

# STANOVENÍ IOPROMIDU A IOPAMIDOLU VE VODÁCH METODOU HPLC-MS-MS S VYUŽITÍM ON-LINE PREKONCENTRACE A KOLON S PORÉZNÍM GRAFITICKÝM UHLÍKEM

JIRÍ KOKŠAL a ROMANA BERANOVÁ

*Povodí Ohře, s.p., Odbor vodohospodářských laboratoří,  
oddělení speciální organické analýzy, Novosedlická 758,  
415 01 Teplice  
koksalsal@poh.cz*

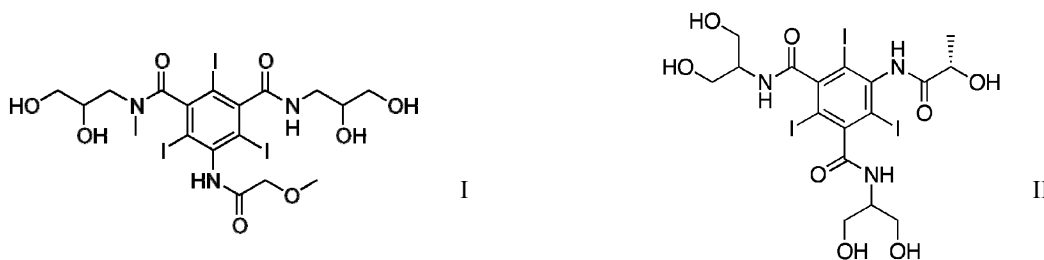
Došlo 27.3.12, přepracováno 9.5.13, přijato 14.6.13.

Klíčová slova: iopromid, iopamidol, stanovení metodou LC-MS/MS, on-line prekoncentrace, analýza vod

## Úvod

Problematika sledování koncentrace farmaceutických přípravků ve složkách životního prostředí je velmi rozsáhlá. Zvláštní skupinou farmaceutik jsou látky používané v radiodiagnostice jako látky tzv. rentgenokonstrastní, mezi které patří i iopromid a iopamidol. Tyto látky jsou od roku 2010 Mezinárodní komisí pro ochranu Labe (MKOL), zařazeny do Mezinárodního programu měření Labe<sup>1</sup>. Jejich nálezy v povrchových vodách jsou významné a pro posouzení vlivu na životní prostředí je nutné kontaminaci povrchových vod monitorovat.

Iopromid a iopamidol jsou deriváty kyseliny trijodisofthalové (obr. 1). Jde o slabé kyseliny (pKa iopromidu je 10,6 a iopamidolu 10,9)<sup>2</sup>, polární a dobře rozpustné ve vodě, ve složkách životního prostředí jsou stabilní. Vzhledem k uvedeným vlastnostem jsou obtížně dělitelné pomocí RP-HPLC a je tedy nutné je separovat, popř. i prekoncentrovat na speciálních sorbentech. Aplikační list firmy Agilent Technologies<sup>3</sup> doporučuje prekoncentraci analytů



Obr. 1. Iopromid (I) a iopamidol (II)

z vodného prostředí pomocí styren-divinylbenzenových SPE kolonek a stanovení na analytické koloně Pentafluor-fenyl 3  $\mu\text{m}$  s MS/MS detekcí. Limit detekce autoři uvádějí okolo 50  $\text{ng l}^{-1}$ .

Za zmínku stojí i práce autorů Busetiho a spol.<sup>4</sup>, kteří publikovali tzv. metodu DI-LC-MS/MS (direct injection liquid chromatography – tandem mass spectrometry) pro stanovení celkem osmi rentgenokonstrastních látek s použitím kolony Gemini C-18. Pro iopromid a iopamidol dosáhli v odpadních vodách (s použitím přímého nástřiku 100  $\mu\text{l}$  vzorku) limitu detekce cca 0,2  $\mu\text{g l}^{-1}$ .

Jiné řešení stanovení navrhli Sacher a spol.<sup>5</sup>, kteří popsali metodu stanovení šesti rentgenokonstrastních látek ve vodách metodou iontové chromatografie s detekcí ICP-MS s detekčním limitem kolem 0,2  $\mu\text{g l}^{-1}$ . Skupinovou metodu stanovení tzv. TAOI (Total adsorbable organic iodine) v odpadních vodách z nemocničního zařízení publikovali Fono a Sedlak<sup>6</sup>. Metoda je založena na oxidaci jodu přítomného ve sloučeninách peroxidem vodíku v přítomnosti Cu(II).

Problematika analytické separace polárních látek je v celé řadě případů řešena postupy derivatizace, separace na kolonách se zakotvenou polární fází (např. HILIC), popř. s použitím kolon s porézním grafitickým uhlíkem. Vlastnosti analytických kolon na bázi porézního grafitického uhlíku je možné nalézt např. v publikacích<sup>7,8</sup>.

