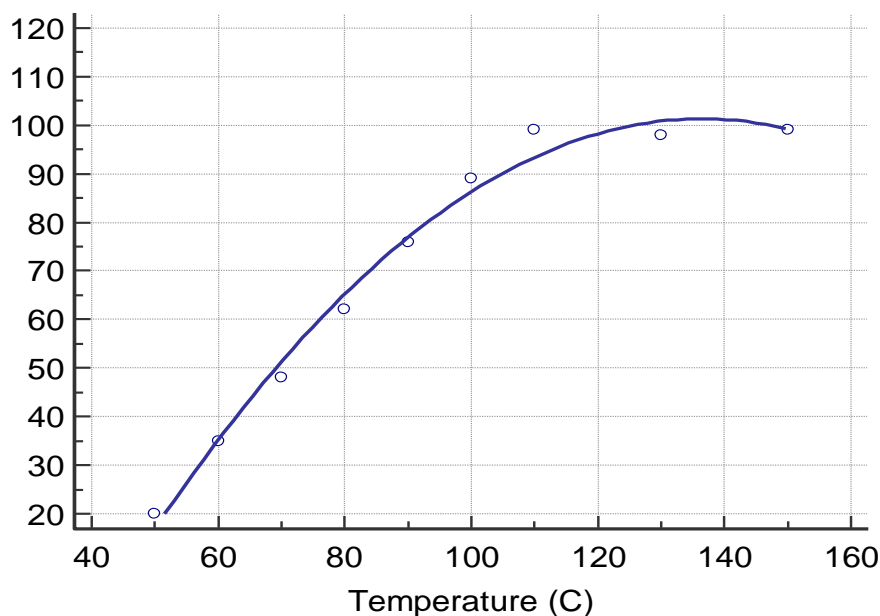
یافته‌های بهینه‌سازی دما و زمان هضم اسیدی در نمودارهای ۱ و ۲ نشان داده شده است. باز یافت میزان ید در نمونه‌های مو نشان داد که زمان یک ساعت دمای ۱۱۰ درجه در اسید پرکلریک شرایط بهینه محسوب می‌شود.

جدول ۲. نتایج حاصل از آزمون بازیافت مستقیم (افزودن استاندارد ۱۵ میکروگرم در دسی لیتر) برای تعیین صحت روش سنجش ید در مو به روش هضم اسیدی

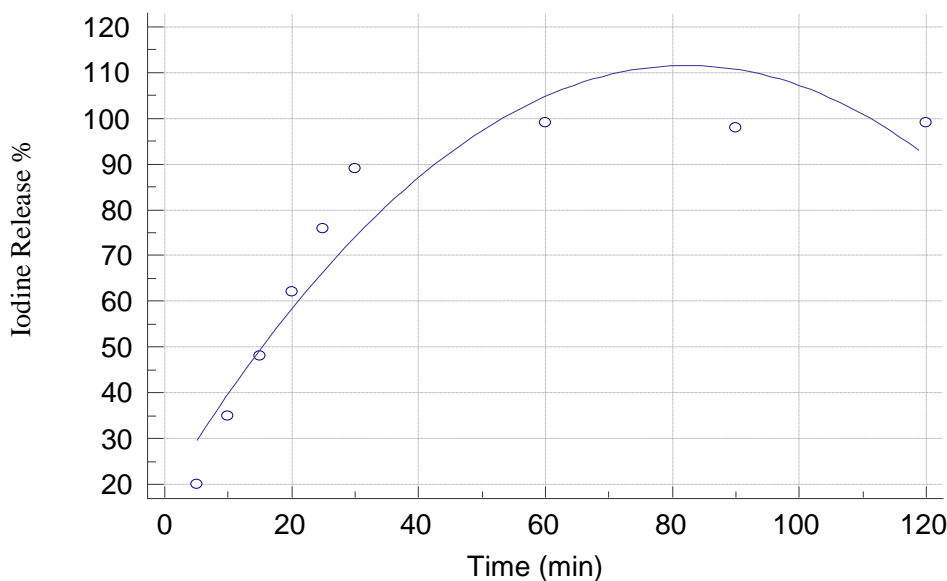
غلظت نمونه	مورد انتظار	اندازه‌گیری شده	درصد بازیافت
۵/۸	۱۰/۴	۹/۸	۹۴/۲
۱۶/۳	۱۵/۶	۱۶/۸	۱۰۷/۶
۳۱/۲	۲۳/۱	۲۵/۲	۱۰۹/۰

