

ELEKTROFORETICKÉ STANOVENÍ BROMIDŮ V TĚLNÍCH TEKUTINÁCH

Tato práce je věnována prof. RNDr. Jiřímu Zimovi, CSc. u příležitosti jeho významného životního jubilea.

PETR TŮMA

Univerzita Karlova, 3. lékařská fakulta, Ruská 87, 100 00 Praha 10, Česká republika
petr.tuma@lf3.cuni.cz

Pro monitorování bromidů v krevní plazmě, moči a žaludeční šťávě prasat jako laboratorních organismů je využita kapilární elektroforéza s UV detekcí. K analýze je použito 20 μl tělní tekutiny, která je upravena 60 μl acetonitrilu s 2 mM KSCN jako interním standardem. Separace je prováděna v 90 mM tetraboritanu sodném s přidávkou 10 mM NaCl při pH 9,2. Při těchto experimentálních podmínkách je migrační čas bromidů 2,1 min, LOD se pohybuje na úrovni 48–51 μM a LOQ v rozmezí 148–171 μM pro jednotlivé tělesné tekutiny. Hodnoty RSD pro migrační čas jsou menší než 0,1 % a pro plochu píku v rozmezí 1,9–2,5 %. Vyvinutá metodika je použita pro časové monitorování bromidů v klinických vzorcích po intravenózní aplikaci NaBr laboratornímu zvířeti v dávce 50 mg kg^{-1} a aplikována pro výzkum v oblasti anesteziologie a resuscitace.

Klíčová slova: bromidy, extracelulární prostor, kapilární elektroforéza, klinické vzorky

Úvod

Bromidy na rozdíl od chloridů, jodidů a fluoridů jsou zřídka zmiňovány v biochemii, ale patří ke kofaktorům několika enzymů. Bromidy se podílí na post-translačních úpravách kolagenu IV (cit.¹), eozinofily imunitního systému je využívají v boji s parazity² a jejich hlavním zdrojem pro člověka je mořská sůl a plody moře³. Farmakologicky se NaBr a KBr hojně využívaly pro léčbu a prevenci schizofrenie a jako sedativa⁴. Příliš vysoké dávky bromidů jsou ovšem pro člověka toxické a spojené s vážnými neurologickými a dermatologickými příznaky^{5,6}.

Důležité uplatnění ovšem nalézají bromidy v intenzivní medicíně pro měření objemu extracelulární tekutiny⁷. Objem extracelulárního prostoru se výrazně mění při infuzích, zánětlivých procesech, anabolické terapii a proteínové malnutrici, které jsou předmětem intenzivního studia^{8,9}. Objem extracelulární tekutiny se měří pomocí specifických markerů, jako jsou chloridy, sírany nebo bromidy, které patří mezi elektrolyty extracelulárního prostoru. V případě bromidů není potřeba používat radioaktivní formy, kdy se studovanému organismu aplikuje pouze nízká dávka neznačeného NaBr a po dosažení rovnováhy se z koncentrace bromidů určí objem extracelulárního prostoru¹⁰. Pro fyziologické monitorování bromidů se standardně používá iontová chromatografie¹¹ nebo neutronová aktivační analýza¹².

Pro přímé sledování bromidů v komplexních klinických matricích lze s výhodou využít i kapilární elektroforézu (CE)¹³, popřípadě elektroforézu na mikročipu¹⁴.

CE separace prováděná v kapilárách o malém vnitřním průměru se vyznačuje vysokou separační účinností, krátkou dobou analýzy a také malými požadavky na množství klinického vzorku a jeho laboratorní úpravu¹⁵. Dosud byly popsány pouze dvě klinické aplikace techniky kapilární zónové elektroforézy (CZE) pro stanovení bromidů v krevním séru pro účely forenzní analýzy ve spojitosti s předávkováním léčivy^{16,17}. Cílem této studie bylo vypracovat CZE metodu pro rychlé monitorování bromidů v krevní plazmě, moči a žaludeční šťávě prasat jako laboratorních organismů, na nichž se provádí fyziologické experimenty.