V této práci je prezentována metoda založená na přímém spojení SPE (extrakce tuhou fází) prekoncentrace analytů s kapalinovým chromatografem s hmotnostní detekcí. K prekoncentraci a separaci bylo použito právě kolon na bázi porézního grafitického uhlíku s obchodním názvem Hypercarb<sup>TM</sup>. Metoda byla v požadovaném rozsahu výkonnostních parametrů validována a od konce roku 2011 je rutinně používána v laboratořích Povodí Ohře, s.p.

## Experimentální část

### Materiál a metody

#### Chemikálie

Methanol čistoty hypergrade pro LC-MS, LiChrosolv (Merck, ČR), kyselina octová 98–100 % suprapur (Merck, ČR), voda čistoty LC-MS ChromaSolv (Sigma-Aldrich, ČR), Acetonitril Ultra Gradient HPLC Grade (J. T. Baker, ČR).

Zásobní roztoky iopromidu a iopamidolu o koncentraci  $1 \text{ g l}^{-1}$  byly připraveny z referenčních standardů, dodaných firmou Dr. Ehrenstorfer (Chromservis s.r.o., ČR), navážením 0,0100 g a doplněním do 10 ml odměrné baňky methanolem. Z takto připraveného roztoku byly ředěním vodou pro LC-MS připravovány kalibrační roztoky.

#### Kolony

Pro on-line SPE prekoncentraci analytů byla použita kolona Hypercarb (Pragolab, ČR) délky 20 mm, průměru 3 mm a velikostí částic  $30 \mu\text{m}$ . Analytickou kolonou byla kolona Hypercarb (Pragolab, ČR) délky 50 mm, s vnitřním průměrem 3 mm a velikostí částic  $7 \mu\text{m}$ . Náplň kolon tvořil porézní grafitický uhlík.

#### Mobilní fáze a gradient

Mobilní fázi A tvořil roztok kyseliny octové o koncentraci 0,1 % v 5% vodném roztoku acetonitrilu. Mobilní fáze B byla tvořena 0,1% roztokem kyseliny octové v acetonitrilu. Program gradientu na prekoncentrační jednotce a na chromatografické části je uveden v následujících tabulkách I a II.

Tabulka I

Program gradientů prekoncentračního kroku a chromatografické separace

Čas [min]	Průtok [ $\text{ml min}^{-1}$ ]	Mobilní fáze A [%]	Mobilní fáze B [%]
<i>Prekoncentrační krok</i>			
0	2	95	5
2,5	1	0	100
7	1	0	100
8	2	95	5
10	2	95	5
<i>Chromatografická separace</i>			
0		95	5
1,5		95	5
6	0,3	0	100
8,5		0	100
10		95	5

Tabulka II

Parametry HESI

Parametr	Jednotka	Hodnota
Napětí iontového zdroje	V	3900
Teplota iontového zdroje	$^{\circ}\text{C}$	150
Ion sweep gas pressure	relativní jednotky	0,5
Aux gas pressure	relativní jednotky	15
Teplota kapiláry	$^{\circ}\text{C}$	325
Sheat gas pressure	relativní jednotky	60

#### Instrumentace

Měření byla prováděna na přístroji HPLC-MS/MS firmy (Thermo Fischer Scientific, USA), autosampler HTS-PAL (CTCAntalytics, Švýcarsko), HPLC čerpadlo pro on-line SPE Surveyor čtyřkanálové pro gradientovou eluci (Thermo Fischer Scientific, USA), vysokotlaké čerpadlo pro HPLC Accela také čtyřkanálové pro gradientovou eluci (Thermo Fischer Scientific, USA), detektor trojitý kvadrupól TSQ Quantum Ultra (Thermo Fischer Scientific, USA).

#### Parametry měření

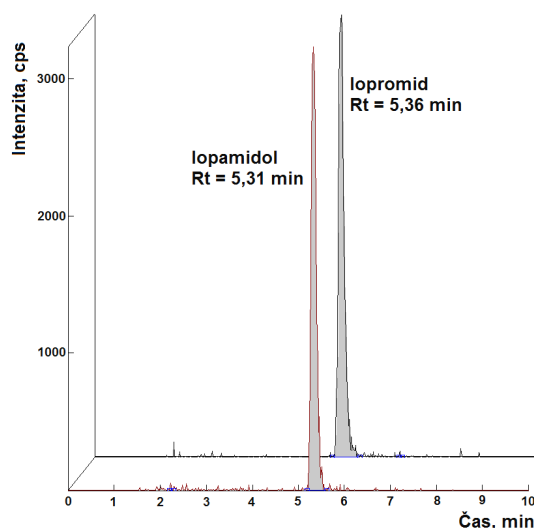
V tab. II jsou uvedeny parametry nastavení ionizační sondy HESI (Heated Electrospray Ionization) přístroje TSQ Quantum Ultra. Na obr. 2 je vyobrazen typický chromatografický záznam měření obou látek (intenzita signálu je uvedena v cps-counts per second).

