

THE RISK ASSOCIATED WITH APPLYING 2-BUTANOL AS AN INTERNAL STANDARD DURING HEADSPACE ANALYSIS OF BLOOD SAMPLES FOR TOXICOLOGICAL PURPOSES

Grzegorz BUSZEWICZ, Grzegorz TERESIŃSKI, Roman MAĐRO

Chair and Department of Forensic Medicine, Medical Academy, Lublin

ABSTRACT: The presence of large peaks of 2-butanone – higher than the peak of the internal standard – was ascertained by gas chromatography during toxicological analysis of blood samples collected during *post-mortem* examination of the body of a person who had most probably died as a result of metabolic disturbances caused by overuse of alcohol. The determined ketone, however, was of endogenous origin, since it was shown to have been formed in the headspace injector during incubation of the vial of blood with addition of 2-butanol as an internal standard.

KEY WORDS: Blood headspace analysis; Internal standard; 2-butanol; 2-butanone; Lesion of liver parenchyma.

Problems of Forensic Sciences, vol. LVIII, 2004, 70–78

Received 21 June 2004; accepted 24 November 2004

INTRODUCTION

Headspace analysis with the use of an internal standard [10] is a routine technique of quantitative determination of volatile toxic compounds in biological material. An advantage of this calibration method is the possibility of determining the studied analyte without precise definition of the volume (or mass) of an injected sample [11] and also the fact that the analysed sample and standard are injected onto the chromatograph during the same injection – therefore, their analysis is performed under the same conditions¹. A disadvantage of the use of an internal standard is that the added compound must be well separated from the analysed compound, which was difficult to achieve on “packed” columns (with the exception of columns with modern fillings such as Carbopack²). Furthermore, the internal standard must not react with other components of the analysed biological material or

¹ However, maintenance of the same conditions of chromatography in sequential injections during analysis with use of an external standard does not mean that conditions of chromatographic separation and detection are the same.

² Application of capillary columns allowed broad application of this calibration method.

influence physical properties of the analysed compound (e.g. its solubility or volatility), and its volatility should be similar to the volatility of components of the analysed sample. In accordance with these principles, headspace analysis of blood samples for ethanol is performed with use of an internal standard, such as:

- 1-propanol [7, 15, 16];
- 2-propanol [12];
- 2-butanol [4, 18];
- t-butanol [5, 10];
- acetonitrile [9, 17];
- water [3].

Out of the mentioned internal standards, use of 2-propanol was the first to be questioned, as it is an endogenous product of decay processes [10] or a product of reactions of exogenous acetone [1]. It turned out that blood decay also leads to formation of 1-propanol and 1-butanol [6], which excluded their usefulness for forensic toxicological analysis.

9559 determinations of ethanol and 142 analyses of other volatile toxic compounds in blood samples collected from corpses were carried out using the headspace technique with 2-butanol as the internal standard from 1996 to 2033 at the Department of Forensic Medicine, Medical Academy, Lublin, Poland. For, until now, it seemed that it fulfilled all earlier mentioned conditions of a good and completely safe internal standard, as it was well separated from ethanol and other endogenous compounds such as acetone and 2-propanol on practically all capillary columns. Moreover, it gave a strong signal on an FID detector and symmetric chromatographic peaks with relatively small “tails” and, furthermore, was suitable for analysis of other alcohols³. After 8 years and performance of about 10 thousand analyses, one case was encountered which led to a re-examination of this view.

A CASE DESCRIPTION AND RESULTS OF *POST-MORTEM* EXAMINATION

In August 2003 at the Department of Forensic Medicine, Medical Academy, Lublin, Poland, the body of a 40-year-old man was examined *post-mortem*. The man – according to the prosecutor’s findings – was an alcoholic and had been on a one-month non-stop drinking binge. Several days before death he had stopped drinking alcohol because of a stomach ache and diarrhoea. He had a body temperature of 39°C and began to experience “kidney ache” on the day of death. He was admitted to hospital where he got convulsions, lost consciousness and shortly afterwards, his circulation suddenly ceased.

