



# CORTISOL, CORTISONE AND CORTICOSTERONE DETERMINATION IN BIOLOGICAL MATERIALS BY LIQUID CHROMATOGRAPHY MASS SPECTROMETRY

Krzysztof BAŃKA, Grzegorz BUSZEWICZ, Grzegorz TERESIŃSKI, Roman MAĐRO

*Chair and Department of Forensic Medicine, Medical University, Lublin, Poland*

## Abstract

A liquid chromatography mass spectrometry (LC-MS) assay was developed and optimised for the determination of cortisol, cortisone and corticosterone. In order to separate analytes from the biological matrix, the liquid-liquid extraction method was applied. *Post-mortem* blood was extracted with dichloromethane in alkaline medium (pH 6.5). The mass spectrometer (MS) was operated in atmospheric pressure chemical ionisation (APCI) mode. Quantitative analysis was carried out in the selected ion monitoring mode (SIM). Quantitative analysis was carried out on the basis of analytical signals obtained for positive pseudomolecular ions of the determined substances ( $m/z - 363$  for cortisol,  $m/z - 361$  for cortisone,  $m/z - 347$  for corticosterone) and dexamethasone ( $m/z - 393$ ), which was used as an internal standard. Method validation was performed and the limit of detection was 0.5 ng/ml for cortisol and cortisone, and for corticosterone it was 1.0 ng/ml. Linearity was obtained for all of the three mentioned glucocorticosteroids in the range from 1 to 500 ng/ml. We also determined precision and extraction yield. It was ascertained that the method both guarantees a high extraction yield and enables the determination of all of the three mentioned glucocorticosteroids in one analytical procedure. The method proved to be highly sensitive and precise, and to have a wide range of linearity of detection. It was also confirmed that it enables the determination of glucocorticosteroids in blood samples collected from a cadaver.

## Key words

Glucocorticosteroids; Validation methods; *Post-mortem* blood; LC-APCI-MS.

*Received 24 April 2008; accepted 30 April 2008*

## 1. Introduction

The category of sudden deaths where results of autopsy and subsequent histological and toxicological examinations do not allow ascertainment of the cause of death also encompasses cases where biochemical disorders have occurred [1, 3, 8, 16, 18], including those which are the subject of hormone regulation [6, 16]. These kinds of disorders take place, for example, in cases of being under the long-term influence of low temperature, when the system: hypothalamus – pituitary gland – adrenal gland is stimulated, and in this

way causes rapid – even after only 20 minutes [7, 9] – glucocorticosteroids secretion, which should trigger a considerable increase in their temporary concentration in blood. Cortisol should be particularly taken into account, as it makes up 95% of all glucocorticosteroids in physiological conditions. Its 24-hour production amounts to between 10 and 30 mg, and in physiological conditions the temporary concentration varies within the range of 20 to 250 ng/ml [11].

Currently, glucocorticosteroids are most frequently determined by immunoassay methods [12, 13, 15], which are characterised by high sensitivity and

short analysis time. However, their disadvantage is low specificity, significantly limiting the usability of these methods in forensic medical practice. The appropriately sensitive and specific (without derivatisation) LC-MS technique has only been applied previously to determination in serum taken from living persons [2, 10, 14]. Application of the GC-MS technique is complicated by the necessity of derivatisation, which is time consuming and, moreover, raises costs of analysis due to expensive reagents.

The aim of this work was to develop, optimise and validate an analytical procedure for the determination of selected adrenal gland cortex hormones: cortisol, cortisone and corticosterone in *post-mortem* blood samples by liquid chromatography coupled with mass spectrometry using atmospheric pressure chemical ionisation (LC-APCI-MS), and then to evaluate its usefulness in the analysis of selected sudden death cases.

## 2. Materials and instruments

The reagents used were: Methanol Chromasolv<sup>®</sup> LC-MS and acetonitrile Chromasolv<sup>®</sup> LC-MS (Riedel de Haen, Germany), dichloromethane (Sigma-Aldrich, Germany), formic acid (Merck, Germany), dexamethasone, cortisol and cortisone (Sigma-Aldrich, Germany), corticosterone and ammonium formate (Fluka, USA), albumin BSA (Sigma-Aldrich, Germany), natrium chloratum 0.9% (Fresenius Kabi, Poland) and also de-ionised water, obtained using the Milli-Q system (Millipore, USA). Blood samples were collected from ten bodies of persons who had died immediately after unexpected trauma, in which no significant pathological changes were ascertained.

The Surveyor liquid chromatography system by Thermo Finnigan equipped with a gradient pump and an autosampler, coupled with the LCQ Advantage Max (Finnigan, San Jose, CA, USA) ion trap mass spectrometer working in atmospheric pressure chemical positive ionisation mode was used. The liquid chromatography system and the mass spectrometer worked under the control of X'calibur software, which was also used for data management.

