

Semiquantitativer Nachweis von Bromid mit Flow-Injection-Analysis ESI/MS

Frederike Stöth¹, Alexandra Schröck¹, Hilke Andresen-Streichert²,
Wolfgang Weinmann¹

¹Universität Bern, Institut für Rechtsmedizin, Forensische Toxikologie und Chemie,
Bühlstrasse 20, CH-3012 Bern; wolfgang.weinmann@irm.unibe.ch

²Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, Institut für Rechtsmedizin, Arbeitsbereich
Toxikologie und Alkoholologie, Butenfeld 34, D-22529 Hamburg

1. Einleitung

Von Oktober bis Dezember 2007 kam es in Cacuaco in der Provinz Luanda, Angola zu einem Ausbruch einer akuten neurologischen Erkrankung mit unbekannter Ursache [1]. Betroffen waren in erster Linie Kinder und Frauen, außerdem konnte eine familiäre Anhäufung beobachtet werden. Die Symptome waren u.a. Müdigkeit, Schwindel, Schwäche, Halluzinationen, Schwierigkeiten beim Sprechen und Laufen und verschwommene Sicht. Daher wurde eine toxikologische Ursache vermutet. Auf Grund der vielen Betroffenen und der Dringlichkeit wurde die WHO zur Untersuchung hinzugezogen. Diese leitete die Proben an verschiedene Laboratorien in Europa weiter. Es stellte sich heraus, dass es sich bei den über 450 offiziell bestätigten Fällen um eine Bromidintoxikation handelte. Verwendetes Tafelsalz war mit über 80% Natriumbromid verunreinigt und führte zum größten, bis dato in der Literatur beschriebenen Fall von akutem Bromismus.

Anfang des 19. Jahrhunderts wurden Bromidsalze als Sedativa entdeckt und lange bedenkenlos genutzt. 1857 wurde Bromid als erstes und, bis zur Einführung von Phenobarbital 1912, einziges Antikonvulsivum durch Sir Charles Locock beschrieben [2,3]. Ab 1900 war die Nutzung von Natrium- und Kaliumbromiden als Sedativa und Antikonvulsiva weit verbreitet. Auch rezeptfreie Arzneimittel wie Bromo-Seltzer und Dr. Miles' Nervine waren erhältlich und populär.



Abb. 1. Reklame für Bromo-Seltzer aus dem Programm des Hicks-Theater im Jahre 1907 [4].

Es zeigten sich bald zahlreiche Abhängigkeiten, die zu einer chronischen Intoxikation mit den oben genannten Symptomen führten. Weitere charakteristische Symptome sind pathologische Reflexe, Kachexie, Exsikkose, Sensibilitätsstörungen, Delirzustände, Aggressivität, Psychosen, Pupillenanomalien und Hautausschläge in Form von akneförmiger Dermatitis („Bromakne“) und granulomatöser, eitriger Läsionen, sogenannter Bromoderma [5,6]. Intoxikationen resultieren hauptsächlich durch chronische wiederholte Expositionen. Die akute orale Bromidintoxikation ist kaum möglich, da es durch die Reizwirkung der Bromid-Ionen zu Übelkeit und Erbrechen kommt [2]. Da bromidhaltige Arzneimittel heute größtenteils aus dem Handel entfernt wurden, ist Bromismus weitestgehend aus dem klinischen Alltag verschwunden. Allerdings wird Kaliumbromid auch heute noch als Dritt-Linien-Therapie bei therapieresistenten Epilepsien oder bei idiopathisch generalisierter Epilepsie verwendet und scheint die beste Therapie für Anfallsleiden während der Kindheit zu sein [7-9].

Bromid wird im Gastrointestinaltrakt vollständig resorbiert. Die Verteilung von Bromid-Ionen im Körper ist denen von Chlorid sehr ähnlich und es kann die Bluthirnschranke durchdringen. Der genaue Wirkmechanismus ist noch nicht geklärt. Eine Möglichkeit ist die indirekte Wirkung auf GABA_A-Rezeptoren, ligandengesteuerte Ionenkanäle, welche für Chlorid-Ionen durchlässig sind. Durch die Bindung von GABA (γ -Aminobuttersäure) an den spezifischen Rezeptor erhöht sich die Permeabilität für Chlorid-Ionen. Dies führt zu einer Hyperpolarisation der Zellmembran und damit zu einer Abnahme der Aktionspotenzialfrequenz. Hydratisiertes Bromid hat einen kleineren Durchmesser als hydratisiertes Chlorid, kann daher schneller durch den Kanal diffundieren und es kommt zu den sedierenden Effekten [2].