## Výsledky a diskuse

### Testované výkonnostní parametry metody

V rámci validační studie bylo provedeno testování metody a určeny níže uvedené výkonnostní parametry metody (tab. IV).

- Opakovatelnost na dvou koncentračních úrovních
- Mez detekce a mez stanovitelnosti – určená z opakovatelnosti na dolní hranici kalibračního rozsahu
- Rozšířená nejistota stanovení – z opakovatelnosti, rozšířená koeficientem 2
- Vliv matrice vzorku – měření reálných vzorků se známým přídatkem analytu
- Mezilaboratorní porovnávací zkouška – porovnání s nezávislou laboratoří



Obr. 2. Chromatogram směsi Iopromidu a Iopamidolu o koncentraci 80 ng

Tabulka III  
MS/MS charakterizace sledovaných látek

Látka	Užití iontu	Mateřský iont [ <i>m/z</i> ]	Produktový iont [ <i>m/z</i> ]	Kolizní energie [V]	Polarizace zdroje
Iopromid	kvalifikační	777,4	386,7	40	+
Iopromid	kvantifikační	777,4	558,6	23	+
Iopamidol	kvalifikační	791,4	558,6	29	+
Iopamidol	kvantifikační	791,4	572,6	25	+

Tabulka IV  
Vybrané výkonnostní parametry metody

Analyt	Koncentrační úroveň [ng l <sup>-1</sup> ]	Průměr naměřených hodnot [ng l <sup>-1</sup> ]	Opakovatelnost (RSD) [%]	L <sub>D</sub> [ng l <sup>-1</sup> ]	L <sub>Q</sub> [ng l <sup>-1</sup> ]	L <sub>Q</sub> z poměru S/N [ng l <sup>-1</sup> ]	Rozšířená nejistota [%]
Iopromid	20	19,9	3,3	2	6,6	0,33	30
	1000	858	2,5	-	-	-	10
Iopamidol	20	22,3	6,2	4,1	13,7	0,14	30
	1000	974	2,1	-	-	-	10

#### Opakovatelnost, L<sub>D</sub> a L<sub>Q</sub>

Za účelem zjištění opakovatelnosti metody bylo provedeno měření na dvou koncentračních úrovních 20 a 1000 ng l<sup>-1</sup>. Zjištěné hodnoty jsou uvedeny v tab. V. Limit detekce resp. stanovitelnosti (L<sub>D</sub> resp. L<sub>Q</sub>) byl vypočten jako troj- resp. desetinasobek směrodatné odchylky opakovatelnosti na koncentrační úrovni 20 ng l<sup>-1</sup>. Pro srovnání je v tabulce uvedena i hodnota limitu stanovitelnosti, který byl získán jako koncentrace odpovídající poměru signál/šum S/N = 10.

Rozšířená nejistota, uvedená v tab. IV, byla vypočtena jako dvojnásobek opakovatelnosti, navýšený kvalifikovaným odhadem. Během používání metody bude tento odhad upraven podle získaných zkušeností – z regulačních diagramů a z výsledků mezilaboratorních porovnávacích zkoušek.

Z výsledků je patrné, že limit stanovitelnosti odhadnutý z poměru signál/šum a z opakovatelnosti jsou data nesrovnatelná. L<sub>Q</sub> vypočtený z poměru signál/šum je

v praxi nereálný. Důvodem nízké hodnoty tohoto parametru je pravděpodobně výpočetní algoritmus, který ovládá software přístroje používá. Proto byl pro účely požadavku systému jakosti použit limit stanovitelnosti určený z opakovatelnosti na koncentrační úrovni 20 ng l<sup>-1</sup>.

#### Vliv matrice vzorku

Vliv matrice byl studován přidávkem známého množství analytu k reálným matricím. Byla testována průmyslová odpadní voda, voda z povrchového zdroje pitné vody a voda čistoty pro LC-MS. Vzorek byl před měřením filtrován přes stříkačkový filtr z regenerované celulosy o průměru 30 mm a velikosti pórů 0,45 μm. V následující tab. V jsou uvedeny střední relativní výtěžnosti pro jednotlivé matrice.

Z výsledků je patrné, že vliv matrice vzorku je významný a v případě analýz odpadních vod je nutné k němu přihlížet.

