



## DETERMINATION OF KETONE BODIES IN *POST-MORTEM* BLOOD AND URINE BY GAS CHROMATOGRAPHY-POSITIVE-ION CHEMICAL IONISATION-MASS SPECTROMETRY

Krzysztof BAŃKA, Grzegorz BUSZEWICZ, Roman MAĐRO

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

### Abstract

Under physiological conditions, the levels of ketone bodies in blood are low. Their production increases in significant insulin deficiency and alcohol abuse, and this can lead to ketoacidosis. Hence, the determination of main ketone bodies, that is  $\beta$ -hydroxybutyric acid ( $\beta$ -HBA) and acetoacetic acid (Ac-Ac), may be useful for diagnosis of sudden deaths. A simple and quick method of  $\beta$ -HBA and Ac-Ac determination in *post-mortem* material (blood and urine) using gas chromatography – chemical ionisation mass spectrometry was developed. The samples were extracted with acetonitrile. BSTFA + 1% TMCS was used for derivatisation. The mass detector was operated in positive chemical ionisation mode; monitoring of selected ions:  $m/z$  233 ( $\beta$ -HBA),  $m/z$  231 (Ac-Ac) and  $m/z$  239 (GHB-D6 used as an internal standard) was applied for quantitative analysis. The use of chemical ionisation enabled reduction of the influence of the biological matrix (blood and urine), even when the decomposition process had started. Full validation of the method demonstrated its specificity, high linearity ( $r^2 > 0.99$ ), extraction yields suitable for forensic toxicological analysis (77–97%), accuracy and precision.

### Key words

Ketone bodies; *Post-mortem* blood and urine; Validation; GC-PCI-MS.

Received 30 January 2009; accepted 27 April 2009

### 1. Introduction

The ketone bodies include  $\beta$ -hydroxybutyric acid ( $\beta$ -HBA), acetoacetic acid (Ac-Ac) and acetone (Act). In physiological conditions, their concentration in the blood does not usually exceed 0.2 mmol/l [23]. The proportions of  $\beta$ -HBA, Ac-Ac and Act are 78%, 20% and 2%, respectively [3]. However, these relations are not fixed, because Ac-Ac may be converted under the influence of mitochondrial D(-)-3-hydroxybutyrate dehydrogenase into  $\beta$ -HBA (and *vice versa*), while acetoacetic acid is subjected to constant, spontaneous decarboxylation to acetone [24].

Determination of the ketone bodies in a living person plays an important role in the diagnosis of diabetes

[12, 13, 14, 19]. According to the American Diabetes Association, their monitoring is recommended in patients with type 1 diabetes during infection, increased stress, chronic hyperglycemia, and when the symptoms of ketoacidosis occur [1]. A high concentration of ketone bodies in *post-mortem* material may thus be the only marker of such *ante-mortem* events and biochemical disturbances [26]. High concentrations have also been observed in persons abusing alcohol, and in cases where death was caused by hypothermia [7, 15, 16, 25, 27].

Ketone bodies can be determined in the urine of living persons using tests based on the reaction with sodium nitroprusside [9, 10], but these methods are semi-quantitative and do not allow detection of

-HBA. Moreover, ketone bodies appear in urine with a 2–4-hour delay when compared to blood. The result of a urine test may thus be negative, even though ketonemia already exists – determined mainly by -HBA, as the proportion of -HBA to Ac-Ac in blood in such cases may be up to 10:1 [18]. This means that the developing acidosis is due mainly to an increase in -HBA. Thus, determination of -HBA in blood is more useful in diagnosis of ketonemia (and monitoring of ketoacidosis) than determination of ketone bodies in urine [20, 28].

The methods for ketone bodies determination (both enzymatic and chromatographic) which can be found in the literature have been used mainly to study material collected from living persons [2, 6, 21, 30, 31]. A technique involving static headspace analysis in combination with gas chromatography and FID detection, after enzymatic oxidation of -HBA to Ac-Ac followed by thermal decarboxylation of Ac-Ac to Act, has been developed for their determination in *post-mortem* material [8]. However, due to its multistage character, this method has many disadvantages, including a narrow range of linearity and poor accuracy caused mainly by the indirect character of -HBA determination.

Therefore, the study was aimed at development and full validation of a rapid and simple method of -HBA and Ac-Ac determination in *post-mortem* material (blood and urine) which would be suitable for giving an opinion on the cause of death.

## 2. Material and methods

### 2.1. Reagents

Acetonitrile Chromasolv (ACN, Riedel-de Haën, Germany), -HBA sodium salt, Ac-Ac lithium salt (Sigma-Aldrich, Germany), -hydroxybutyric acid (GHB, Cerilliant, United States), -hydroxybutyric acid-D6 (GHB-D6, Cerilliant, United States), ethyl acetate (Merck, Germany), N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide with 1% trimethylchlorosilane (BSTFA + 1% TMCS, Sigma-Aldrich, Germany) and deionised water obtained using a Milli-Q (Millipore, United States) were used as the reagents.

### 2.2. Biological material

The investigated materials were:

- 6% bovine albumin, obtained by dilution of 30% solution (BSA, Sigma-Aldrich, Germany) in deionised water; this was used to select the conditions

of -HBA and Ac-Ac determination, and to optimise and validate the developed method;

- 6 blood samples and 6 urine samples taken during autopsy from 6 persons who had died immediately after an injury. This material was used to determine the extraction efficiency and to verify the specificity of the method.