Bromid reagiert auf viele Chlorid-Nachweismethoden stärker als das Chlorid selbst. Dies kann in gängigen Untersuchungsmethoden beim Vorhandensein von Bromid zu einer negativen Anionenlücke führen [5]. Bromide werden hauptsächlich renal eliminiert und konkurrieren dabei mit Chlorid um die tubuläre Reabsorption. Die Halbwertszeit des Bromids kann sich durch eine verringerte oder vermehrte Aufnahme von Chlorid drastisch verändern. Da Bromide eine geringe therapeutische Breite haben, sollte bei deren Anwendung auch auf die Chlorid-Aufnahme geachtet werden [10]. Es wird in der Literatur keine Korrelation zwischen dem Plasmaspiegel und der Wirksamkeit beschrieben [7]. Allerdings gibt es eine grobe Einteilung nach Schulz et al. beruhend auf Fallberichten und Literaturangaben [11].

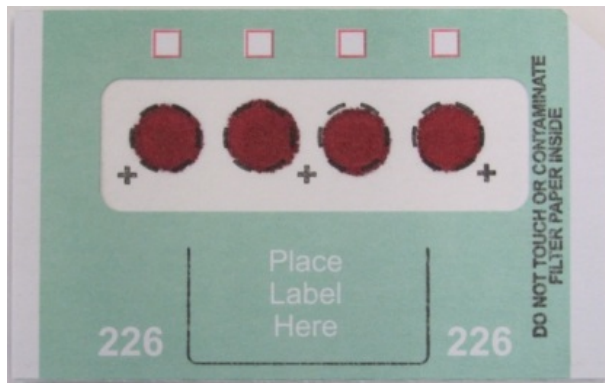
Tab. 1. Therapeutische, toxische und komatös-letale Blutplasmakonzentrationen im Menschen [11].

Bromid-Blutplasmakonzentration (mg/L)			t _{1/2} (Tage)
therapeutisch („normal“)	toxisch (von)	komatös-letal (von)	
75 - 100 (- 300)	500 - 1500; 3000 ¹ ¹ Fallbericht	2000	12 – 13

Typische Analysenmethoden waren bis jetzt die Ionenchromatographie mit induktiv gekoppelter Plasma-Massenspektrometrie (IC-ICP/MS), mit Leitfähigkeitsdetektor oder mit kolorimetrischem Detektor [12]. Auch die Bestimmung mit einem energiedispersiven Röntgenfluoreszenzspektrometer (EDXRF) gehörte zur analytischen Praxis [13-15]. Die wohl älteste, bis heute angewandte Bromidbestimmung, ist die Goldchlorid-Methode, bei der eine Proteinfällung mit Trichloressigsäure durchgeführt, danach mit einer Goldchlorid-Lösung behandelt und anschließend kolorimetrisch oder photometrisch quantifiziert wird [16,17]. Dabei wird eine Goldbraunfärbung bei λ_{\max} 470 nm gemessen.

2. Material und Methoden

Vier Blutproben eines Epilepsie-Patienten aus Hamburg wurden jeweils zeitnah nach der Entnahme im Rahmen von therapeutischem Drug Monitoring (TDM) (ab März 2015) mit der validierten Goldchlorid-Methode analysiert, danach teilweise bis zu 10 Monate gekühlt gelagert, und im Dezember 2015 als Dried Blood Spots (DBS) für die FIA-ESI-MS-Analyse präpariert.



Dazu wurden je 20 μL Blut pro Spot auf eine Filterkarte aufgetragen (Abb. 2) und bei Raumtemperatur über Nacht luftgetrocknet. Zum Versand wurden die Filterkarten in Minigrip-Tüten mit Silicagel-Trocknungsmittel verpackt.

Abb. 2. Filterkarte (Bioanalysis card no. 226-1004, PerkinElmer, Schwerzenbach, Switzerland) mit vier 20 μL Dried Blood Spots einer Blutprobe.

Zur Aufarbeitung wurde je ein DBS (von 20 μL Blut) komplett ausgestanzt und nach Zugabe von 1 mL Wasser und Methanol (1:4 v/v) und 5 μL Kaliumiodid-Lösung (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Iodid in Wasser) als internem Standard 15 Minuten geschüttelt. Der Überstand wurde in ein 2 mL-Glasvial überführt und unter Stickstoff bei 50 °C abgedampft. Der Rückstand wurde mit 200 μL 0.1 % Ameisensäure (HCOOH) in Wasser und 0.1 % Ameisensäure in Acetonitril (95:5 v/v) aufgenommen, in ein 350 μL -Autosamplervial überführt und 10 μL injiziert.