Materiál a metody

Kapilární elektroforéza

Elektroforetické experimenty byly prováděny na přístroji Agilent 7100 (Agilent Technologies, Německo) s vestavěným detektorem diodového pole a bromidy byly detegovány při vlnové délce 200 nm. Separace byly prováděny v křemenné kapiláře o vnitřním/vnější průměru 25/360 μm (PolymicroTechnologies, CM Scientific, Velká Británie) a efektivní/celkové délce 23/31,5 cm. Nová kapilára byla nejprve kondicionována promytím 0,1 M NaOH po dobu 15 min, následně deionizovanou (DEI) vodou po 15 min a nakonec základním elektrolytem po dobu 30 min, vše tlakem 940 mbar. Vzorek byl do kapiláry dávkován hydrodynamicky tlakem 50 mbar po dobu 5 s a separace byla po-

háněna napětím -15 kV, kdy kapilárou teče proud $40 \mu\text{A}$. Mezi analýzami byla kapilára promývána základním elektrolytem po dobu 2 min.

Chemikálie, úprava vzorku a fyziologický experiment

Všechny použité chemikálie byly stupně čistoty $\geq 99\%$ a získány od těchto dodavatelů: tetraboritan sodný (borax, Sigma-Aldrich, Německo), NaCl (Lachema, ČR), NaOH (LachNer, ČR), NaBr (Sigma-Aldrich, Německo), KSCN (Lachema, ČR), acetonitril (Sigma-Aldrich, Německo). Pro přípravu roztoků byla použita DEI voda ($18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}$, Millipore, Francie).

Tělní tekutiny byly odebrány do 1 ml zkumavek Eppendorf a zamrazeny na -80°C . Po rozmrazení byly tělní tekutiny protřepány po dobu 2 min (Vortex Genie 2, Scientific Instrument, USA) a žaludeční šťávy byly navíc filtrovány pomocí centrifugační vialky vybavené $0,45 \mu\text{m}$ PVDF filtrem (Merk Millipore, Irsko). K analýze bylo použito vždy $20 \mu\text{l}$ tělní tekutiny, ke kterým bylo přidáno $60 \mu\text{l}$ acetonitrilu s rozpuštěným 2 mM KSCN jako interním standardem. Tato směs byla protřepána v $0,2 \text{ ml}$ mikrozkuhavce Eppendorf po dobu 3 min a následně centrifugována po dobu 2 min při zrychlení 4000 g (MiniSpin Plus, Eppendorf, Německo). $50 \mu\text{l}$ získaného supernatantu bylo přeneseno do plastové vialky s integrovaným insertem a vloženo do karuselu elektroforetického přístroje. Přidavek acetonitrilu slouží k účinnému odstranění proteinů z tělní tekutiny a zároveň potlačuje elektrickou vodivost klinických vzorků¹⁸.

Fyziologické experimenty byly prováděny na prasatech, kterým je na počátku experimentu aplikována jednorázová dávka bromidů v množství 50 mg kg^{-1} intravenózně. Následně byly prasatům odebírány vzorky krve, moče a žaludeční šťávy po dobu 28 h. Krev byla odebírána do nádobek s antikoagulantem EDTA a zpracována na krevní plazmu. Všechny tyto experimenty byly prováděny na Klinice anesteziologie a resuscitace 3. lékařské fakulty Univerzity Karlovy a byly schváleny Odbornou komisí pro zajišťování dobrých životních podmínek pokusných zvířat (3. lékařská fakulta).