### 2.3. Extraction

A 100  $\mu$ l portion of 6% BSA (and then also blood and urine) was placed in an Eppendorf-type vial, and 10  $\mu$ l of the internal standard (GHB-D6) solution was added to reach a concentration of 10  $\mu$ g/ml. The samples were vortex-mixed, followed by drop wise addition of 200  $\mu$ l ACN while simultaneously mixing, and then mixing for another 30 seconds. Then they were centrifuged at 15 000 rpm for 10 minutes. 200  $\mu$ l portions of organic phase were transferred into inserts, and evaporated until dry in a stream of nitrogen at room temperature. 50  $\mu$ l of ethyl acetate and 50  $\mu$ l of BSTFA + 1%TMCS were added to the prepared material, and it was derivatised for 30 minutes at 60°C.

### 2.4. Instruments and chromatographic conditions

A Trace GC Ultra (Thermo Electron, United States) gas chromatograph equipped with split/splitless injector operating at 280°C and a TRIPlus autosampler (Thermo Electron, United States) was applied and was coupled to a Trace DSQ (Thermo Electron, United States) quadrupole mass spectrometer. Chromatographic separation was carried out on an RXi-5ms (30 m  $\times$  0.25 mm  $\times$  0.25  $\mu$ m, Restek, United States) capillary column. Initial oven temperature (60°C) was maintained for 0.1 min, then increased (7°C/min) to 90°C, held for 2 min, and then increased (20°C/min) to 180°C and held for 3 minutes. The transfer line temperature was 280°C and the ion source temperature was 200°C. The mass detector was operated in positive chemical ionisation (PCI) mode. Helium was used as a carrier gas (1.0 ml/min), and methane was the ionisation gas (2.0 ml/min). The injection volume was 1  $\mu$ l. The operations of the gas chromatograph and the mass spectrometer were controlled by X'calibur software, which was also used for data treatment.

In qualitative analysis, full mass spectra of -HBA, Ac-Ac and GHB-D6 were recorded in full scan mode (Figure 1), and the most intensive ions were selected for further study in selected ion monitoring mode (SIM). In quantitative analysis, the analytical signals of ions m/z 233 (-HBA), 231 (Ac-Ac) and 239 (GHB-D6) were recorded.

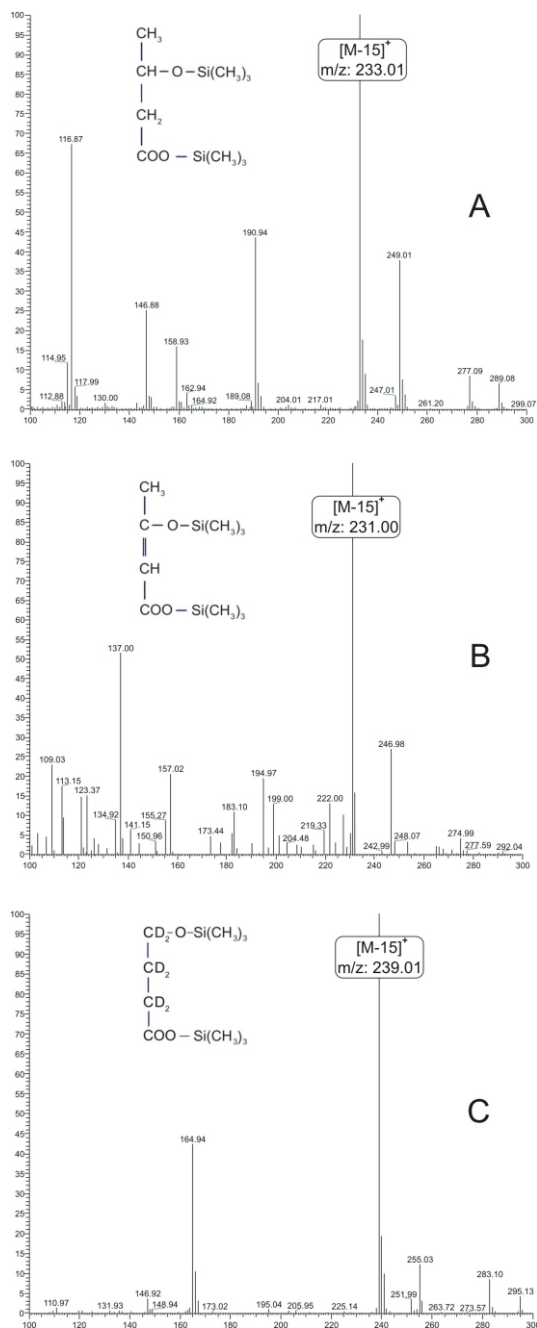


Fig. 1. The mass spectrum of the trimethylsilyl derivative of -hydroxybutyrate (A), acetoacetate (B), deuterated -hydroxybutyrate (C) obtained by positive-ion chemical ionization.

TABLE I. THE PARAMETERS OF CALIBRATION CURVES FOR -HBA AND Ac-Ac (OBTAINED BY GC-PCI-MS)

Analyte	Concentration range [ g/ml]	Equation of linear regression	$r^2$ <sup>a)</sup>	LOD <sup>b)</sup> [ g/ml]	LOQ <sup>c)</sup> [ g/ml]
-HBA	0.1–50.0	$y = 0.1314x + 0.0995$	0.9980	0.0005	0.001
Ac-Ac	0.1–50.0	$y = 0.0579x + 0.0180$	0.9948	0.0050	0.010

a) Regression coefficient; b) limit of detection; c) limit of quantification.