## 3. Method optimisation

The major optimisation criterion for the method was to gain the highest possible chromatographic peaks of cortisol, cortisone and corticosterone, which

was achieved by determination of the following factors:

- working parameters of the mass spectrometer, such as capillary voltage and temperature, flow of ionisation and make-up gases, the temperature of the evaporator and the corona current, which was determined using methanol solutions of internal standard, i.e. dexamethasone and the analytes: cortisol, cortisone and corticosterone;
- the extraction parameters, which were achieved by comparing (in terms of clarity and efficiency) glucocorticosteroids and dexamethasone extracts from 6% BSA solution in 0.9% NaCl, obtained using both dichloromethane and ethyl acetate (at pH 6.5 and pH 9.0);
- chromatographic conditions which enabled achievement of appropriate separation of internal standard and methanol standards – dexamethasone and analytes, i.e. glucocorticosteroids, in a single analytical process, using chromatographic columns: Purospher RP-C18, 125 × 3 mm (Merck) and Adsorbosphere HS-C18, 250 × 4.6 mm (Alltech). Several variants of a two-component mobile phase consisting of acetonitrile and water were tested.

## 4. Analytical procedure

### 4.1. Chromatographic procedure HPLC-APCI-MS

The best chromatographic separation was achieved using the Adsorbosphere HS C18, 250 × 4.6 mm I.D. 5 µm (Alltech) column, a two-component mobile phase consisting of water (A) and acetonitrile (B) and a flow of 0.5 ml/min. The gradient profile was as follows: 70% A and 30% B for 2 min, then for 28 min a linear change in proportions to 30% A and 70% B, next the content of B was further increased to reach 100% (the total time for B to increase from 30% to 100% was 43 minutes). The initial composition (70% A and 30% B) was then reconstituted within 6 min. Thus, the whole procedure took 49 min. The injection volume was 20 µl.

The optimal performance parameters for the mass spectrometer were: ion source temperature = 550°C; nitrogen as ionisation gas = 40 arb (arbitrary unit of LCQ instrument); nitrogen as make-up gas = 5 arb (arbitrary unit of LCQ instrument); capillary temperature = 220°C; corona current = 5 A; the mass spectra of determined compounds were within the range 100–400 m/z (Figures 1, 2, 3, 4).

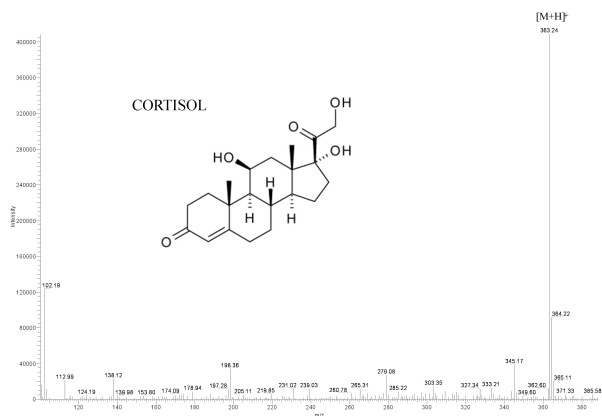


Fig. 1. Mass spectrum for cortisol (atmospheric pressure chemical ionisation).

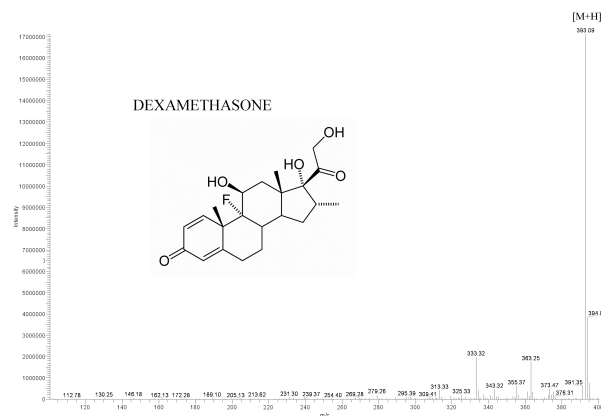


Fig. 4. Mass spectrum for dexamethasone (atmospheric pressure chemical ionisation).

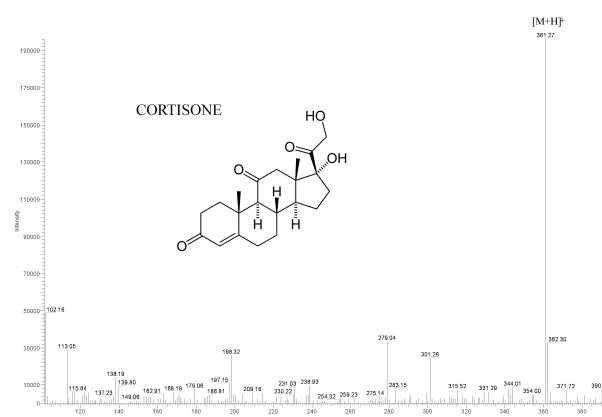


Fig. 2. Mass spectrum for cortisone (atmospheric pressure chemical ionisation).