Výsledky a diskuse

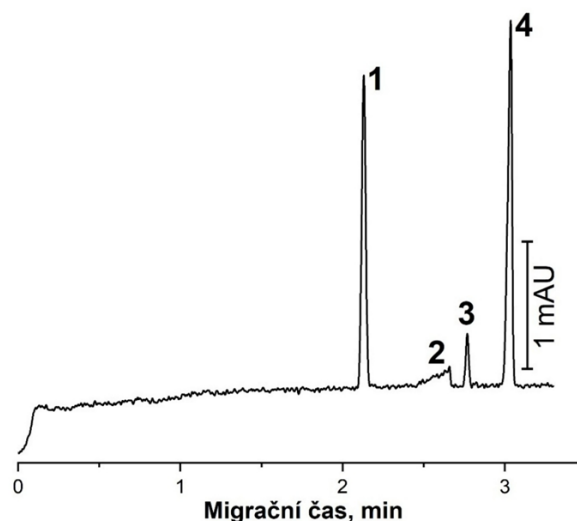
Elektroforetická separace

CZE separace bromidů byla prováděna v 90 mM boraxu s přidavkem 10 mM NaCl (pH 9,2) v negativním elektroforetickém módu a poháněna napětím -15 kV. Za těchto podmínek protéká kapilárou katodický elektroosmotický tok (EOF) a bromidy jako anionty migrují v opačném směru. Vzhledem k tomu, že mobilita bromidů je v absolutní hodnotě větší než mobilita EOF, tak se bromidy pohybují v kapiláře směrem k detektoru a jejich pozorovaná mobilita je rozdílem elektroforetické mobility bromidů a mobility EOF (mobilita EOF je změřena experimentálně na základě migrační-

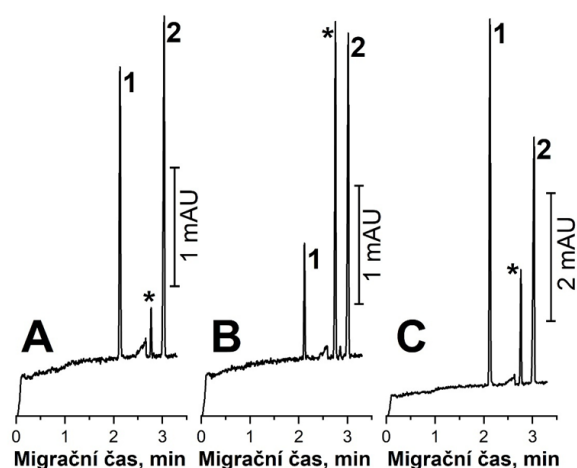
ho času zóny elektroneutrální látky v pozitivním separačním módu a má hodnotu $28,7 \pm 0,1 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$, zatímco tabulková hodnota limitní mobility bromidů je $-81,0 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$). Separace prováděná v protisměrném režimu přispívá k oddělení bromidů od ostatních složek vzorku, neboť bromidy jsou vystaveny delší dobu působení separačního elektrického pole.

Další předností protisměrného EOF je vytlačení matrice vzorku ven z počátku separační kapiláry do vstupní vialky se základním elektrolytem, čímž se z kapiláry odstraní nežádoucí acetonitril, který by jako organické rozpouštědlo způsoboval fluktuaace elektrického proudu a mohl vést až k přerušování separace¹⁹. Dalším důležitým faktorem je přidavek NaCl do základního elektrolytu. Tělní tekutiny se vyznačují vysokým zastoupením NaCl a při separaci aniontů bude vysoká koncentrace majoritních chloridů ve vzorku narušovat oddělení minoritně zastoupených bromidů, které vykazují podobnou hodnotu elektroforetické mobility jako chloridy. Přidavek chloridů do základního elektrolytu odstíní chloridy přítomné ve vzorku, které se zobrazují na elektroferogramu jako malý potlačený pík (obr. 1). Naopak bromidy poskytují ostrý pík, který je oddělen od ostatních složek tělních tekutin až na základní linii detektoru.

Podstatnou součástí analýzy klinických vzorků je jejich úprava pro CE analýzu. V původním návrhu bylo použito pouhé desetinásobné zředění krevní plazmy přidavkem DEI vody, které se v praxi ukázalo jako nevyhovující¹⁶. Proteiny přítomné ve vzorku způsobovaly nestabilitu migračního času bromidů s hodnotou RSD větší než 10% . Z tohoto důvodu se přistoupilo na deproteinizaci



Obr. 1. Elektroferogram krevní plazmy prasete odebrané 4 h po aplikaci dávky bromidů 50 mg kg^{-1} intravenózně. Identifikace píků: 1 – bromidy, 2 – chloridy, 3 – neidentifikovaná látka, 4 – thiokyanidy jako interní standard. Experimentální podmínky: základní elektrolyt 90 mM borax + 10 mM NaCl (pH 9,2), separační napětí/proud $-15 \text{ kV}/40 \mu\text{A}$, hydrodynamické dávkování vzorku tlakem 50 mbar po dobu 5 s