### 3. Results

#### 3.1. Linearity

-HBA and Ac-Ac were added to the vials with a biological matrix, i.e. 6% BSA solution (used as a substitute for blood and urine, free from endogenous compounds including ketone bodies), in amounts required to obtain the concentrations: 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2, 5, 10, 20 and 50 g/ml. Calibration curves were drawn based on the relationship between the peak areas for these concentrations of -HBA and Ac-Ac and the peak area of GHB-D6 at a concentration of 10 g/ml.

It was found based on the determinations at 9 concentration levels that the developed GC-PCI-MS method was linear over the whole range (0.1–50 g/ml), which is shown in Figure 2. Coefficients of determination for -HBA and Ac-Ac were:  $r^2 = 0.9980$  and  $r^2 = 0.9948$ , respectively.

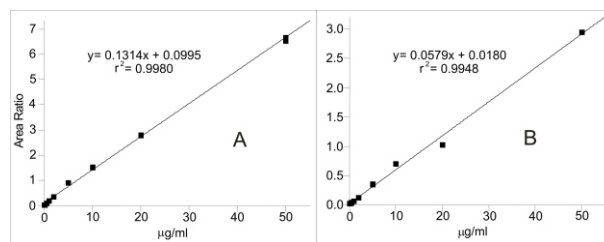


Fig. 2. Calibration curves for -hydroxybutyrate (A) and acetoacetate (B) in range 0.1–50 g/ml.

#### 3.2. Limits of detection and quantification

Limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) were determined using X<sup>2</sup>calibur software, based on an algorithm proposed by the instrument's manufacturer. The limit of detection (LOD) for -HBA was 0.0005 g/ml, whereas it was 0.005 g/ml for Ac-Ac. The LODs corresponded to the concentration of analytes when the signal to noise ratio was 3. The limits of quantification (LOQs) were 0.001 g/ml for -HBA and 0.01 g/ml for Ac-Ac, and they were equal to the concentration of analytes when the signal to noise ratio was 6 (Table I).

### 3.3. Precision and accuracy

Two samples of  $\gamma$ -HBA and Ac-Ac in 6% BSA solution, in which the concentrations were 0.2 g/ml and 10 g/ml, were used to determine the precision and accuracy of the method. The intra-group precision and accuracy were tested in a single day in six replications, whereas the inter-group parameters were determined based on the analysis of the above standards in three replications (the second set of measurements was performed after 3 days, and the third after 9 days). The data were used to calculate the method precision expressed as a percentage (as the ratio of the absolute standard deviation (*SD*) to the mean analyte concentration) and its accuracy (as the ratio of the mean concentration of an analyte to its actual concentration in the sample).

The accuracy and the precision of  $\gamma$ -HBA and Ac-Ac determinations were 80–115.9% and 3.02–19.89%, respectively (intra-group) and 80–112.3% and 10.82–13.16%, respectively (inter-group), as shown in Table II.

### 3.4. Recovery

The extraction recovery was determined for two concentrations of  $\gamma$ -HBA and Ac-Ac in 6% BSA (0.2 g/ml and 10 g/ml), in six replications at each level. The mean recovery of the ketone bodies was calculated by comparison of the analytical signals of  $\gamma$ -HBA and Ac-Ac extracts in 6% BSA with the analytical signals of their standards at the same concentration in methanol. In addition, 10  $\mu$ l of  $\gamma$ -HBA and Ac-Ac solutions at a concentration of 100 g/ml were added to 100  $\mu$ l of each of six blood samples and six urine samples (obtained from 6 corpses), and the absolute extraction efficiency of these ketone bodies from the material “burdened” by whole biological matrix

was checked. It was calculated according to the formula:

$$\%W = \frac{A - B}{C} \cdot 100,$$

where: *A* – the analyte signal obtained for extract of blood (or urine) sample spiked with  $\gamma$ -HBA and Ac-Ac, *B* – the analyte signal obtained for extract of blood (or urine) sample without the addition of  $\gamma$ -HBA and Ac-Ac; *C* – the analytical signal obtained for analysis of  $\gamma$ -HBA and Ac-Ac solutions in methanol at a concentration of 100 g/ml.

High extraction efficiencies of  $\gamma$ -HBA and Ac-Ac were obtained for 6% BSA (in the range 80–97%) as well as for blood and urine (in the range 77–90%) (see Table III).

### 3.5. Specificity

Verification of the method specificity was performed by conducting the whole analytical process for two blood and urine samples with the addition of 10 g GHB/ml. No effect of GHB on  $\gamma$ -HBA and Ac-Ac determination was observed, which indicates good specificity of the method (Figure 3). The choice of GHB resulted from its co-existence in blood [22] and urine [17], and the large variability of its concentrations in *post-mortem* material. The studies were performed in the selected ions monitoring mode, which increases the method specificity. Moreover,  $\gamma$ -HBA and GBH are constitutional isomers, so their mass spectra are very similar, therefore it is necessary to distinguish them.