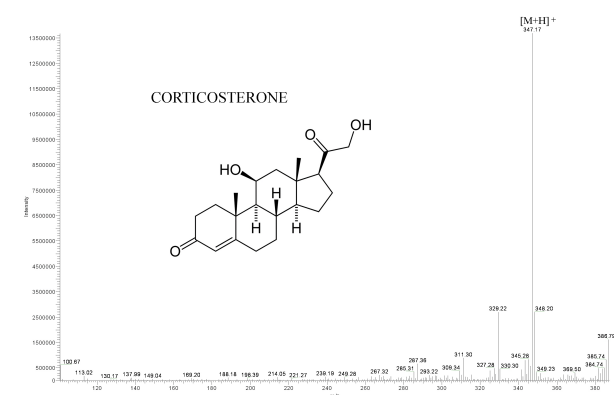


Fig. 3. Mass spectrum for corticosterone (atmospheric pressure chemical ionisation).

For quantitative analysis, selected ion monitoring (SIM) was used. The analytical signal originated from apparent molecular ions  $[M+H]^+$  and was recorded at  $m/z$  values: 363 for cortisol, 361 for cortisone, 247 for corticosterone and 393 for dexamethasone (Table I).

TABLE I. MASS AND CHROMATOGRAPHIC PARAMETERS OF ANALYTES

Analyte	Retention time [min]	Ion monitored [m/z]
Cortisol	16.61	363
Cortisone	17.04	361
Corticosterone	22.09	347
Dexamethasone	20.48	393

#### 4.2. Extraction

500  $\mu$ l of glucocorticosteroids standard solution (in 6% BSA in 0.9% NaCl) or 500  $\mu$ l of blood was diluted with 0.5 ml of ammonia buffer solution and spiked with 25  $\mu$ l of internal standard – dexamethasone in methanol (10  $\mu$ g/ml). The extraction (by agitating with 5 ml of dichloromethane) lasted 15 minutes. Then samples were centrifuged at 3000 rpm for 10 min, the supernatant was transferred into 2 ml Eppendorf vials and evaporated to dryness under a stream of nitrogen at 45°C. The dry residue was dissolved in 30  $\mu$ l of methanol prior to analysis.

#### 5. Method validation

The detection linearity was determined for each glucocorticosteroid separately based on 9 calibration points repeated two times within the range of 1–500 ng/ml for cortisol and cortisone and 2–500 ng/ml for corticosterone. The correlation coefficient for all glucocorticosteroids was  $r^2 > 0.99$  (Figure 5).

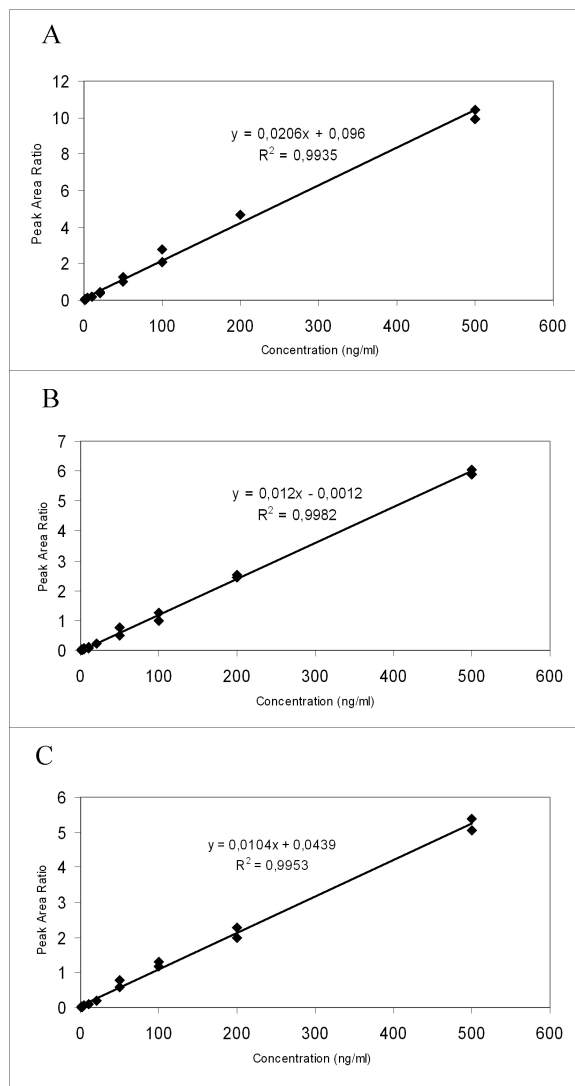


Fig. 5. Calibration curves for (A) cortisol, (B) cortisone, (C) corticosterone.

The limit of detection was determined using a post mortem human blood sample. Decreasing concentra-

tions were processed till a signal to noise ratio of  $S/N = 3$  was obtained and it was ascertained that the limit of detection for cortisol and cortisone is 0.5 ng/ml, and 1 ng/ml for corticosterone. It was assumed that, according to the general rule of estimating the limit of quantification ( $LOQ$ ),  $LOQ$  is equal to  $LOD \cdot 2$ , thus the following  $LOQ$  values were obtained: 1 ng/ml for cortisol and cortisone, and 2 ng/ml for corticosterone.