جدول ۳. نتایج حاصل از آزمون توازی برای تعیین صحت روش سنجش ید در مو به روش هضم اسیدی

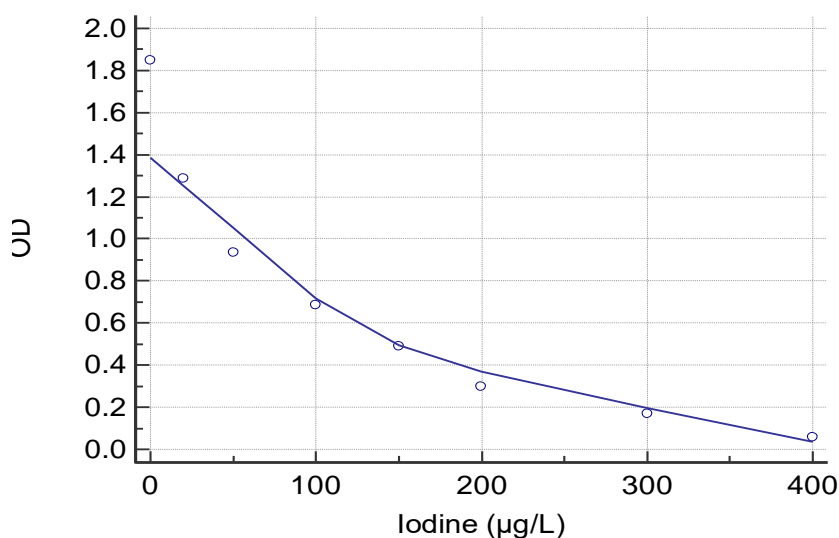
نمونه	رقت	مورد انتظار	اندازه‌گیری شده	درصد
۱	۱	۳۸	۳۸	۱۰۰
۲	۲	۱۹	۱۸/۷۰	۹۸/۴
۳	۴	۹/۵۰	۹/۳۱	۹۸/۰
۴	۸	۴/۷۵	۴/۹۲	۱۰۳/۵
۵	۱۶	۲/۲۷	۲/۱۲	۹۳/۴
۶	۳۲			



نمودار ۱. نتیجه بهینه‌سازی دمای هضم اسیدی نمونه مو برای سنجش ید



نمودار ۲. نتیجه بهینه‌سازی زمان هضم اسیدی نمونه مو برای سنجش ید



نمودار ۳. یافته‌های مربوط به تنظیم منحنی استاندارد سنجش ید در مو به روش هضم اسیدی

بحث و نتیجه‌گیری

با توجه به نقش کاتالیزوری ید در این واکنش حتی مقادیر در حد نانوگرم (10^{-9}) از ید قابل اندازه‌گیری است و حساسیت روش بسیار قابل قبول است. به دلیل ویژگی و حساسیت بالا، این واکنش مبنای بسیاری از روش‌های اندازه‌گیری ید قرار گرفته است. در حال حاضر، سنجش ید در نمونه ادرار، شاخص خوبی برای تعیین وضعیت ید دریافتی است، اما ما به شاخص بلندمدتی برای تعیین وضعیت ید نیاز داریم. به نظر می‌رسد، بافت مو شاخص بیولوژیکی معتبر برای ارزیابی بلندمدت وضعیت ید است. نتایج ما نشان می‌دهد که روش هضم اسیدی، اولین روش سنجش ید در مو محسوب می‌شود که در این مطالعه فقط از یک ساعت هضم در دمای ۱۱۰ درجه بهره گرفته شد (نمودارهای ۱ و ۲). این روش از کارایی لازم، دقت و صحت کافی برای سنجش میزان ید برخوردار است. مطالعات دیگر نیز روش هضم اسیدی را به عنوان بهترین روش برای سنجش ید ادرار و شیر مورد تأیید قرار می‌دهند (Hedayati et al., 2011; Hedayati et al., 2007). اندازه‌گیری ید در مو برای سالیان زیادی مورد بحث بوده است؛ چرا که عوامل بسیاری در اندازه‌گیری آن دخیل هستند، از جمله آلودگی‌های زیست‌محیطی و صنعتی، نوع شامپوی مورد استفاده در زمان آنالیز،