TABLE II. VALIDATION DATA OF  $\gamma$ -HBA AND Ac-Ac DETERMINATION BY GC-PCI-MS

Analyte [ g/ml]	Intra-day validation ( <i>n</i> = 6)			Inter-day validation ( <i>n</i> = 6)		
	Mean determined concentration [ g/ml]	<i>RSD</i> [%]	Accuracy [%]	Mean determined concentration [ g/ml]	<i>RSD</i> [%]	Accuracy [%]
$\gamma$ -HBA						
0.2	0.19	14.53	95.00	0.16	10.82	80.00
10.0	11.59	3.02	115.90	11.23	11.26	112.30
Ac-Ac						
0.2	0.16	19.89	80.00	0.17	12.62	85.00
10.0	10.21	3.20	102.10	10.82	13.16	108.20

TABLE III. EXTRACTION RECOVERY OF  $\beta$ -HBA AND Ac-Ac

Analyte, [ g/ml]	Recovery [%] ( $\pm$ SD), (n = 6)		
	6% BSA <sup>a)</sup>	Blood <sup>b)</sup>	Urine <sup>b)</sup>
$\beta$ -HBA			
0.2	80.2 $\pm$ 12.3	79.2 $\pm$ 9.3	77.2 $\pm$ 10.3
10.0	97.6 $\pm$ 2.8	90.2 $\pm$ 5.6	85.6 $\pm$ 8.7
Ac-Ac			
0.2	94.6 $\pm$ 8.4	88.4 $\pm$ 7.2	83.2 $\pm$ 9.5
10.0	95.7 $\pm$ 4.1	89.3 $\pm$ 6.7	84.1 $\pm$ 11.4

a) The mean recovery determined by comparison of the analytical signals of  $\beta$ -HBA and Ac-Ac extracts in 6% BSA at a concentration of 0.2 and 10 g/ml with (the signals of) their standards in methanol at the same concentration; b) the absolute extraction efficiency calculated as described in the text.

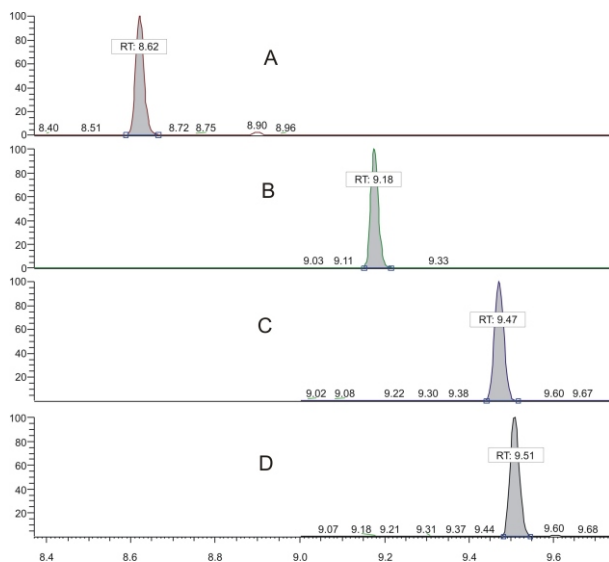


Fig. 3. Chromatograms of extracted blood with addition of  $\beta$ -HBA (A), Ac-Ac (B), GHB-D6 (C) and GHB (D).

#### 4. Discussion

The proposed GC-PCI-MS method allows the rapid determination of both Ac-Ac, which is characterised by very low stability in serum [11], and  $\beta$ -HBA, which is a better marker of ketonemia [5, 18, 29]. It does not exhibit the drawbacks and limitations of the semi-quantitative tests used for clinical purposes. Due to the substantial degree of haemolysis and autolysis of *post-mortem* blood, ready-to-use kits (e.g. used to determine the concentrations of NADH, which is formed by oxidation of an equimolar amount of Ac-Ac) and also other methods based on determina-

tion of colour products of the reaction between Ac-Ac or Act and, for example, sodium nitroprusside or ferric chloride [9, 10], cannot be applied. Moreover, the level of ketoacidosis determined by these methods may be underestimated, because  $\beta$ -HBA is not detected directly, and limitation of diagnostic procedure to just the determination of Ac-Ac and Act makes it impossible to detect cases in which ketonemia results almost exclusively from an increase in  $\beta$ -HBA concentrations [4].

#### 5. Conclusions

The presented GC-PCI-MS method of ketone bodies determination allows rapid and simultaneous analysis of Ac-Ac and  $\beta$ -HBA. This technique is specific, accurate and precise, and ensures a high extraction efficiency.

The applied extraction procedure and the application of chemical ionisation to the analysis of the tested compounds, as well as the monitoring of selected ions enables reduction of the influence of *post-mortem* biological matrix, which is particularly burdened by ingredients produced in putrefaction and autolytic processes. Furthermore, the validation results lead to the conclusion that the proposed method of ketone bodies determination is suitable for assessment of the level of ketonemia and ketonuria.

#### References

1. American Diabetes Association – ADA Position Statement, Tests of glycaemia in diabetes, *Diabetes Care* 2004, 2, 91.
2. Brashear A., Cook G. A., A spectrophotometric, enzymatic assay for D-3-hydroxybutyrate that is not dependent on hydrazine, *Analytical Biochemistry* 1983, 131, 478–482.
3. Burtis C. A., Ashwood E. R., Tietz textbook of clinical chemistry, W. B. Saunders, Philadelphia 1999.
4. Buszewicz G., Teresiński G., Bańka K. [et al.], Ocena przydatności diagnostycznej współczynnika  $\beta$ -hydroksymasłan/aceton w sądowo-lekarskiej diagnostyce nagłych zgonów, *Archiwum medycyny sądowej i kryminologii* 2007, 57, 289–293.
5. Chase H. P., Detection of ketosis and monitoring of diabetic ketoacidosis, *Managed Care* 2004, 13, 5–6.
6. Cosmi G., Di Corcia A., Samperi R. [et al.], Gas-chromatographic measurement of 3-hydroxybutyrate and lactate in plasma and 3-hydroxybutyrate in whole blood, *Clinical Chemistry* 1983, 29, 319–321.