The recovery of glucocorticosteroids was determined (as the mean value) using the ratio of the analytical signal from 4 extracts of 100 ng/ml solutions of cortisol, cortisone and corticosterone (in 6% BSA in 0.9% NaCl) to the signal from the non-extracted methanol standards of equal concentrations.

The precision (relative standard deviation,  $RSD$ ) was determined by fourfold extraction of the same solution of cortisol, cortisone and corticosterone (100 ng/ml each of the glucocorticosteroids in 6% BSA in 0.9% NaCl), and then quantification of these substances in each extract according to the above described manner within a single day. The results of analytical procedures are shown in Table II.

The usefulness of the above presented method of glucocorticosteroids determination in examination of a specimen collected from a human corpse was evaluated by its application to cortisol, cortisone and corticosterone quantifications in 10 blood samples, the results of which are presented in Table III.

Moreover, three blood samples were also used to check what extraction efficiency can be achieved when there is a requirement for glucocorticosteroids determination in a post mortem specimen. To this end, these samples were spiked with 100 ng/ml cortisol, cortisone and corticosterone, which allowed a cortisol concentration level within the physiological range, i.e. 20 – 250 ng/ml [11], to be achieved. The obtained results are presented in Table II. They were calculated according to the formula:

TABLE II. VALIDATION PARAMETERS OF THE GLUCOCORTICOSTEROIDS DETERMINATION METHOD

Analyte	Limit of linearity [ng/ml]	Correlation coefficient [ $r^2$ ]	$LOD$ [ng/ml]	$LOQ$ [ng/ml]	Precision $RSD$ [%] ( $N = 4$ )	Recovery $SD$ ( $N = 4$ )
Cortisol	1–500	0.9935	0.5	1.0	6.7	$88.5 \pm 4.6$ ( $86.91 \pm 8.54$ )*
Cortisone	1–500	0.9982	0.5	1.0	5.8	$94.1 \pm 5.6$ ( $90.68 \pm 3.07$ )*
Corticosterone	2–500	0.9953	1.0	2.0	3.0	$96.5 \pm 4.6$ ( $71.69 \pm 3.46$ )*

\* – % recovery after addition of 100 ng/ml cortisol, cortisone and corticosterone to three samples of blood from corpses.

$$\% \text{ recovery} = \frac{A_{x+100} - A_x}{A_{100}} \cdot 100, \quad \{1\}$$

where:  $A_{x+100}$  – the glucocorticosteroid peak area obtained after extraction of a blood sample spiked with 100 ng/ml cortisol, cortisone and corticosterone;  $A_x$  – the glucocorticosteroid peak area, obtained after extraction of a blood sample without any addition of cortisol, cortisone and corticosterone;  $A_{100}$  – the glucocorticosteroid peak area, obtained for the 100 ng/ml standard solution (no extraction).

TABLE III. RESULTS OF THE DETERMINATION OF CORTISOL, CORTISONE AND CORTICOSTERONE IN *POST-MORTEM* BLOOD SAMPLES, COLLECTED FROM PEOPLE WHO DIED IN ROAD ACCIDENTS

Age, sex	Cortisol [ng/ml]	Cortisone [ng/ml]	Corticosterone [ng/ml]
34 ♂	23	2	3
30 ♂	25	3	4
36 ♂	44	3	4
66 ♂	13	2	3
69 ♂	30	< LOQ	4
29 ♂	44	4	4
53 ♂	67	6	4
68 ♀	26	5	3
58 ♂	34	< LOQ	4
25 ♂	12	3	3

## 6. Discussion and conclusions

Glucocorticosteroids concentrations determined in the 10 blood samples collected from the human corpses were within the physiological concentration range, which was in accordance with preliminary expectations, as the circumstances of chosen fatal cases did not indicate previous stress, and the time from trauma to death was too short to induce increased glucocorticosteroids secretion by the adrenal gland. It was also verified that the glucocorticosteroids recovery from the *post-mortem* blood samples was satisfactory. Thus, taking into account the above information and the fact that the parameters of the liquid chromatography system enabled very good separation of cortisone, cortisol and corticosterone from each other, and also from dexamethasone in a single analytical

process (Figure 6), and the parameters of the mass spectrometer presented in this work enabled achievement of the appropriate intensity of selected pseudo-molecular ions, i.e.  $> 10^5$ , the LC-ACPI-MS method of glucocorticosteroids determination proposed in this paper should be considered as the simplest and at the same time an adequately sensitive and specific method for the purposes of posthumous diagnostics, especially when biochemical confirmation of intravital stress agent activity is important in an investigated case. It was decided to apply atmospheric pressure chemical ionisation instead of electron ionisation, because this kind of ionisation is milder and allowed obtaining of an appropriately high sensitivity and linearity of detection.