Obr. 2. Elektroferogram krevní plazmy (A), moče (B) a žaludeční šťávy (C) prasete v čase 4 h po aplikaci dávky NaBr 50 mg kg⁻¹ váhy prasete. Identifikace pík: 1 – bromidy, 2 – thiokyanidy, * – neidentifikovaná látka. Experimentální podmínky stejně jako u obr. 1

klinických tekutin přidavkem acetonitrilu v poměru 1:3 v/v, což se ukazuje jako dostatečná eliminace vlivu matrice u všech klinických vzorků. Společná hodnota RSD pro migrační čas v krevní plazmě, moči a žaludeční šťávě je rovna 0,1 % (obr. 2). Uvedená úprava vzorku navíc umožňuje reprodukovatelně zpracovávat pouhých 20 μ l tělní tekutiny, což splňuje požadavky mikroanalytického postupu analýzy a nezpůsobuje nadměrné dopady na životní prostředí²⁰.

Tabulka I

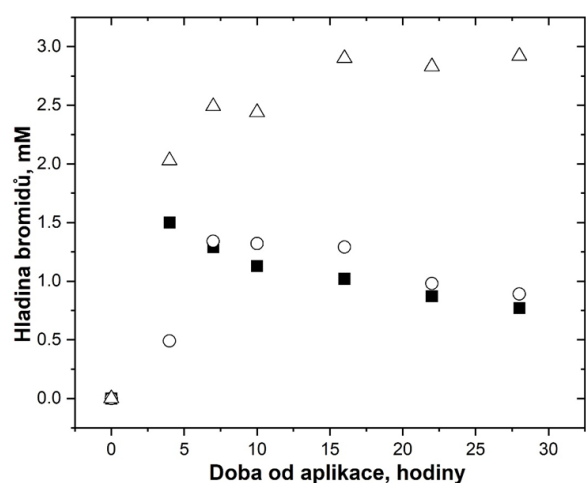
Parametry lineárních kalibračních závislostí plochy a výšky píku na koncentraci bromidů v krevní plazmě, moči a žaludeční šťávě prasete, LOD, LOQ a separační účinnost

Parametr	Plazma	Moč	Žaludeční šťáva
Koncentrační rozsah, mM	0,2 – 5,0	0,2 – 5,0	0,2 – 5,0
Směrnice – plocha \pm SD, mAU·s/mM	3,05 \pm 0,06	3,19 \pm 0,03	2,96 \pm 0,02
Úsek – plocha \pm SD, mAU·s	0,25 \pm 0,08	0,09 \pm 0,04	0,34 \pm 0,03
R^2	0,9990	0,9997	0,9999
Směrnice – výška \pm SD, mAU/mM	1,76 \pm 0,01	1,87 \pm 0,02	1,90 \pm 0,01
Úsek – výška \pm SD, mAU	0,11 \pm 0,01	0,05 \pm 0,02	0,21 \pm 0,02
R^2	0,9999	0,9997	0,9999
LOD, μ M	51	48	47
LOQ, μ M	171	161	157
t , min \pm SD	2,13 \pm 0,00	2,12 \pm 0,00	2,12 \pm 0,00
N , m ⁻¹ \pm SD	124300 \pm 7700	132800 \pm 9500	162100 \pm 5700
RSD – čas, %	0,06	0,10	0,06
RSD – plocha píku, %	1,9	2,1	2,5