³ Of lower and also higher molecular mass.

Intravital research showed metabolic acidosis and 7.5 mg/dl of methanol in his blood. However, ethylene glycol was not determined.

A *post-mortem* examination was performed on the third day after death. Only slight fibroma of the heart muscle and fatty degeneration of the liver and brain oedema were observed macroscopically.

Blood, vitreous body and urine were collected for examination. Headspace⁴ chromatographic analysis of these samples was immediately carried out. 0.2 ml of collected material was put into a headspace vial of 10 ml capacity and 0.2 ml 2-butanone solution was added. The vial was closed and next it was incubated for 6 minutes at 60°C. A trace peak of methanol and a very large peak (much higher than the peak of the internal standard) of a substance later identified as 2-butanone (methyl-ethyl ketone) were determined on chromatograms of blood samples. This ketone was not determined in the same sample analysed without addition of 2-butanone (Figure 1A, magnification 500 ×). 2-butanone was not determined during analysis of vitreous body and urine with addition of 2-butanone as an internal standard (Figures 1B and C). It was also not determined in 2 other blood samples analysed in the same way in the same analytical series (Figures 1D₁ and D₂).

DISCUSSION OF THE CASE AND RESULTS OF *POST-MORTEM* EXAMINATIONS

Blood analysis of this man was repeated several times in other analytical series and conversion of 2-butanone to 2-butanone was unequivocally ascertained. At the same time, analyses of samples of other blood were performed without any disturbances. Thus, the possibility that the ketone was formed in the flask with a solution of 2-butanone before its addition to blood samples was excluded. Moreover, it was shown that it only occurred in a blood sample collected from the deceased after adding of an internal standard.

Blood collected from the corpse did not differ in appearance and consistency from other *post-mortem* blood samples. Therefore, the possible action of a chemical oxidation factor on 2-butanone was excluded, as such a compound would undoubtedly cause a change in colour of blood as the result of unavoidable denaturation of proteins in these conditions. The hypothesis that was accepted as most likely was that alcohol dehydrogenase, which is capable of oxidising 2-butanone, was present in the blood of the dead man. Alcohol dehydrogenase is mainly localised in the liver [8, 13] and occurs in blood only when the liver is seriously damaged [2]. The fact that ADH activ-

⁴ Analysis was performed using a wide-bore Restek BAC-1 column (30 meters length, 0.5 mm internal diameter) on a FISON 8160 gas chromatograph with an FID detector and an HS-800 autosampler.