7. Denmark L. N., The investigation of  $\beta$ -hydroxybutyrate as a marker for sudden death due to hypoglycaemia in alcoholics, *Forensic Science International* 1993, 62, 225–232.
8. Felby S., Nielsen E., Determination of ketone bodies in *postmortem* blood by head – space gas chromatography, *Forensic Science International* 1994, 64, 83–88.
9. Fraser J., Fetter M.C., Mast R.L. [et al.], Studies with a simplified nitroprusside test for ketone bodies in urine, serum, plasma and milk, *Clinica Chimica Acta* 1965, 11, 372–378.
10. Free H. M., Smeby R. R., Cook M. H. [et al.], A comparative study of qualitative tests for ketones in urine and serum, *Clinical Chemistry* 1958, 4, 323–330.
11. Fritzsche I., Buhredel P., Melcher R. [et al.], Stability of ketone bodies in serum in dependence on storage time and storage temperature, *Clinical Laboratory* 2001, 47, 399–403.
12. Gin H., Vambergue A., Vasseur C. [et al.], Blood ketone monitoring: a comparison between gestational diabetes and non-diabetic pregnant women, *Diabetes & Metabolism* 2006, 32, 592–597.
13. Guerci B., Tubiana-Rufi N., Bauduceau B., Advantages to using capillary blood beta-hydroxybutyrate determination for the detection and treatment of diabetic ketosis, *Diabetes & Metabolism* 2005, 31, 401–406.
14. Harano Y., Kosugi K., Hyosu T. [et al.], Ketone bodies as markers for type 1 (insulin-dependent) diabetes and their value in the monitoring of diabetic control, *Diabetologia* 1984 26, 343–348.
15. Iten P. X., Meier M., Beta-hydroxybutyric acid – an indicator for an alcoholic ketoacidosis as cause of death in deceased alcohol abusers, *Journal of Forensic Science* 2000, 45, 624–632.
16. 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.
17. Kasprzak K., Adamowicz P., Kała M., Determination of gamma-hydroxybutyrate (GHB) in urine by gas chromatography-mass spectrometry with positive chemical ionisation (PCI-GC-MS), *Problems of Forensic Science* 2006, 67, 289–300.
18. Laffel L., Sick-day management in type 1 diabetes, *Endocrinology and Metabolism Clinics* 2000, 29, 707–723.
19. Laffel L., Ketone bodies: a review of physiology, pathophysiology and application of monitoring to diabetes, *Diabetes/Metabolism Research and Reviews* 1999, 15, 412–426.
20. Laffel L., Laughlin C., Tovar A., Sick day management (SDM) using blood  $\beta$ -hydroxybutyrate ( $\beta$ -OHB) vs urine ketones significantly reduces hospital visits in youth with T1DM: a randomized clinical trial, *Diabetes* 2002, 51, 426.
21. Laun R. A., Rapsch B., Abel W. [et al.], The determination of ketone bodies: preanalytical, analytical and physiological considerations, *Clinical and Experimental Medicine* 2001, 1, 201–209.
22. Moriya F., Hashimoto Y., Endogenous  $\beta$ -hydroxybutyric acid levels in post-mortem blood, *Legal Medicine* 2004, 6, 47–51.
23. Murray R. K., Granner D. K., Mayes P. A. [et al.], Harper's illustrated biochemistry, Lange Medical Books, Mc-Graw-Hill, London 2003.
24. Taboulet P., Haas L., Porcher R. [et al.], Urinary acetoacetate or capillary  $\beta$ -hydroxybutyrate for the diagnosis of ketoacidosis in the Emergency Department setting, *European Journal of Emergency Medicine* 2004, 11, 251–258.
25. 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.
26. Teresiński G., Buszewicz G., Mądro R., Usefulness of  $\beta$ -hydroxybutyric acid, acetoacetic acid and acetone determinations in blood, urine and vitreous humour for necrochemical diagnosis of premortal metabolic disorders, *Problems of Forensic Science* 2000, 44, 55–75.
27. 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.
28. Vanelli M., Chiarelli F., Treatment of diabetic ketoacidosis in children and adolescents, *Acta Bio Medica* 2003, 74, 59–68.
29. Vanelli M., Chiari G., Capuano C. [et al.], The direct measurement of 3-beta-hydroxy butyrate enhances the management of diabetic ketoacidosis in children and reduces time and costs of treatment, *Diabetes, Nutrition & Metabolism* 2003, 16, 312–316.
30. Williamson D. H., Mellanby J., Krebs H. A., Enzymic determination of D(–)-beta-hydroxybutyric acid and acetoacetic acid in blood, *The Biochemical Journal* 1962, 82, 90–96.
31. Yamato S., Shinohara K., Nakagawa S. [et al.], High-performance liquid chromatography determination of ketone bodies in human plasma by precolumn derivatization with p-nitrobenzene diazonium fluoroborate, *Analytical Biochemistry* 2009, 1, 384, 145–150.