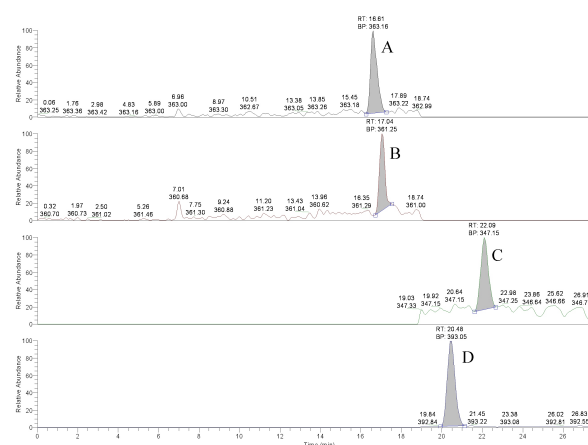


Fig. 6. Mass chromatograms of blood extracts: (A) cortisol, (B) cortisone, (C) corticosterone, (D) dexamethasone.

In our opinion, the application of dexamethasone as the internal standard should be considered as an advantage of the proposed method, because (as it turned out) it successfully substitutes for expensive and not-readily-available deuterated glucocorticosteroid analogs. However, a disadvantage of the method is that organic acids must be eliminated from the mobile phase (despite the fact that organic acids are beneficial for atmospheric pressure ionisation, due to increasing the intensity of detection signal). For it was found that even a slight addition (of organic acids) caused adducts formation, significantly interfering with detection.

## References

1. Brinkmann B., Fechner G., Karger B. [et al.], Ketoacidosis and lactic acidosis – frequent causes of death in chronic alcoholics?, *International Journal of Legal Medicine* 1998, 111, 115–119.

2. Baiocchi C., Brussino M., Pazzi M. [et al.], Separation and determination of synthetic corticosteroids in bovine liver by LC-Ion-Trap-MS-MS on porous graphite, *Chromatographia* 2003, 58, 11–14.
3. Buszewicz G., Teresiński G., Bańka K. [i in.], Ocena przydatności diagnostycznej współczynnika  $\beta$ -hydroksy-maślan/aceton w sądowo-lekarskiej diagnostyce nagłych zgonów, *Archiwum Medycyny Sądowej i Kryminologii* 2007, 57, 289–293.
4. Furuta T., Eguchi N., Shibasaki H. [et al.], Simultaneous determination of endogenous and  $^{13}\text{C}$ -labelled cortisols and cortisones in human plasma by stable isotope dilution mass spectrometry, *Journal of Chromatography B* 2000, 738, 119–127.
5. Gaskell S. J., Gould V. J., Leith H. M., [in:] Mass spectrometry in biomedical research, Gaskell S. J. [ed.], Wiley, Chichester 1986.
6. Hirvonen J., Necropsy findings in fatal hypothermia cases, *Forensic Science International* 1976, 8, 155–164.
7. Huttunen P., Lando N. G., Meshtsheryakov V. A. [et al.], Effects of long-distance swimming in cold water on temperature, blood pressure and stress hormones in winter swimmers, *Journal of Thermal Biology* 2000, 25, 171–174.
8. Kanetake J., Kanawaku Y., Mimasaka S. [et al.], The relationship of a high level of serum beta-hydroxybutyrate to cause of death, *Legal Medicine* 2005, 7, 169–174.
9. Kammerer M., Adams D., von Castelberg B., Pregnant women become insensitive to cold stress, *BMC Pregnancy and Childbirth* 2002, 2, 8.
10. Kushnir M. M., Neilson R., Roberts W. L. [et al.], Cortisol and cortisone analysis in serum and plasma by atmospheric pressure photoionization tandem mass spectrometry, *Clinical Biochemistry* 2004, 37, 357–362.
11. Murray R. K., Granner, D. K., Mayes P. A., [et al.], *Biochemia Harpera*, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 1995.
12. Meulenbergh P. M. M., Ross H. A., Swinkels L. M. J. W. [et al.], The effect of oral contraceptives on plasma-free and salivary cortisol and cortisone, *Clinica Chimica Acta* 1987, 165, 379–385.
13. Sippell W. G., Bidlingmaier F., Becker H. [et al.], Simultaneous radioimmunoassay of plasma aldosterone, corticosterone, 11-deoxycorticosterone, progesterone, 17-hydroxyprogesterone, 11-deoxycortisol, cortisol and cortisone, *Journal of Steroid Biochemistry* 1978, 9, 63–74.
14. Shibasaki H., Furuta T., Kasuya Y., Quantification of corticosteroids in human plasma by liquid chromatography–thermospray mass spectrometry using stable isotope dilution, *Journal of Chromatography B* 1997, 692, 7–14.
15. Tello F. L., Hernandez D. M., Performance evaluation of nine hormone assays on the Immulite 2000 immunoassay system, *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 2000, 38, 1039–1042.
16. Thomsen J. L., Felby S., Theilade P. [et al.], Alcoholic ketoacidosis as a cause of death in forensic cases, *Forensic Science International* 1995, 75, 163–171.
17. Teresiński G., Buszewicz G., Mądro R., Biochemical background of ethanol induced cold susceptibility, *Legal Medicine* 2005, 7, 15–23.
18. Teresiński G., Buszewicz G., Mądro R., The influence of ethanol on the level of ketone bodies in hypothermia, *Forensic Science International* 2002, 127, 88–96.