امروزه فقدان ید از شایعترین کمبودهای غذایی در دنیا است و در کشورهای توسعه‌یافته جهان سوم و همین‌طور کشورهای توسعه‌یافته اروپایی مانند انگلستان، ایتالیا و آلمان مشاهده می‌شود. در جهان ۲/۲ میلیارد نفر یعنی ۳۸٪ از کل جمعیت جهان در مناطقی زندگی می‌کنند که خطر کمبود ید وجود دارد. کمبود ید، تهدیدی برای رشد اجتماعی و اقتصادی بسیاری از کشورها به حساب می‌آید. به همین دلیل، آزمون‌هایی برای ارزیابی سطح ید در منابع مختلف از جمله مواد غذایی (Mesko et al., 2010)، نمک (Azizi et al., 2001)، در نمونه‌های بیولوژیکی (Nikolic et al., 2005)، بویژه شیر (Hedayati et al., 2007)، سرم (Azizi et al., 2002) و ادرار (Hedayati et al., 2011) باید مشخص شود، همچنین برای سنجش آن در حد وسیع، به روش‌هایی ساده و ارزان نیاز داریم (O'Brien, 2013). مناسبترین روش که در مورد اندازه‌گیری ید در مو مورد پذیرش همگان قرار گرفته است، روش اسپکتروفوتومتری است. در این روش، واکنش ساده و کارآمد سندل - کالتف مبنای سنجش است (Berislav et al., 2014).

(جدول ۲) و توازی (جدول ۳) درصد بازیافت این روش در محدوده ۹۰ تا ۱۱۰ بود که حاکی از صحت قابل قبول روش مورد مطالعه است.

نتیجه‌گیری کلی

روش هضم اسیدی قادر به هضم نمونه‌های مو در محیط اسیدی حاوی کلریک اسید است و کارایی لازم برای حذف عوامل مداخله‌گر و آزادسازی ید موجود در نمونه‌های مذکور را دارد. به علاوه از دقت، صحت و حساسیت لازم برای اندازه‌گیری ید در نمونه مو برخوردار است. در ضمن با توجه به استفاده از محیط اسیدی برای این روش، خطر ناشی از هضم در محیط‌های قلیایی و زمان طولانی روش‌های خاکسترسازی کاهش یافته و ایمنی روش افزایش می‌یابد.

نوع روش مورد استفاده، شرایط آب و هوایی و زمان استفاده از مو (Momcilovic *et al.*, 2014). میزان ید موجود در مو را ۰/۴۹۹ میکروگرم (۰/۴۸۲) و ۰/۵۰۸ میکروگرم برای مردان و زنان) به دست آوردند که نمایانگر آن است که با جنسیت ارتباطی ندارد و کمبود واضح ید زمانی اتفاق می‌افتد که غلظت ید مو کمتر از ۰/۱ تا ۰/۱۵ میکروگرم بر گرم است (Momcilovic & Berislav, 2014). نتایج حاصل از مطالعه ما نشان داد، دامنه عملکرد استاندارد روش مورد مطالعه از ۲ تا ۴۰ میکروگرم در دسی‌لیتر است (نمودار ۳). حساسیت روش مذکور در حد ۰/۵ میکروگرم در دسی‌لیتر است. روش هضم اسیدی از دقت کافی برخوردار بوده و درصد ضرایب تغییرات درون‌آزمونی و برون‌آزمونی به ترتیب کمتر از ۱۰ و ۱۲ درصد می‌باشد (جدول ۱). براساس آزمون‌های بازیافت