---

**Corresponding author**

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

---

# OZNACZANIE CIAŁ KETONOWYCH WE KRWI I MOCZU ZE ZWŁOK METODĄ CHROMATOGRAFII GAZOWEJ SPRZĘŻONEJ ZE SPEKTROMETRIĄ MAS Z DODATNIĄ JONIZACJĄ CHEMICZNĄ (GC-PCI-MS)

## 1. Wprowadzenie

Do ciał ketonowych zaliczamy kwas  $\beta$ -hydroksymasłowy ( $\beta$ -HBA), kwas acetoctowy (Ac-Ac) oraz aceton (Act). W warunkach fizjologicznych ich stężenie we krwi zwykle nie przekracza 0,2 mmol/l [23]. Odsetkowy udział  $\beta$ -HBA, Ac-Ac i Act wynosi przy tym odpowiednio: 78%, 20% i 2% [3]. Relacje te nie są jednak stałe, ponieważ Ac-Ac może być przekształcany w  $\beta$ -HBA (i odwrotnie) pod wpływem mitochondrialnej dehydrogenazy D(-)-3-hydroksymasłanowej, a równocześnie kwas acetoctowy ulega ciągłej, samoistnej dekarboksylacji do acetonu [24].

Zażyciowe oznaczanie ciał ketonowych odgrywa istotną rolę w diagnostyce cukrzycy [12, 13, 14, 19]. Według stanowiska Amerykańskiego Towarzystwa Diabetologicznego zalecane jest ich monitorowanie u pacjentów z cukrzycą typu 1 w przebiegu infekcji, zwiększonego stresu, w przewlekłej hiperglikemii oraz wówczas, gdy wystąpią objawy kwasicy ketonowej [1]. Wysokie stężenie ciał ketonowych w materiale pobranym ze zwłok może więc być jedynym markerem takich przedśmiertnych wydarzeń i zaburzeń biochemicznych [26]. Obserwowano je również u osób nadużywających alkoholu oraz wówczas, gdy śmierć była skutkiem nadmiernego wychłodzenia [7, 15, 16, 25, 27].

Ciała ketonowe w moczu osób żywych można oznaczyć przy użyciu testów opartych na reakcji z nitroprusydem sodu [9, 10], ale metody te mają charakter ilościowy i nie pozwalają na wykrycie kwasu  $\beta$ -HBA. Ciała ketonowe w moczu pojawiają się ponadto z 2–4-godzinnym opóźnieniem w stosunku do krwi. Wynik badania moczu może więc być negatywny, mimo że istnieje już ketonemia determinowana głównie przez  $\beta$ -HBA, gdyż proporcja  $\beta$ -HBA do Ac-Ac we krwi w tego rodzaju przypadkach może wynosić nawet do 10:1 [18], co świadczy o tym, że rozwijająca się kwasica zależy głównie od wzrostu  $\beta$ -HBA. Oznaczanie  $\beta$ -HBA we krwi jest zatem bardziej przydatne do rozpoznawania ketonemii (i monitorowaniu przebiegu kwasicy ketonowej) niż oznaczenie ciał ketonowych w moczu [20, 28].

Metody oznaczeń ciał ketonowych (enzymatyczne i chromatograficzne), które można znaleźć w piśmiennictwie, stosowane były głównie do badania materiału pobranego od osób żywych [2, 6, 21, 30, 31]. Do ich oznaczania w materiale pobranym ze zwłok opracowano technikę statycznej analizy fazy nadpowierzchniowej w połącze-

niu z chromatografią gazową i detekcją FID po enzymatycznym utlenieniu  $\beta$ -HBA do Ac-Ac, a następnie termicznej dekarboksylacji Ac-Ac do Act [8]. Ze względu na wieloetapowość metoda ta obciążona jest jednak szeregiem wad, a zwłaszcza wąskim zakresem liniowości oraz słabą dokładnością spowodowaną głównie pośrednim oznaczaniem  $\beta$ -HBA.

Celem pracy było więc opracowanie i pełna walidacja takiej szybkiej i prostej metody oznaczania  $\beta$ -HBA i Ac-Ac w materiale (krwi oraz moczu) pobranym ze zwłok, która byłaby odpowiednia dla potrzeb opiniowania o przyczynie zgonu.

## 2. Materiały i metody

### 2.1. Odczynniki

Użyte odczynniki: Acetonitryl Chromasolv (ACN, Riedel-de Haen, Niemcy),  $\beta$ -HBA w postaci soli sodowej, Ac-Ac w postaci soli litowej (Sigma-Aldrich, Niemcy), kwas  $\beta$ -hydroksymasłowy (GHB, Cerilliant, Stany Zjednoczone), kwas  $\beta$ -hydroksymasłowy-D6 (GHB-D6, Cerilliant, Stany Zjednoczone), octan etylu (Merck, Niemcy), N,O-bis(trimetylosililo)trifluoroacetamid z dodatkiem 1% trimetylochlorosilanu (BSTFA +1%TMCS, Sigma-Aldrich, Niemcy), woda dejonizowana uzyskana przy użyciu Milli-Q (Millipore, Stany Zjednoczone).