---

**Corresponding author**

Krzysztof Bańka  
Katedra i Zakład Medycyny Sądowej  
Uniwersytet Medyczny w Lublinie  
ul. Jaczewskiego 8  
PL 20-090 Lublin  
e-mail: krzysztofbanka@wp.pl

---

# METODA OZNACZANIA KORTYZOLU, KORTYZONU I KORTYKOSTERONU W MATERIALE BIOLOGICZNYM ZA POMOCĄ CHROMATOGRAFII CIECZOWEJ SPRZĘŻONEJ ZE SPEKTROMETRIĄ MASOWĄ

## 1. Wstęp

Zgony nagłe, po których sekcja zwłok oraz wyniki późniejszych badań histologicznych i toksykologicznych nie pozwalają na ustalenie przyczyny śmierci, obejmują także tę grupę przypadków, w której miały miejsce zaburzenia biochemiczne [1, 3, 8, 16, 18], także takie, które podlegają regulacji hormonalnej [6, 16]. Do zaburzeń tego rodzaju dochodzi m.in. w przypadku długotrwałego oddziaływania niskiej temperatury otoczenia, kiedy to zostaje pobudzony układ: podwzgórze – przysadka – nadnercza, co powoduje szybką, bo następującą już po upływie 20 min [7, 9] sekrecję glikokortykosterydów, która powinna spowodować znaczny wzrost ich chwilowego stężenia we krwi. Szczególną uwagę należy przy tym zwrócić na kortyzol, gdyż w warunkach fizjologicznych stanowi on 95% puli glikokortykosterydów. Jego dobową produkcję wynosi 10–30 mg na dobę, a chwilowe stężenie w warunkach fizjologicznych waha się w zakresie 20–250 ng/ml [11].

Aktualnie glikokortykosterydy oznacza się najczęściej metodami immunologicznymi [12, 13, 15], które charakteryzuje wysoka czułość oraz krótki czas analizy. Ich wadę stanowi natomiast niska specyficzność [5], co znacznie obniża użyteczność tych metod w praktyce medyczno-sądowej. Odpowiednio czułą i specyficzną (bez derywatyzacji) technikę LC-MS stosowano dotychczas wyłącznie do oznaczeń surowicy krwi pobranej od osób żywych [2, 10, 14]. Użycie techniki GC-MS komplikuje zaś konieczność zastosowania derywatyzacji, która jest pracochłonna, a ponadto ze względu na drogie odczynniki, podwyższa koszty analizy [4].

Celem pracy było zatem opracowanie, optymalizacja i walidacja procedury analitycznej oznaczania wybranych hormonów kory nadnerczy – kortyzolu, kortyzonu i kortykosteronu we krwi pobranej od osób zmarłych za pomocą chromatografii cieczerwowej w połączeniu ze spektrometrią masową z zastosowaniem jonizacji chemicznej pod ciśnieniem atmosferycznym (LC-APCI-MS), a następnie sprawdzenie jej przydatności w analizie wybranych przypadków nagłych zgonów.

## 2. Materiały i aparatura

Odczynniki stanowiły: metanol Chromasolv® LC-MS oraz acetonitryl Chromasolv® LC-MS (Riedel-de Haen,

Niemcy), dichlorometan (Sigma-Aldrich, Niemcy), kwas mrówkowy (Merck, Niemcy), deksametazon, kortyzol oraz kortyzon (Sigma-Aldrich, Niemcy), kortykosteron oraz mrówczan amonu (Fluka, Stany Zjednoczone), albumina BSA (Sigma-Aldrich, Niemcy), natrium chloratum 0,9% (Fresenius Kabi, Polska), a także woda dejonizowana uzyskana przy użyciu Milli-Q (Millipore, Stany Zjednoczone). Analizie poddano próbki krwi pobrane z dziesięciu zwłok osób, u których nie stwierdzono istotnych zmian chorobowych, a zmarły natychmiast po doznaniu niespodziewanego urazu.

Wykorzystano chromatograf cieczerwowy Thermo Finnigan Surveyor wyposażony w pompę gradientową i automatyczny dozownik sprzężony ze spektrometrem masowym typu pułapka jonowa LCQ Advantage Max (Finnigan, San Jose, Stany Zjednoczone), w którym zastosowano chemiczną jonizację pod ciśnieniem atmosferycznym (APCI) w trybie jonów dodatnich. Chromatograf cieczerwowy i spektrometr masowy pracowały pod kontrolą programu X'calibur, który wykorzystano również do opracowania danych.