Die massenspektrometrische Bestimmung erfolgte mit einem HPLC-System (Agilent 1200 bzw. 1100) und CTC PAL Autosampler, gekoppelt mit einem Sciex 3200 QTRAP im negativen ESI-Modus. Es wurde ohne Chromatographiesäule durch Flow-Injection-Analyse (FIA), mit Fließmitteln A: 0.1 % HCOOH und B: 0.1 % HCOOH in Acetonitril (95:5 v/v), isokratisch gemessen. Die Laufzeit betrug 2 Minuten, die Flussrate 0.5 mL/min. Die MS-Analyse erfolgte im Selected-Ion-Monitoring-Modus (SIM), wobei die im Q1-selektierten Ionen nach Durchlaufen der Kollisionszelle (mit 10 eV Kollisionsenergie) ebenfalls im dritten Quadrupol registriert wurden (Quellentemperatur 600 °C, ESI negativ: -3500 V, DP -45 V; m/z 79 amu und m/z 81 amu für Bromid, m/z 127 amu für Iodid). Die Kalibrierung erfolgte durch Dotierung von Vollblutproben im Bereich von 100 – 3000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ und Herstellung von DBS mit je 20 μL . Die Vergleichsanalyse am IRM Hamburg erfolgte mit der Goldchlorid-Methode mit einem standardisierten und validierten spektrophotometrischen Verfahren (λ_{max} 470 nm) nach Proteinfällung mit Trichloressigsäure.

3. Ergebnisse

Durch lineare Regression (ungewichtet) wurden im Kalibrationsbereich von 100 – 3000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Korrelationskoeffizienten von $r = 0.9996$ (m/z 79 amu) bzw. $r = 0.9947$ (m/z 81 amu) erzielt. In Abbildung 3 sind die extrahierten Ionenchromatogramme (XIC's) der Proben 1 bis 4 abgebildet. Die Resultate der Quantifizierung mit den Ionenverhältnissen (79/127 bzw. 81/127) und die Ergebnisse mit der Goldchlorid-Methode sind in Abbildung 4 dargestellt. Die Konzentrationen in den untersuchten Blutproben liegen gemäß Tabelle 1 im toxischen Bereich, allerdings handelt es sich bei dem Patienten um ein Kind, welches bereits seit mehreren Jahren mit einer hohen Dosis Bromid behandelt wird und erst dadurch weitgehende Anfallsfreiheit erreicht werden konnte.