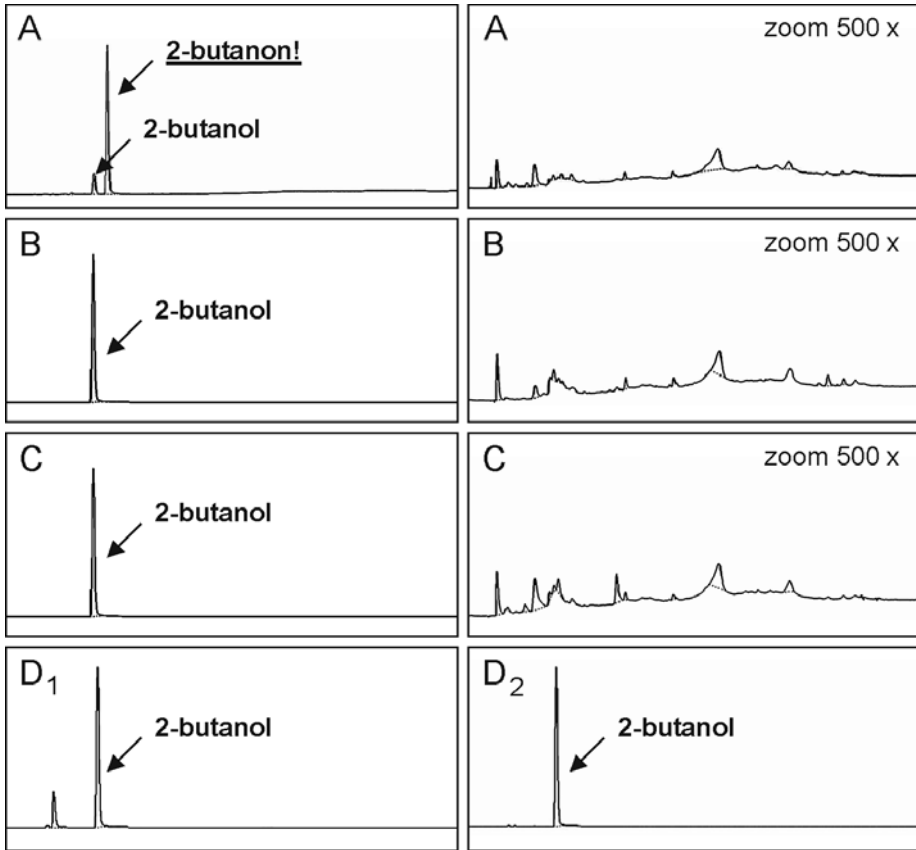


Fig. 1. Chromatograms of headspace of *post-mortem* samples (taking into consideration of magnification 500 × and without addition of an internal standard): A – blood; B – vitreous body; C – urine; D1, D2 – control blood samples.

ity was not observed in this case in urine and vitreous body (in these materials, 2-butanol was not oxidised) does not constitute an obstacle to accepting this conception as true, due to the fact that “released” enzymatic protein (molecular mass – approx. 80 000) from damaged hepatocytes did not penetrate beyond the non-damaged blood stream. This hypothesis was confirmed by an interview (information about alcoholism), the occurrence of very high body temperature just before death and the fast deterioration of the state of health of the man.

CONCLUSIONS

The analysed case showed that 2-butanol does not fulfil the fundamental requirement of a “good” internal standard in cases of lesion of liver parenchyma, i.e. there is a real risk that the 2-butanol could react with the analysed biological material. Therefore, it was decided that tert-butanol⁵ should be used instead of 2-butanol for determination of ethanol and other volatile compounds, as it was shown that this second-order alcohol is immune to ADH activity.

References:

1. Buszewicz G., Mądro R., Stability of toluene and reduction of acetone to 2-propanol in homogenates of the human liver, brain and lungs, *Forensic Science International* 2004, vol. 141, pp. 63–68.
2. Chrostek L., Szmitkowski M., Serum activities of classes I and II alcohol dehydrogenases in toxic liver damage, *Clinica Chimica Acta* 1998, vol. 271, pp. 163–269.
3. Colehour J. K., Water as an internal standard in determination of blood ethanol by gas chromatography, *Analytical Chemistry* 1967, vol. 39, pp. 1190–1192.
4. De Martinis B. S., Martin C. C., Automated headspace solid-phase microextraction and capillary gas chromatography analysis of ethanol in post-mortem specimens, *Forensic Science International* 2002, vol. 128, pp. 115–119.
5. Hollingworth T. A., Throm H. R., Wekell M. M. [et al.], Headspace gas chromatographic method for determination of ethanol in canned salmon: corollary study, *Journal of the Association of Official Analytical Chemistry* 1986, vol. 69, pp. 524–526.
6. Iffland R., Balling P., Oehmichen M. [et al.], Methanol, isopropanol, n-propanol – endogen formation by influence of ethanol?, *Blutalkohol* 1989, vol. 26, pp. 87–97.
7. Jones A. W., Fransson M., Blood analysis by headspace gas chromatography: does a deficient sample volume distort ethanol concentration?, *Medicine, Science and the Law* 2003, vol. 43, pp. 241–247.
8. Lands W. A., Review of alcohol clearance in humans, *Alcohol* 1998, vol. 15, pp. 147–160.
9. Lee X. P., Kumazawa T., Kondo K. [et al.], Analysis of methanol of formic acid in body fluids by headspace solid-phase microextraction and capillary gas chromatography, *Journal of Chromatography. Biomedical Applications* 1999, vol. 734, pp. 155–162.