REFERENCES

- Azizi, F.; Aminorroya, A.; Hedayati, M.; Rezvani, H.; Amini, M.; Mirmiran, P. (2003) Urinary iodine excretion in pregnant women residing in areas with adequate iodine intake. *Public Health Nutr*; 6(1): 95-8.
- Azizi, F.; Mirmiran, P.; Sheikholeslam, R.; Hedayati, M.; Rastmanesh, R. (2002). The relation between serum ferritin and goiter, urinary iodine and thyroid hormone concentration. *Int J Vitam Nutr Res.*; 72(5): 296-9.
- Azizi, F.; Rahmani, M.; Allahverdian, S.; Hedayati, M. (2001). Effects of salted food consumption on urinary iodine and thyroid function tests in two provinces in the Islamic Republic of Iran. *East Mediterr Health J.*; 7(1-2): 115-20.
- Benotti, J.; Benotti, N.; Pino, S.; Gardyna, H. (1965). Determination of total iodine in urine, stool, diets, and tissue. *Clin Chem.*; 11: 932-6.
- Momčilović, B.; Prejac, J.; Višnjević, V.; Skalnaya, M.G.; Mimica, N.; Drmić, S.; Skalny, A.V. (2014). Hair iodine for human iodine status assessment. *Thyroid*; 24(6): 1018-1026.
- Dunn, J.T.; Myers, H.E.; Dunn, A.D. (1998). Simple methods for assessing urinary iodine, including preliminary description of a new rapid technique ("Fast B"). *Exp Clin Endocrinol Diabetes.*; 106 Suppl 3: S10-2.
- Furnee, C.A. (1997). Prevention and control of iodine deficiency: a review of a study on the effectiveness of oral iodized oil in Malawi. *Eur J Clin Nutr.*; 51(4): S9-10.
- Garry, P.J.; Lashley, D.W.; Owen, G.M. (1973). Automated measurement of urinary iodine. *Clin Chem.*; 19: 950-3.
- Hedayati, M.; Khazan, M.; Yaghmaee, P.; Yeghaneh, M.Z.; Behdadfar, L.; Daneshpour, M.S. (2011). Rapid microwave digestion and microplate reading format method for urinary iodine determination. *Clin Chem Lab Med.*; 49(2): 281-4.
- Hedayati, M.; Khazan, M.; Yaghmaee, P.; Yeghaneh, M.Z.; Behdadfar, L.; Daneshpour, M.S. (2011). Rapid

- microwave digestion and microplate reading format method for urinary iodine determination. *Clin Chem Lab Med.*; 49(2): 281-4.
- Hedayati, M.; Ordookhani, A.; Daneshpour, M.S.; Azizi, F. (2007). Rapid acid digestion and simple microplate method for milk iodine determination. *J Clin Lab Anal.*; 21(5): 286-92.
- Hedayati, M.L.; Ordookhani, A.; Daneshpour, M.S.; Azizi, F. (2007). Rapid acid digestion and simple microplate method for milk iodine determination. *J Clin Lab Anal.*; 21(5): 286-92.
- May, S.L.; May, W.A.; Bourdoux, P.P.; Pino, S.; Sullivan, K.M.; Maberly, G.F. (1997). Validation of a simple, manual urinary iodine method for estimating the prevalence of iodine deficiency disorders, and interlaboratory comparison with other methods. *Am J Clin Nutr.*; 65: 1441-5.
- Mesko, M.F.; Mello, P.A.; Bizzi, C.A.; Dressler, V.L.; Knapp, G.; Flores, E.M. (2010). Iodine determination in food by inductively coupled plasma mass spectrometry after digestion by microwave-induced combustion. *Anal Bioanal Chem.*; 398(2): 1125-31.
- Momcilovic, Berislav (2014). Hair Iodine for Human Iodine Status Assessment. *Thyroid.*; 24: 1018-1026.
- Nikolic, S.D.; Mutic, J.J.; Lolic, A.D.; Manojlovic, D.D. (2005). Sensitive flow-injection amperometric detection of iodide using Mn^{3+} and As^{3+} . *Anal Sci.*; 21(5): 525-9.
- O'Brien, B.; (2013). Iodine concentrations in milk. *Irish J Agr Food Res.*; 52: 209-216.
- Ohashi, T.; Yamaki, M.; Pandav, C.S.; Karmarkar, M.G.; Irie, M. (2000). Simple microplate method for determination of urinary iodine. *Clin Chem.*; 46: 529-36.
- Rendl, J.; Bier, D.; Groh, T.; Reiners, C.; (1998). Rapid urinary iodide test. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.*; 106(3): S12-6.
- Ristic-Medic, D.; Piskackova, Z.; Hooper, L.; Ruprich, J.; Casgrain, A.; Ashton, K.; *et al.* (2009). Methods of assessment of iodine status in humans: a systematic review. *Am J Clin Nutr.*; 89: S2052-69.
- Salarkia, N.; Hedayati, M.; Mirmiran, P.; Kimiagar, M.; Azizi, F. (2003). Evaluation of the impact of an iodine supplementation programme on severely iodine-deficient schoolchildren with hypothyroidism. *Public Health Nutr.*; 6(6):529-33.
- Sandell, E.B.; Kolthoff, I.M. (1937). Micro determination of iodine by a catalytic method. *Microchemica Acta.*; 1: 9-25.
- Yamaki, M.; Pandav, C.S.; Karmarkar, M.G.; Irie, M.; Ohashi, T. (2000). Simple microplate method for determination of urinary iodine. *Clin Chem.*; 46: 529-36.