### 2.2. Materiał biologiczny

Materiał do badań stanowiły:

- 6% albumina wołowa uzyskana przez rozcieńczenie wodą dejonizowaną 30% roztworu (BSA, Sigma-Aldrich, Niemcy), która służyła do określenia warunków oznaczania kwasu  $\beta$ -HBA i Ac-Ac, a także do optymalizacji i walidacji metody;
- 6 próbek krwi i 6 próbek moczu pobranych w trakcie sekcji zwłok 6 osób, które zmarły bezpośrednio po zadziałaniu urazu. Materiał użyto do określenia wydajności ekstrakcji oraz sprawdzenia specyficzności metody.

### 2.3. Ekstrakcja

Do 100  $\mu$ l 6% BSA (a następnie także krwi i moczu) w fiolce typu Eppendorf dodawano 10  $\mu$ l roztworu

wzorca wewnętrznego GHB-D6 do osiągnięcia stężenia 10 g/ml. Próbkę mieszało się za pomocą wytrząsarki typu wortex, po czym w trakcie mieszania dodawano małymi kroplami 200 l ACN i mieszało się jeszcze przez 30 sekund, a następnie odwirowywało się przez 10 minut przy 15 000 rpm. 200 l fazy organicznej przenoszono do insertów i odparowywano do sucha w strumieniu azotu w temperaturze pokojowej. Do tak uzyskanego materiału dodawano 50 l octanu etylu oraz 50 l BSTFA z 1%TMCS i derywatyzowano przez 30 minut w temperaturze 60°C.

#### 2.4. Aparatura i warunki chromatograficzne

Zastosowano chromatograf gazowy Trace GC ULTRA (Thermo Electron, Stany Zjednoczone) z dozownikiem typu *split/splitless* pracującym w temperaturze 280°C, wyposażony w automatyczny podajnik próbek TRIPlus (Thermo Electron, Stany Zjednoczone), sprzężony z kwadrupolowym spektrometrem mas Trace DSQ (Thermo Electron, Stany Zjednoczone). Rozdział chromatograficzny prowadzono na kolumnie kapilarnej typu RXi-5ms (30 m 0,25 mm 0,25 m, Restek, Stany Zjednoczone). Początkowa temperatura pieca (60°C) utrzymywana była przez 0,1 min, po czym wzrastała (7°C/min) do temperatury 90°C utrzymywanej przez 2 min, a następnie (20°C/min) do temperatury 180°C utrzymywanej przez 3 minuty. Temperatura linii transferowej wynosiła 280°C, a źródła jonów 200°C. Detektor mas pracował w trybie dodatkowej jonizacji chemicznej (PCI). Gazem nośnym był hel (1,0 ml/min), a jonizującym metan (2,0 ml/min). Objętość nasytka wynosiła 1 l. Chromatograf gazowy i spektrometr masowy pracowały pod kontrolą programu X-calibur, który wykorzystano również do obróbki danych.

W analizie jakościowej (w trybie *full scan*) rejestrowano pełne widma masowe -HBA, Ac-Ac i GHB-D6 (rycina 1), z których wybrano najintensywniejsze jony do dalszych badań w trybie monitorowania wybranych jonów (SIM). W analizie ilościowej rejestrowano sygnał analityczny pochodzący od jonów: m/z 233 (-HBA), 231 (Ac-Ac) oraz 239 (GHB-D6).

### 3. Wyniki

#### 3.1. Liniowość

Do fiolek z matrycą biologiczną pod postacią 6% roztworu BSA (który zastosowano jako substytut krwi i moczu wolny od związków endogennych, w tym również ciał ketonowych) dodawano -HBA i Ac-Ac w ilości pozwalającej na uzyskanie stężeń: 0,1; 0,2; 0,5; 1; 2; 5; 10; 20 i 50 g/ml. Krzywe kalibracyjne wykreślono na podstawie relacji między polami powierzchni pików dla tych

stężeń -HBA i Ac-Ac a polem powierzchni GHB-D6 o stężeniu 10 g/ml.

Na podstawie 9-punktowych oznaczeń stwierdzono, że opracowana metoda GC-PCI-MS była liniowa w całym zakresie (0,1–50 g/ml), co przedstawia rycina 2. Współczynniki determinacji dla -HBA i Ac-Ac wynosiły przy tym odpowiednio:  $r^2 = 0,9980$  oraz  $r^2 = 0,9948$ .

#### 3.2. Granica wykrywalności i oznaczalności

Granice wykrywalności (*LOD*) i oznaczalności (*LOQ*) były wyznaczone z wykorzystaniem oprogramowania X-calibur w oparciu o algorytm zaproponowany przez producenta aparatu. Granica wykrywalności (*LOD*) dla -HBA wynosiła 0,0005 g/ml, zaś dla Ac-Ac 0,005 g/ml, co odpowiadało stężeniu analitów w przypadku, gdy stosunek sygnału do szumu wynosił 3. Granice oznaczalności (*LOQ*) wynosiły: 0,001 g/ml dla -HBA oraz 0,01 g/ml dla Ac-Ac, co odpowiadało stężeniu analitów w przypadku, gdy stosunek sygnału do szumu był równy 6 (tabela I).