Kalibrační závislosti, meze detekce a separační účinnost

Kalibrace metody byla provedena standardním přidavkem NaBr v koncentračním rozmezí 0,2–5 mM na pěti koncentračních hladinách ke slepým vzorkům jednotlivých tělních tekutin. Slepé vzorky byly odebrány před intravenózní aplikací bromidů laboratornímu zvířeti. Následně byly kalibrační vzorky zpracovány přidáním 60 μ l acetonitrilu s obsahem 2 mM KSCN stejně jako vzorky z dynamického monitorování. Kvantifikace bromidů byla provedena z lineární závislosti plochy píku na koncentraci. Změřené plochy píků byly korigovány na migrační čas a na plochu píku interního standardu. Meze detekce (LOD) a meze stanovitelnosti (LOQ) byly určeny jako trojnásobek, resp. desetinásobek šumu základní linie detektoru dělené směrnici kalibrační závislosti výšky píku na koncentraci. Separační účinnost byla vypočtena jako počet teoretických pater dle vzorce $N = 5,54 (t/w_{1/2})^2 \cdot 1/L_{\text{eff}}$, kde t je migrační čas, $w_{1/2}$ šířka píku v polovině výšky a L_{eff} je efektivní délka separační kapiláry. Separační účinnosti byly určeny pro kalibrační vzorek tělní tekutiny o koncentraci 0,5 mM. Parametry kalibračních závislostí jsou shrnuty v tabulce I.

Všechny získané kalibrační závislosti v koncentračním rozsahu 0,2 až 5,0 mM byly lineární s koeficientem determinace $R^2 \geq 0,999$. LOD se pohybuje na úrovni 50 μ M pro neupravenou tělní tekutinu, což je dostatečně nízká hodnota pro monitorování bromidů ve všech typech sledovaných tělních tekutin. Poměrně vysoké hodnoty LOD jsou zapříčiněny nízkou absorpcí bromidů v UV oblasti spektra a také nízkým dávkováním vzorku do separační kapiláry, kdy nebylo použito elektroforetické zaostrění vzorku. RSD pro migrační čas byly excelentní na



Obr. 3. Monitorování hladiny bromidů v krevní plazmě (■), moči (○) a žaludeční šťávě (△) prasete po aplikaci dávky 50 mg kg⁻¹ intravenózně

úrovni 0,1 %, na čemž se podílí stabilní EOF v bazické oblasti pH základního elektrolytu. RSD pro plochu píku na úrovni kolem 2 % představují běžně dosahované hodnoty charakteristické pro CZE separace prováděné na komerčních přístrojích.

Dynamika bromidů v tělních tekutinách prasete

Vyvinutá CE metoda byla aplikována pro monitorování hladin bromidů ve třech tělních tekutinách prasete. Experimentálnímu zvířeti byla na počátku experimentu intravenózně aplikována dávka NaBr 50 mg na 1 kg váhy prasete a poté byly odebrány tělesné tekutiny s časech 0, 4, 7, 10, 16, 22 a 28 hodin (obr. 3). Hladina bromidů v krevní plazmě byla nejvyšší v čase 4 h po aplikaci, mezi 10 až 16 h dosáhla stabilního rovnovážného stavu a poté pozvolna klesala. Hladiny bromidů v moči narůstaly pomaleji a v čase 7 h dosáhly úrovně nalezené v krevní plazmě. Zajímavým zjištěním je vysoká koncentrace bromidů v žaludeční šťávě, která představuje významnou cestu jejich vylučování z organismu. Rovnovážná hladina bromidů v plazmě se po korekci na ztráty bromidů močí a žaludeční šťávou použila pro výpočet extracelulárního prostoru.

Závěr

Kapilární elektroforéza byla poprvé použita pro stanovení bromidů v krevní plazmě, moči a žaludeční šťávě prasete pro účely anesteziologie a resuscitace. CZE stanovení je provedeno z pouhých 20 μl tělesné tekutiny, která byla upravena přidávkem 60 μl acetonitrilu. Další před-

ností CZE je krátká doba analýzy, vysoká stabilita migračního času a aplikace jedné metodiky na několik odlišných klinických vzorků. CZE tak představuje vhodný nástroj pro klinickou analýzu, která je prováděna na rozsáhlých souborech vzorků za účelem monitorování farmakokinetiky.

Autor děkuje za finanční podporu GAČR, grant 22-22398S.