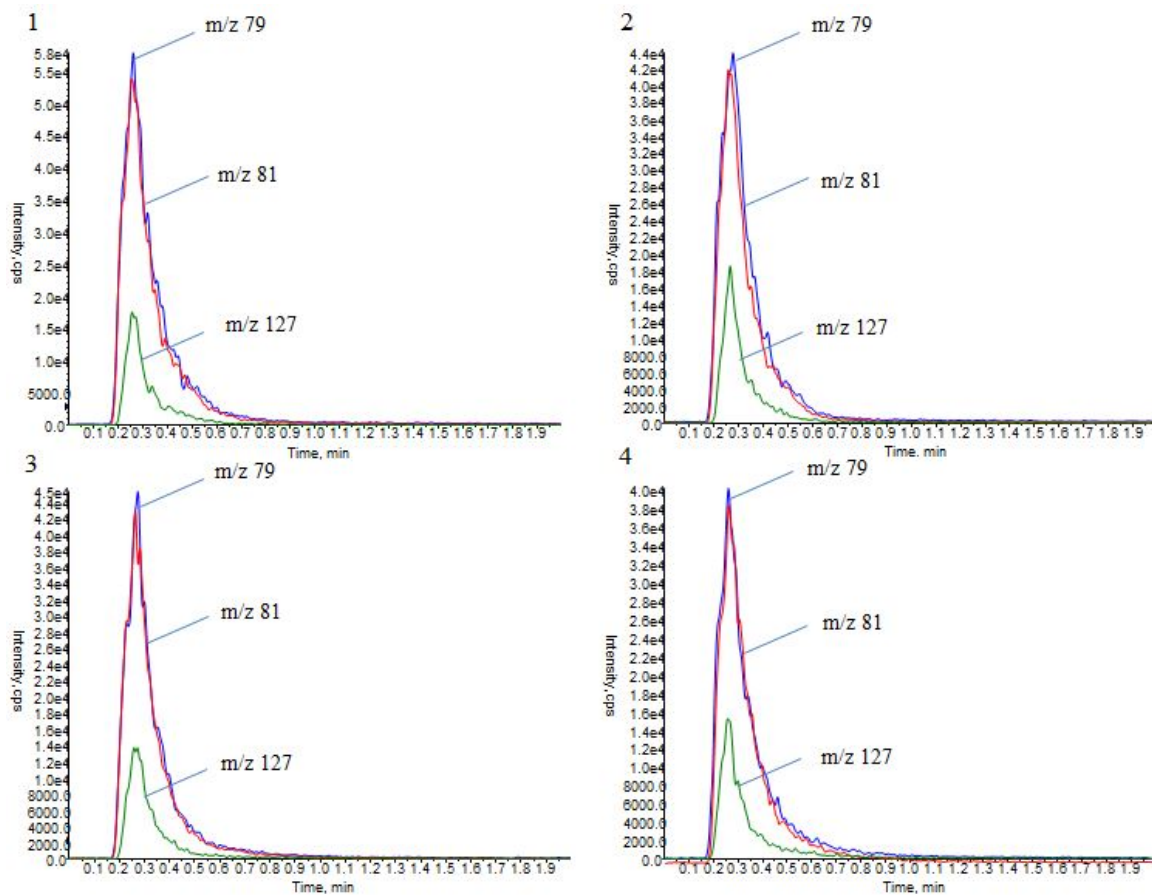


Abb. 3. XICs der Proben 1 bis 4, m/z 79 (blau), m/z 81 (rot), ISTD m/z 127 amu (grün) mit FIA ESI/MS.

Außerdem wurden zur Kontrolle zehn Blutproben von verschiedenen Probanden (ohne Bromidbehandlung) und mit einer Kalibration beschränkt auf den Bereich zwischen 10 – 300 µg/mL analysiert (lineare Regression: Korrelationskoeffizienten $r = 0.9915$ für m/z 79 amu bzw. $r = 0.9923$ für m/z 81 amu). Die ermittelten Bromidkonzentrationen dieser Blank-Proben lagen im Bereich von < 10 µg/mL („nicht nachgewiesen“) bis maximal 13.6 µg/mL und damit deutlich unterhalb des therapeutischen Bereichs, der ab 75 µg/mL beginnt.

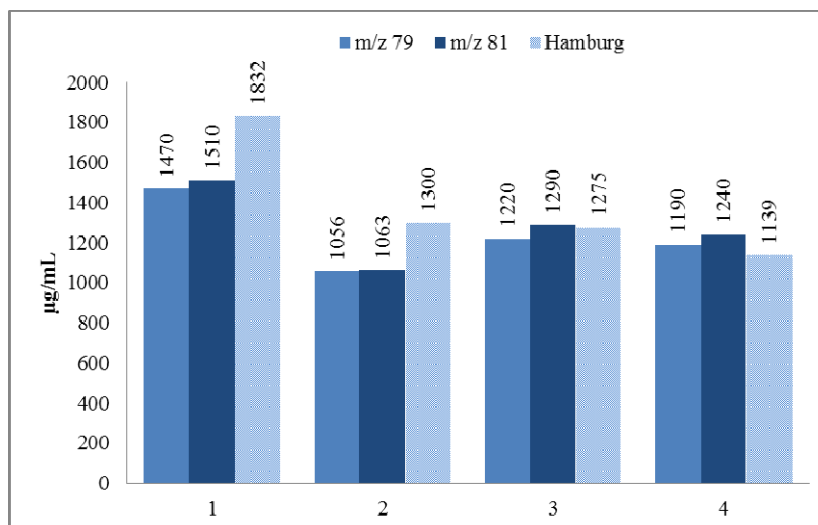


Abb. 4. Vergleich der quantitativen Ergebnisse aus den Ionenverhältnissen 79/127 bzw. 81/127 (Bromid und ISTD Iodid) mit FIA ESI/MS (IRM Bern) mit den Ergebnissen der Goldchlorid-Methode (IRM Hamburg).