## 3. Optymalizacja metody

Podstawowym kryterium optymalizacji metody było uzyskanie jak najwyższych pików chromatograficznych kortyzolu, kortyzonu i kortykosteronu, co osiągnięto przez określenie odpowiednich:

- parametrów pracy spektrometru mas, tj. napięcia kapilary i jej temperatury, przepływu gazu jonizującego i pomocniczego, temperatury odparownika i prądu korony, które określono przy użyciu metanolowych wzorców standardu wewnętrznego, tj. deksametazonu oraz analitów – kortyzolu, kortyzonu i kortykosteronu;
- warunków ekstrakcji, co osiągnięto przez porównywanie (pod kątem czystości i wydajności) ekstraktów glikokortykosterydów i deksametazonu z roztworu 6% BSA w 0,9% NaCl otrzymanych zarówno przy użyciu dichlorometanu, jak i octanu etylu (przy pH 6,5 oraz pH 9,0);
- warunków chromatograficznych, tj. takich, które umożliwiały uzyskanie w jednym procesie analitycznym odpowiedniego rozdzielania metanolowych wzorców standardu wewnętrznego, czyli deksametazonu i analitów, tj. glikokortykosterydów przy użyciu ko-

lumny Purospher RP-C18, 125 3 mm (Merck) oraz Adsorbosphere HS-C18, 250 4,6 mm (Alltech), do czego zastosowano kilka wariantów dwuskładnikowej fazy ruchomej składającej się z acetonitrylu i wody.

#### 4. Procedura analityczna

##### 4.1. Procedura chromatograficzna HPLC-APCI-MS

Najlepszy rozdział chromatograficzny ekstraktów uzyskano na kolumnie Adsorbosphere HS C18, 250 4.6 mm I.D. 5  $\mu\text{m}$  (Alltech) po zastosowaniu dwuskładnikowej fazy ruchomej składającej się z wody (A) i acetonitrylu (B) o przepływie 0,5 ml/min. Profil gradientu wynosił: przez 2 min 70% A i 30% B, po czym przez 28 min proporcje fazy ruchomej zmieniały się stopniowo do 30% A i 70% B, a następnie udział fazy B wzrastał dalej tak, by w 43 min osiągnąć 100%. Stan wyjściowy, tj. 70% A i 30% B przywracano później przez 6 min. Cała procedura chromatograficzna trwała więc 49 min. Objętość nstrzyku ekstraktów wynosiła 20  $\mu\text{l}$ .

Optymalnymi parametrami dla pracy spektrometru masowego okazały się: temperatura źródła jonów = 550°C; azot = 40 arb (*arbitrary unit of LCQ instrument*) jako gaz jonizujący; azot = 5 arb (*arbitrary unit of LCQ instrument*) jako gaz pomocniczy; temperatura kapilary = 220°C oraz prąd korony = 5 A. Widma masowe oznaczanych substancji mieściły się w zakresie 100–400 m/z (ryciny 1, 2, 3, 4).

Do analizy ilościowej zastosowano opcję monitorowania wybranych jonów (SIM). Sygnał pochodzący od pozornych jonów molekularnych  $[\text{M}+\text{H}]^+$  rejestrowano przy wartościach m/z = 363 dla kortyzolu, 361 dla kortyzonu, 347 dla kortykosteronu oraz 393 dla deksametazonu (tabela I).

##### 4.2. Ekstrakcja

Do 500 1 roztworów wzorcowych glikokortykosteroidów (w 6% BSA w 0,9% NaCl), a także 500 1 krwi, dodawano 0,5 ml buforu amonowego (pH = 6,5) i jako standard wewnętrzny 25  $\mu\text{l}$  roztworu deksametazonu w metanolu (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). Ekstrakcja (przez wytrząsanie z 5 ml dichlorometanu) trwała przez 15 min. Następnie próbki wirowano przy 3000 obr/min przez 10 min, supernatant przenoszono do próbek 2 ml typu Eppendorf i odparowywano do sucha w temperaturze 45°C w strumieniu azotu. Przed oznaczeniem suchą pozostałość rozpuszczano w 30  $\mu\text{l}$  metanolu.

#### 5. Walidacja metody

Liniowość detekcji określono dla każdego glikokortykosteroidu oddzielnie przy dziewięciu punktach pomiarowych w 2 powtórzeniach w zakresie 1–500 ng/ml dla kortyzolu i kortyzonu oraz w zakresie 2–500 ng/ml dla kortykosteronu i stwierdzono, że współczynnik korelacji dla wszystkich glikokortykosteroidów wynosił  $r^2 > 0,99$  (rycina 5).

Granice wykrywalności (*LOD*) określono, używając krwi pobranej ze zwłok. Zastosowano przy tym malejące stężenia aż do osiągnięcia stosunku sygnału do szumu  $S/N = 3$  i stwierdzono, że dla kortyzolu i kortyzonu granica detekcji wynosi 0,5 ng/ml, a dla kortykosteronu 1 ng/ml. Przy założeniu, że zgodnie z ogólnie przyjętymi zasadami granica oznaczalności (*LOQ*) to  $LOD \cdot 2$ , przyjąć należy, że uzyskano *LOQ* rzędu 1 ng/ml dla kortyzolu i kortyzonu oraz 2 ng/ml dla kortykosteronu.