LITERATURA

- McCall A. S., Cummings C. F., Bhavé G., Vanacore R., Page-McCaw A., Hudson B. G.: *Cell* 157, 1380 (2014).
- Mayeno A. N., Curran A. J., Roberts R. L., Foote C. S.: *J. Biol. Chem.* 264, 5660 (1989).
- Olszowy H. A., Rossiter J., Hegarty J., Geoghegan P., Haswell-Elkins M.: *J. Anal. Toxicol.* 22, 225 (1998).
- López-Muñoz F., Shen W. W., D'Ocon P., Romero A., Alamo C.: *Int. J. Mol. Sci.* 19, 2143 (2018).
- Coelho-Silva J., Faria J., Dinis-Oliveira R. J.: *Toxicol. Mech. Methods* 35, 943 (2025).
- Thornton C. S., Haws J. T.: *J. Gen. Intern. Med.* 35, 2459 (2020).
- Forbes G. B., v knize: *Human Body Composition: Growth, Aging, Nutrition, and Activity* (Forbes G. B., ed.), str. 5–17. Springer, New York 1987.
- Levy L. D., Durie P. R., Pencharz P. B., Corey M. L.: *J. Pediatr.* 107, 225 (1985).
- Baarends E. M., Schols A., Lichtenbelt W., Wouters E. F. M.: *Am. J. Clin. Nutr.* 65, 88 (1997).
- Kim J., Wang Z. M., Gallagher D., Kotler D. P., Ma K. Z., Heymsfield S. B.: *J. Parenter. Enteral Nutr.* 23, 61 (1999).
- Miller M. E., Cosgriff J. M., Forbes G. B.: *Am. J. Clin. Nutr.* 50, 168 (1989).
- Holzbecher J., Ryan D. E.: *Clin. Biochem.* 13, 277 (1980).
- Tůma P.: *Anal. Chim. Acta* 1225, 1 (2022).
- Masár M., Hradski J., Szucs R.: *Talanta* 293, 128113 (2025).
- Tůma P., Samcová E., Štulík K.: *Electroanalysis* 23, 1870 (2011).
- Pascali J. P., Trettene M., Bortolotti F., de Paoli G., Gottardo R., Tagliaro F.: *J. Chromatogr. B* 839, 2 (2006).
- Pascali J. P., Liotta E., Gottardo R., Bortolotti F., Tagliaro F.: *J. Chromatogr. A* 1216, 3349 (2009).
- Tůma P., Bursová M., Sommerová B., Horsley R., Čabala R., Hložek T.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* 160, 368 (2018).
- Tůma P., Hložek T., Sommerová B., Koval D.: *Talanta* 221, 121626 (2021).
- Kaljurand M., Mazina-Sinkar J.: *TrAC-Trends Anal. Chem.* 157, 116811 (2022).

P. Tůma (*Charles University, Third Faculty of Medicine, Prague, Czech Republic*): **Electrophoretic Determination of Bromides in Body Fluids**

Capillary electrophoresis with UV detection is used to monitor bromides in blood plasma, urine, and gastric juice of pigs as laboratory organisms. For analysis, 20 μL of body fluid is used, which is treated by 60 μL of acetonitrile with 2 mM KSCN as an internal standard. Separation is performed in 90 mM sodium tetraborate with the addition of 10 mM NaCl at pH 9.2. Under these experimental conditions, the migration time of bromides is 2.1 min, the limit of detection ranges from 48 to 51 μM , and the limit of quantification from 148 to 171 μM for individual body fluids. The relative standard deviation values for migration time are less than 0.1 % and for peak area in the range of 1.9–2.5 %. The developed methodology is used for time monitoring of bromides in clinical samples after intravenous administration of NaBr to a laboratory animal at a dose of 50 mg kg^{-1} and applied for research in the field of anaesthesiology and resuscitation.

Keywords: bromides, extracellular space, capillary electrophoresis, clinical samples

Acknowledgement

This research was supported by Grant Agency of Czech Republic (project 22-22398S).



Užití tohoto díla se řídí mezinárodní licencí Creative Commons Attribution License 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/legalcode.cs>), která umožňuje neomezené využití, distribuci a kopírování díla pomocí jakéhokoliv média, za podmínky řádného uvedení názvu díla, autorů, zdroje a licence.