Tabulka V  
Vliv matrice vzorku na výtěžnost

Matrice	Analyt	Koncentrace přidávku [ng l <sup>-1</sup> ]	Počet měření	Opakovatelnost [%]	Výtěžnost [%]
Voda pro LC-MS/ MS	iopromid	20	10	3,3	99,4
	iopamidol		9	6,2	111,5
Povrchová voda	iopromid	10	10	8,7	92,9
	iopamidol		10	8,9	87,7
Průmyslová odpadní voda	iopromid	100	10	13,5	70,8
	iopamidol		10	7,7	74,9

Tabulka VI  
Výsledky mezilaboratorní porovnávací zkoušky

Vzorek	Analyt	$C_A$ [ng l <sup>-1</sup> ] <sup>a</sup>	$U_A$ [ng l <sup>-1</sup> ] <sup>b</sup>	$C_B$ [ng l <sup>-1</sup> ] <sup>a</sup>	$U_B$ [ng l <sup>-1</sup> ] <sup>b</sup>	$E_n$ -skóre
1	iopromid	160	48	150	45	0,15
	iopamidol	190	57	190	57	0
2	iopromid	150	45	150	45	0
	iopamidol	190	57	170	51	0,26
3	iopromid	< 50	–	< 20	–	–
	iopamidol	< 50	–	< 20	–	–

<sup>a</sup>  $C_{A(B)}$  je výsledek měření laboratoře A resp. B, <sup>b</sup>  $U_{A(B)}$  je rozšířená nejistota laboratoře A resp. B

#### Mezilaboratorní porovnání (MP)

Norma ČSN EN ISO/IEC 17043 (cit.<sup>9</sup>) připouští tzv. bilaterální zkoušení způsobilosti a Národní akreditační orgán ČIA tento proces také uznává a specifikuje ve svém metodickém listu<sup>10</sup> MPA 30-03-12. V rámci tohoto MP byly připraveny dva vzorky s přídatkem analytů o výsledné koncentraci 200 ng l<sup>-1</sup>. K přípravě vzorku 1 byla použita povrchová voda a k přípravě vzorku 2 to byla voda čistoty pro LC-MS/MS. Pro kontrolu byla ověřena koncentrace analytů v povrchové vodě bez přídatku – vzorek 3.

Vyhodnocení bylo provedeno pomocí  $E_n$ -skóre<sup>9</sup> a jako referenční byla zvolena laboratoř A, která má metodu stanovení iopromidu a iopamidolu již akreditovanou. Výsledky jsou shrnuty v následující tab. VI.

Z výsledků MP vyplývá, že naše laboratoř, tedy laboratoř B, poskytuje srovnatelné výsledky s referenční laboratoří A.

#### LITERATURA

1. <http://www.ikse-mkol.org/uploads/media/MKOL-Program-mereni-2010.pdf>, staženo 10.3.2012.
2. <https://www.ebi.ac.uk/chembl/db/>, staženo 1.2.2012.
3. Agilent Technologies, Inc.: *Application Note SI-02188*, Agilent Technologies, Inc. 2010.
4. Busetti F., Linge K. L., Blythe J. W., Heitz A.: *J. Chromatogr. A* 1213, 200 (2008).
5. Sacher F., Raue B., Brauch H.-J.: *J. Chromatogr. A* 1085, 117 (2005).

6. Fono L. J., Sedlak D. L.: *Water Res.* 41, 1580 (2007).
7. Hennion M.-C.: *J. Chromatogr. A* 885, 73 (2000).
8. Thermo Electron Corporation, Inc.: *Hypercarb™ HPLC Columns Technical Guide*, Thermo Electron Corporation 2004.
9. ČSN EN ISO/IEC 17043: *Posuzování shody – Všeobecné požadavky na zkoušení způsobilosti* (2010).
10. MPA 30-03-12: *Metodické pokyny pro akreditaci – Politika ČIA pro účast v národních a mezinárodních aktivitách v oblasti zkoušení způsobilosti*, Český institut pro akreditaci, o.p.s., Praha 2012.

**J. Kokšal and R. Beranová** (*Ohře River Basin, Department of Water Laboratories, Teplice, Czech Republic*): **HPLC-MS Determination of Iopromide and Iopamidol in Waters Using On-line Preconcentration in Porous Graphite Columns**

Determination of Iopromide and Iopamidole in surface and waste waters was developed. A porous graphitic carbon sorbent was used for pre-concentration and separation of analytes, in combination with tandem mass spectrometry as detection technique. The method was validated and applied in routine analyses. Its characteristics such as repeatability, limits of detection and determination are presented together with evaluation of matrix effects. The working range was 20–1000 ng L<sup>-1</sup>, limit of determination 20 ng L<sup>-1</sup> and expanded uncertainty 30 %.