⁵ However, a procedure with application of 2-butanol which was used before (consisting in simultaneously carrying out a standard analysis and a qualitative analysis without using an internal standard) also effectively eliminated the risk of a false interpretation of a chromatogram in the case of an incidental occurrence of this type of situation.

10. Machata G., The advantages of automated blood alcohol determination by head space analysis, *Zeitschrift für Rechtsmedizin / Journal of Legal Medicine* 1975, vol. 75, pp. 229–234.
11. Novak J., Quantitative analysis by gas chromatography, Marcel Dekker Inc., New York 1975.
12. Pintaric I. K., Determination of ethanol in chocolate shell pralines and filled chocolates by capillary gas chromatography, *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju* 1999, vol. 50, pp. 23–30.
13. Ramchandani V. A., Bosron W. F., Li T. K., Research advances in ethanol metabolism, *Pathologie et Biologie* 2001, vol. 49, pp. 676–682.
14. Reid P. E., Brooks D. E., Pang Y. C. [et al.], Routine direct injection gas–liquid chromatographic procedure for the analysis of volatile halogenated anaesthetics in whole blood using a new external injection port, *Journal of Chromatography A* 1978, vol. 146, pp. 297–310.
15. Steenaart N. A., Clarke D. W., Brien J. F., Gas-liquid chromatographic analysis of ethanol and acetaldehyde in blood with minimal artifactual acetaldehyde formation, *Journal of Pharmacological Methods* 1985, vol. 14, pp. 199–212.
16. Wasfi I. A., Al-Awadhi A. H., Al-Hatali Z. N. [et al.], *Journal of Chromatography B. Biomedical Sciences and Applications* 2004, vol. 799, pp. 331–336.
17. Zilly M., Langmann P., Lenker U. [et al.], *Journal of Chromatography B. Biomedical Sciences and Applications* 2003, vol. 798, pp. 179–186.
18. Zuba D., Parczewski A., Reichenbacher M., Optimization of solid-phase microextraction conditions for gas chromatographic determination of ethanol and other volatile compounds in blood. *Journal of Chromatography B. Biomedical Sciences and Applications* 2002, vol. 773, pp. 75–82.

RYZIKO UŻYCIA 2-BUTANOLU JAKO STANDARDU WENĘTRZNEGO PODCZAS ANALIZY TOKSYKOLOGICZNEJ HEADSPACE PRÓBEK KRWI

Grzegorz BUSZEWICZ, Grzegorz TERESIŃSKI, Roman MADRO

WSTĘP

Rutynową techniką ilościowego oznaczania lotnych substancji toksycznych w materiale biologicznym jest analiza *headspace* z użyciem standardu wewnętrznego [10]. Zaletą tego sposobu kalibracji jest możliwość oznaczenia poszukiwanego składnika bez dokładnego określenia objętości (lub masy) nastrzykniętej próbki [11] oraz to, że badaną substancję i standard wprowadza się do chromatografu podczas tej samej iniekcji, dzięki czemu ich analiza przebiega w tych samych warunkach¹. Niedogodnością użycia standardu wewnętrznego jest natomiast to, że substancja dodawana do badanej próbki musi zostać dobrze oddzielona od substancji oznaczanej, co było trudne do uzyskania na kolumnach „pakowanych” (za wyjątkiem kolumn z nowoczesnymi wypełnieniami typu Carbo-pack²). Standard wewnętrzny nie może ponadto wchodzić w reakcje ze składnikami analizowanego materiału biologicznego oraz wpływać na fizyczne właściwości badanej substancji (np. jej rozpuszczalności lub lotności), a jego lotność powinna być zbliżona do lotności składników badanej próbki. Zgodnie z tymi zasadami analizy *headspace* próbek krwi w kierunku zawartości etanolu przeprowadza się z wykorzystaniem jako standardu wewnętrznego m.in.:

- 1-propanolu [7, 15, 16];
- 2-propanolu [12];
- 2-butanolu [4, 18];
- t-butanolu [5, 10];
- acetonitrylu [9, 17];
- wody [3].