Odzysk glikokortykosteroidów wyznaczono (jako średnią) na podstawie sygnałów analitycznych 4 ekstraktów otrzymanych z roztworów 100 ng/ml kortyzolu, kortyzonu i kortykosteronu (w 6% BSA w 0,9% NaCl) z sygnałem ich nieekstrahowanych wzorców metanolo-owych o tym samym stężeniu.

Precyzję (względne odchylenie standardowe, *RSD*) wyznaczono przez czterokrotną ekstrakcję tego samego roztworu kortyzolu, kortyzonu i kortykosteronu (po 100 ng/ml każdego z glikokortykosteroidów w 6% roztworze BSA w 0,9% NaCl), a następnie oznaczenie tych ekstraktów w sposób wyżej opisany w ciągu jednego dnia. Rezultaty procedur walidacyjnych przedstawiono w tabeli II.

Przydatność przedstawionej wyżej metody oznaczania glikokortykosteroidów do badania materiału pobranego ze zwłok sprawdzono, oznaczając przy jej użyciu kortyzol, kortyzon i kortykosteron w dziesięciu próbkach krwi, czego wyniki przedstawia tabela III.

Trzy próbki krwi wykorzystano ponadto do sprawdzenia, jaką wydajność ekstrakcji można uzyskać wówczas, gdy zaistnieje potrzeba oznaczenia glikokortykosteroidów w materiale pobranym ze zwłok. W tym celu dodano do nich po 100 ng/ml kortyzolu, kortyzonu i kortykosteronu, gdyż pozwalało to na osiągnięcie takiego stężenia kortyzolu, które mieściło się w zakresie stężeń fizjologicznych, tj. 20–250 ng/ml [11]. Wyniki, jakie uzyskano, przedstawia tabela II. Do ich obliczenia zastosowano w tym przypadku wzór:

$$\% \text{ recovery} = \frac{A_{x+100} - A_x}{A_{100}} \cdot 100, \quad \{1\}$$

gdzie:  $A_{x+100}$  to powierzchnia piku glikokortykosteroidu uzyskana po ekstrakcji z krwi z dodatkiem 100 ng/ml kortyzolu, kortyzonu i kortykosteronu;  $A_x$  – powierzchnia piku glikokortykosteroidu uzyskana po ekstrakcji z krwi bez dodatku kortyzolu, kortyzonu i kortykoste-



ronu;  $A_{100}$  – powierzchnia piku wzorca glikokortykosterydu o stężeniu 100 ng/ml (bez ekstrakcji).

## 6. Dyskusja i wnioski

Stężenia glikokortykosterydów stwierdzone w 10 próbkach krwi pobranej ze zwłok mieściły się w zakresie stężeń fizjologicznych, co jest zgodne z oczekiwaniami, bowiem dobrano takie przypadki zgonów, w których ich okoliczności nie wskazywały na wcześniejsze zadziałanie stresu, a od zaistnienia urazu do zgonu upływał zbyt krótki czas, by zdarzenie mogło spowodować wzmożoną sekrecję glikokortykosterydów przez nadnercza. Sprawdzono również, że odzysk glikokortykosterydów z krwi pobranej ze zwłok jest zadowalający. Jeżeli zatem wziąć pod uwagę powyższe stwierdzenia, oraz fakt, że parametry chromatografu cieczowego pozwoliły na bardzo dobry rozdział kortyzonu, kortyzolu i kortykosteronu od siebie, a także od deksametazonu w jednym procesie analitycznym (rycina 6), zaś przedstawione w tej pracy parametry pracy detektora masowego pozwoliły na uzyskanie odpowiedniej intensywności wybranych jonów pseudomolekularnych, tj.  $> 10^5$ , to prezentowaną w tej pracy metodę LC-APCI-MS oznaczania glikokortykosterydów uznać należy za najprostszą a jednocześnie odpowiednio czułą i specyficzną dla potrzeb diagnostyki pośmiertnej, zwłaszcza wówczas, gdy dla ocenianego przypadku istotne znaczenie ma biochemiczne potwierdzenie zażyciowego zadziałania czynnika stresowego. Na zastosowanie jonizacji chemicznej pod ciśnieniem atmosferycznym (APCI), a nie ESI (jonizacji elektronowej), zdecydowano się, ponieważ w jej przypadku warunki jonizacji są łagodniejsze, co pozwoliło na osiągnięcie odpowiednio wysokiej czułości i liniowości detekcji.

Do zalet proponowanej metody zaliczyć należy naszym zdaniem możliwość zastosowania deksametazonu jako standardu wewnętrznego, gdyż (jak się okazało) z powodzeniem zastępuje on drogie i trudno dostępne deuterowe analogi glikokortykosterydów. Do jej ograniczeń należy natomiast to, że z fazy ruchomej należy wyeliminować kwasy organiczne (mimo, że są one korzystne dla jonizacji w trybie APCI, gdyż zwiększają intensywność sygnału detekcji). Stwierdzono bowiem, że nawet niewielki ich dodatek powodował tworzenie adduktów znacznie zakłócających detekcję.