4. Diskussion

Mittels FIA ESI-MS lässt sich Bromid aus Dried Blood Spots im therapeutischen bis toxischen Bereich nachweisen. Die Methode liefert mit der Goldchlorid-Methode vergleichbare quantitative Resultate und kommt mit den gängigen Fließmitteln für LC-MS aus. Durch die Probenpräparation als DBS, die anschließende Extraktion mit Wasser/MeOH (1:4, v/v) und Rekonstitution mit mobiler Phase, sowie durch Zugabe von Iodid als ISTD werden die Proben soweit aufgereinigt und verdünnt, dass 10 µL-Aliquote ohne weitere chromatographische Trennung in die Ionenquelle des Massenspektrometers injiziert werden können. Auf eine Chromatographiesäule (z.B. Ionentauschersäule) kann also verzichtet werden. Ein weiterer Vorteil von DBS ist, dass die Proben problemlos versandt werden können. Die FIA ESI-MS Methode ergibt vergleichbare Ergebnisse mit der Goldchlorid-Methode, die am IRM Hamburg validiert ist und für TDM eingesetzt wird. Die FIA ESI-MS-Methode ist eine schnelle und zuverlässige Alternative zur (semi-) quantitativen Bestimmung von Bromid im Blut. Wir nutzen das Verfahren als Screening-Verfahren auf Bromid bei Intoxikationsverdacht bzw. zum Ausschluss einer Bromid-Intoxikation. Auf eine weitere Validierung wurde bisher verzichtet, da positive Ergebnisse sehr selten sind, und gegebenenfalls mit der zweiten Methode zu bestätigen wären.

5. Danksagung

Die Arbeit entstand während des Pharmaziepraktikums von Frederike Stöth. Ich bedanke mich an dieser Stelle bei den Mitarbeiter/Innen der FTC am IRM Bern für die Einweisung in die LC-MS/MS und die gute Zusammenarbeit.

6. Literatur

- [1] World Health Organisation. Outbreak of Neurological Illness of Unknown Etiology in Cacuaco Municipality, Angola. 2008 [accessed 21. Mar 2016]; Available from: http://www.who.int/environmental_health_emergencies/events/Angola%20cause%20finding%20mission%20report%20Executive%20Summary%20for%20Web%20V190308.pdf?ua=1.
- [2] Lugassy, D. and L. Nelson, Case files of the medical toxicology fellowship at the New York City poison control: bromism: forgotten, but not gone. *J Med Toxicol*, 2009. 5(3): p. 151-7.
- [3] Pearce, J.M., Bromide, the first effective antiepileptic agent. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2002. 72(3): p. 412.
- [4] <http://www.oldadvertisements.co.uk/Advertisers/EmersonsBromoSeltzer.htm> [accessed 23. Mar 2016].
- [5] Emmett, M., Approach to the Patient With a Negative Anion Gap. *Am J Kidney Dis*, 2016. 67(1): p. 143-50.
- [6] Dibropharm, Fachinformation Dibro-Be mono 850 mg Tabletten, 2015: Rote Liste.
- [7] Korinthenberg, R., et al., Pharmacology, efficacy, and tolerability of potassium bromide in childhood epilepsy. *J Child Neurol*, 2007. 22(4): p. 414-8.
- [8] Woody, R.C., Bromide therapy for pediatric seizure disorder intractable to other antiepileptic drugs. *J Child Neurol*, 1990. 5(1): p. 65-7.
- [9] Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften. Leitlinie - Erster epileptischer Anfall und Epilepsien im Erwachsenenalter. [accessed 23. Mar 2016]; Available from: <http://www.awmf.org/leitlinien/detail/ll/030-041.html>.
- [10] Rauws, A.G., Pharmacokinetics of bromide ion - an overview. *Food Chem Toxicol*, 1983. 21(4): p. 379-82.
- [11] Schulz, M., et al., Therapeutic and toxic blood concentrations of nearly 1,000 drugs and other xenobiotics. *Crit Care*, 2012. 16(4): p. R136.
- [12] Quiñones, O., et al., Analysis of bromate and bromide in blood. *Toxicology*, 2006. 221(2-3): p. 229-234.
- [13] Takahashi, M., et al., Bromide detection in blood using energy dispersive X-ray fluorescence; a chemical marker supportive of drowning in seawater. *Leg Med (Tokyo)*, 2010. 12(3): p. 132-6.
- [14] Olszowy, H.A., et al., Background levels of bromide in human blood. *J Anal Toxicol*, 1998. 22(3): p. 225-30.
- [15] Tanaka, H., et al., Rapid determination of total bromide in human serum using an energy-dispersive X-ray spectrometer. *Biol Pharm Bull*, 2003. 26(4): p. 457-61.
- [16] Wuth, O., Rational bromide treatment: New methods for its control. *Journal of the American Medical Association*, 1927. 88(26): p. 2013-2017.
- [17] Moffat, A.C., *Clarke's Isolation and Identification of Drugs*. 2nd ed. 1986, London: The Pharmaceutical Press.