Z wymienionych standardów wewnętrznych najwcześniej kwestionowano użycie 2-propanolu, gdyż powstaje on endogennie w trakcie procesów gnicia [10] lub z egzogenego acetonu [1]. Okazało się, że gnicie krwi prowadzi również do pojawienia się 1-propanolu i 1-butanolu [6], co wykluczyło ich przydatność do sądowo-lekarskiej analityki toksykologicznej.

W Katedrze i Zakładzie Medycyny Sądowej w Lublinie od roku 1996 do roku 2003 wykonano metodą *headspace* 9559 oznaczeń etanolu oraz 142 analiz w kierunku obecności innych lotnych substancji toksycznych we krwi pobranej ze zwłok, przy czym używano 2-butanolu. Wydawało się bowiem dotąd, że spełnia on wszystkie wy-

¹ Natomiast utrzymanie tych samych parametrów pracy chromatografu w kolejnych „nastrzykach” analizy z użyciem standardu zewnętrznego nie oznacza, że warunki rozdzielania chromatograficznego oraz detekcji są identyczne.

² Dopiero użycie kolumn kapilarnych umożliwiło szerokie zastosowanie tego sposobu kalibracji.

mienione wcześniej warunki dobrego i w pełni bezpiecznego standardu wewnętrznego, gdyż praktycznie na każdym rodzaju kolumny kapilarnej doskonale był separowany od etanolu oraz takich substancji endogennych jak aceton, ewentualnie 2-propanol, oraz dawał silny sygnał detektora FID i symetryczne piki chromatograficzne o stosunkowo małych „ogonach”, a ponadto nadawał się także do oznaczania innych alkoholi³. Po 8 latach i wykonaniu ok. 10 tysięcy analiz spotkano się jednak z przypadkiem, który doprowadził do zweryfikowania tego poglądu.

OPIS PRZYPADKU I WYNIKI BADAŃ POŚMIERTNYCH

W sierpniu 2003 roku w Katedrze i Zakładzie Medycyny Sądowej w Lublinie wykonano sekcję zwłok 40-letniego mężczyzny, który według ustaleń prokuratury pił nałogowo i od około miesiąca znajdował się w „ciągu” alkoholowym. Kilka dni przed śmiercią „ciąg” ten jednak przerwał ze względu na ból brzucha oraz biegunkę, zaś w dniu zgonu temperatura jego ciała wzrosła do 39°C i zaczął odczuwać „ból nerek”. Umieszczony został więc w szpitalu, gdzie dostał napadu drgawek, stracił przytomność i wkrótce doszło do nagłego zatrzymania krążenia. Badania zażyciowe wykazały kwasicę metaboliczną i metanol we krwi w stężeniu 7,5 mg/dl. Nie stwierdzono natomiast glikolu etylenowego.

Ogledziny i sekcję zwłok przeprowadzono w trzeciej dobie po śmierci i makroskopowo stwierdzono jedynie niewielkie włóknienie mięśnia sercowego oraz stłuszczenie wątroby i obrzęk mózgu.

Do badań zabezpieczono krew, ciało szkliste i mocz. Bezpośrednio po tej czynności wykonano analizę chromatograficzną *headspace* pobranego materiału. Do fiolek *headspace* o pojemności 10 ml odmierzone po 0,2 ml materiału, dodano po 0,2 ml roztworu 2-butanolu, zamknięto je, a następnie poddano inkubacji przez 6 minut w temperaturze 60°C. W chromatogramach próbki krwi stwierdzono śladowy pik metanolu oraz bardzo duży (większy od piku standardu wewnętrznego) pik substancji, którą zidentyfikowano później jako 2-butanon (metyl-etyl keton). W próbce tej samej krwi analizowanej bez dodatku 2-butanolu nie stwierdzono natomiast tego ketonu (rycina 1A, powiększenie 500 ×). Analizy próbek ciała szklistego oraz moczu z użyciem 2-butanolu jako standardu wewnętrznego (rycina 1B i C) 2-butanonu nie wykazały. Nie stwierdzono go także w 2 innych próbkach krwi analizowanych w taki sam sposób w trakcie tej samej serii analitycznej (ryciny 1D₁ i D₂).