#### 3.3. Precyzja i dokładność

Użyto 2 próbek, w których stężenia -HBA i Ac-Ac w 6% roztworze BSA wynosiły 0,2 g/ml oraz 10 g/ml. Wewnątrzgrupową precyzję i dokładność badano w ciągu jednego dnia w sześciu powtórzeniach, natomiast międzygrupową wyznaczono na podstawie analizy wyżej wymienionych stężeń w trzech powtórzeniach (drugie po upływie 3 dni, a trzecie po upływie 9 dni). Na tej podstawie określono w procentach precyzję metody (jako relację między bezwzględnym odchyleniem standardowym (*SD*) a średnim wyznaczonym stężeniem analitu) i jej dokładność (jako relację między średnim wyznaczonym stężeniem analitu a jego rzeczywistym stężeniem w badanej próbce).

Dokładność i precyzja oznaczeń -HBA i Ac-Ac zawierały się odpowiednio w zakresach 80–115,9% i 3,02–19,89% (wewnątrzgrupowa) oraz 80–112,3% i 10,82–13,16% (międzygrupowa), co wynika z zestawienia w tabeli II.

#### 3.4. Wydajność

Wydajność ekstrakcji oznaczono dla dwóch stężeń -HBA oraz Ac-Ac w 6% BSA (0,2 g/ml i 10 g/ml) przy sześciu powtórzeniach dla każdego z nich. Średni odzysk ciał ketonowych wyznaczono przez porównanie sygnałów analitycznych ekstraktów -HBA oraz Ac-Ac z 6% BSA z sygnałem analitycznym ich metanolowych wzorców o tym samym stężeniu. Ponadto do 100 l każdej z sześciu próbek krwi i sześciu próbek moczu (uzyskanych z 6 zwłok) dodano po 10 l roztworu -HBA i Ac-Ac o stężeniu 100 g/ml i sprawdzono bezwzględną wydajność ekstrakcji tych ciał ketonowych z materiału



„obciążonego” pełną matrycą biologiczną, którą obliczono według wzoru:

$$\%W = \frac{A - B}{C} \cdot 100,$$

gdzie: *A* – sygnał analitu uzyskany z ekstraktu z próbki krwi (lub moczu) z dodatkiem -HBA i Ac-Ac; *B* – sygnał analitu uzyskany z ekstraktu z próbki krwi (lub moczu) bez dodatku -HBA i Ac-Ac; *C* – sygnał analityczny uzyskany z analizy metanолоwych roztworów wzorców -HBA i Ac-Ac o stężeniu 100 g/ml.

Uzyskano wysoką wydajność ekstrakcji -HBA oraz Ac-Ac zarówno z 6% BSA (w zakresie 80–97%), jak i z krwi i moczu (w zakresie 77–90%) (tabela III).

### 3.5. Specyficzność

Weryfikację specyficzności metody przeprowadzono, poddając pełnemu procesowi analitycznemu po dwie próby krwi i moczu z dodatkiem GHB do osiągnięcia stężenia 10 g/ml. Nie stwierdzono wpływu GHB na oznaczanie -HBA i Ac-Ac, co świadczy o dobrej specyficzności metody (rycina 3). Wybór GHB był uzasadniony jego współobecnością we krwi [22] i moczu [17], a także dużą zmiennością stężeń w materiale pośmiertnym. Ponadto -HBA i GHB to izomery konstytucyjne, dające bardzo podobne widma masowe, zatem ich rozróżnienie jest konieczne.

## 4. Dyskusja wyników

Zaproponowana metoda GC-PCI-MS pozwala na szybkie oznaczanie zarówno Ac-Ac, który charakteryzuje się bardzo niską stabilnością w surowicy krwi [11], ale również -HBA, który jest lepszym markerem ketonemii [5, 18, 29]. Nie wykazuje przy tym wad i ograniczeń, którymi obarczone są ilościowe testy stosowane dla potrzeb klinicznych. Z uwagi na znaczny stopień hemolizy i autolizy krwi pobranej ze zwłok, do oceny poziomu ketonemii nie można zastosować gotowych zestawów (np. pozwalających na określenie stężenia NADH powstającego w wyniku utleniania ekwimolarnej ilości Ac-Ac), jak również innych metod opartych na oznaczaniu barwnych produktów reakcji Ac-Ac lub Act, np. z nitroprusydkiem sodu lub chlorkiem żelazowym [9, 10]. Poziom kwasicy ketonowej oznaczony za pomocą tych metod może być ponadto zaniżony, ponieważ nie wykrywają one -HBA bezpośrednio, a ograniczenie postępowania diagnostycznego wyłącznie do oznaczania Ac-Ac i Act uniemożliwia wykrycie tych przypadków, w których ketonemia polega niemal wyłącznie na wzroście stężenia -HBA [4].

## 5. Podsumowanie

Przedstawiona metoda GC-PCI-MS oznaczania ciał ketonowych pozwala na szybkie i równoczesne oznaczanie Ac-Ac oraz -HBA. Jest przy tym techniką specyficzną, odpowiednio dokładną i precyzyjną, a także zapewniającą wysoką wydajność ekstrakcji.

Zastosowana procedura ekstrakcyjna oraz możliwość analizy oznaczanych substancji przy użyciu jonizacji chemicznej, a także monitorowanie wybranych jonów, pozwalają na znaczną redukcję wpływu matrycy biologicznej pochodzącej z materiału pośmiertnego, który jest szczególnie obciążony składnikami wytworzonymi w procesach gnilno-autolitycznych. Ponadto rezultaty walidacji prowadzą do wniosku, że zaproponowana metoda oznaczania ciał ketonowych jest odpowiednia dla oceny poziomu ketonemii i ketonurii.