OMÓWIENIE PRZYPADKU ORAZ WYNIKÓW BADAŃ POŚMIERTNYCH

Analizę krwi tego mężczyzny powtórzono kilkakrotnie w innych seriach analitycznych i jednoznacznie stwierdzono konwersję 2-butanolu do 2-butanonu; jednocześnie badania próbek innej krwi przebiegały bez żadnych zaburzeń. Wykluczono zatem możliwość powstania ketonu w kolbie z roztworem 2-butanolu przed dodaniem go do próbek krwi oraz wykazano, iż pojawił się on jedynie w próbce krwi pobranej od denata po dodaniu do niej standardu wewnętrznego.

³ Zarówno o mniejszej, jak i większej masie cząsteczkowej.

Krew pobrana ze zwłok mężczyzny nie różniła się wyglądem i konsystencją od innych krwi sekcyjnych. Pominięto zatem ewentualne działanie chemicznego czynnika utleniającego 2-butanol, gdyż taki związek⁴ niewątpliwie spowodowałaby zmianę barwy krwi w efekcie nieuniknionej w tych warunkach denaturacji białek. Za najbardziej prawdopodobną przyjęto zatem hipotezę, że we krwi pobranej od zmarłego mężczyzny znajdowała się zdolna do utleniania 2-butanolu dehydrogenaza alkoholowa, która zlokalizowana jest przede wszystkim w wątrobie [8, 13] a we krwi występuje jedynie w przypadkach ciężkiego jej uszkodzenia [2]. Fakt, iż aktywności ADH nie obserwowano w tym przypadku w moczu oraz cieple szklistym oka (w tych materiałach 2-butanol nie uległ utlenieniu), nie stanowi bowiem przeszkody w uznaniu za prawdziwą tej koncepcji ze względu na to, że „uwolnione” z uszkodzonych hepatocytów białko enzymatyczne (o masie cząsteczkowej ok. 80 000) nie przenika poza nieuszkodzony krwiobieg. Hipotezę tę potwierdza natomiast wywiad (dane dotyczące alkoholizmu), wystąpienie bardzo wysokiej temperatury ciała pod koniec życia i szybkie pogorszenie się stanu zdrowia tego mężczyzny.

PODSUMOWANIE

Analizowany przypadek wykazał, że w przypadku uszkodzenia mięszu wątroby 2-butanol nie spełnia podstawowego warunku „dobrego” standardu wewnętrznego, tj. stwarza realne ryzyko wejścia w reakcję z badanym materiałem biologicznym. W związku z powyższym, w jego miejsce do oznaczania etanolu oraz substancji lotnych w próbkach krwi zdecydowano się używać tert-butanolu⁵, gdyż wykazano, że ten drugorzędowy alkohol jest „odporny” na działanie ADH.

⁴ Związek ten jest zdolny do utlenienia większości dodanego 2-butanolu w ciągu zaledwie ok. 6 minut ze względu na to, iż próbkę analizowano niezwłocznie po dodaniu standardu wewnętrznego.

⁵ Aczkolwiek stosowany wcześniej tok postępowania z użyciem 2-butanolu (polegający na „równoległym” wykonaniu – oprócz właściwych oznaczeń – także badań jakościowych bez zastosowania standardu wewnętrznego) eliminował skutecznie ryzyko błędnej interpretacji chromatogramu w przypadku incydentalnego wystąpienia tego rodzaju sytuacji.