

УДК 543.544

## ИДЕНТИФИКАЦИЯ МОРФИНА И КОДЕИНА МЕТОДОМ ГАЗОВОЙ ХРОМАТОГРАФИИ-МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ В ХИМИКО-ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ

© 2007 А.В. Воронин, И.Ф. Шаталаев<sup>1</sup>, Т.В. Воеводина<sup>2</sup>, П.П. Пурыгин<sup>3</sup>

Рассмотрены аналитические характеристики методики идентификации морфина и кодеина методом газовой хроматографии-масс-спектрометрии в крови. Предел обнаружения морфина в крови составляет в режиме сканирования 2400,0 нг/мл, в режиме селективного ионного мониторинга 100,0 нг/мл; кодеина — 200,0 и 40,0 нг/мл. Анализ в виде ацетильных и трифторацетильных дериватов позволяет уменьшить величину предела обнаружения при химико-токсикологических исследованиях.

### Введение

В настоящее время широкое распространение в химико-токсикологическом анализе как высокоспецифичный, чувствительный и достаточно экспрессный метод получила газовая хроматография с масс-селективным детектированием (ГХ/МС). По сравнению с прочими хроматографическими методами надежность идентификации наркотических средств, психотропных и лекарственных веществ существенно повышается по причине использования специфической характеристики вещества — масс-спектра, в дополнение к параметрам удерживания, получаемым в хроматографическом процессе [1, 2].

Морфин и кодеин являются основными аналитами в практике судебно-химической экспертизы и освидетельствовании живых лиц на факт употребления опиатов. При исследованиях крови, учитывая наличие в структуре морфина и кодеина полярных гидроксильных групп и их низкие концентрации, наибольшее значение приобретает анализ в виде дериватов, что позволяет улучшить хроматографическое разделение и увеличить чувствительность [3].

Целью настоящего исследования было определение аналитических характеристик методики идентификации морфина и кодеина в крови методом ГХ/МС.

<sup>1</sup>Воронин Александр Васильевич (dimmu2000@mail.ru), Шаталаев Иван Федорович, кафедра химии фармацевтического факультета Самарского государственного медицинского университета, 443099, Россия, г. Самара, ул. Чапаевская, 89.

<sup>2</sup>Воеводина Татьяна Владимировна, Самарское областное бюро судебно-медицинской экспертизы, 443088, Россия, г. Самара, ул. Тухачевского, 51.

<sup>3</sup>Пурыгин Петр Петрович (purygin2002@mail.ru), кафедра органической химии Самарского государственного университета, 443011, Россия, г. Самара, ул. Акад. Павлова, 1.

## 1. Материалы и методы

Для исследований использовали трупную кровь лиц, умерших от механических травм ("холостые" образцы крови). Отобранную кровь замораживали при температуре 18–20°C и хранили в замороженном состоянии до начала анализа.

В качестве стандартных образцов морфина и кодеина использовали их метанольные растворы концентрации 1,0 мг/мл (фирма "Radian"), рекомендованные производителем для приготовления калибровочных растворов при проведении ГХ/МС-анализа.

Пробоподготовку образцов крови осуществляли по следующей методике: 2 мл крови помещали в пробирку с завинчивающейся крышкой вместимостью 15 мл, добавляли 0,5 г натрия тетрабората и выдерживали смесь в течение 5 мин в ультразвуковой ванне. Затем добавляли 8 мл смеси хлороформ — *n*-бутанол (9:1). Смесь встряхивали в течение 5 мин и центрифугировали при 4000 об/мин в течение 5 мин. Органический экстракт отделяли и пропускали через слой безводного натрия сульфата. Выпаривали органический растворитель в токе воздуха при температуре не более 40°C [3].

При исследовании на наличие недериватизованных морфина и кодеина сухой остаток экстракта, эквивалентный 2 мл крови, растворяли в 100 мкл этилацетата. Методом ГХ/МС анализировали 1–2 мкл пробы.

Для получения производных (дериватов) морфина и кодеина использовали 2 способа дериватизации: с использованием уксусного ангидрида — получение ацетил-производных (Ац-дериватов); и с использованием трифторуксусного ангидрида (ТФА) — получение трифторацетил-производных (ТФА-дериватов) [4].

Исследование методом ГХ/МС осуществляли на газовом хроматографе Agilent Technologies 6890 с масс-селективным детектором Agilent Technologies 5973N с использованием кварцевой капиллярной колонки HP5-MS (5% фенил-диметилсилоксан) длиной 30 м, внутренним диаметром 0,25 мм с толщиной пленки неподвижной фазы 0,25 мкм. Режим программирования температуры колонки: начальная температура 170°C (выдержка в течение 1 мин), повышение температуры со скоростью 150°C/мин до 280°C с выдержкой при конечной температуре 5 мин. В качестве газа-носителя использовали гелий; скорость газа-носителя — 1 мл/мин в режиме постоянного потока. Температура инжектора — 280°C, температура аналитического интерфейса — 285°C. Ввод пробы осуществляли с помощью автосамплера в режиме без деления потока со сбросом избытка через 1 мин в отношении потоков 1:15 (split/splitless); объем пробы — 1–2 мкл.

Настройку масс-селективного детектора проводили по стандартному веществу — перфторбутиламину, вводимому непосредственно в масс-спектрометр; использованный режим настройки — "Autotune".

ГХ/МС-анализ исследуемых образцов проводили в режиме сканирования (SCAN), чтобы определить набор характеристических ионов, и в режиме селективного ионного мониторинга (SIM).

**ГХ/МС-анализ в режиме сканирования (SCAN).** Диапазон масс сканируемых ионов — 39–550 а.е.м. Температуру источника ионов и квадрупольного масс-анализатора устанавливали на уровне 230 и 150°C соответственно. "Задержка на растворитель", т.е. время включения катода и масс-анализатора — через 2,5 мин после ввода пробы. Напряжение на умножителе устанавливали на 100 кВ выше напряжения в режиме автоматической настройки "Autotune" [5].

**ГХ/МС-анализ в режиме селективного ионного мониторинга (SIM).**

В режиме SIM регистрировались характеристические ионы анализируемых соединений. В качестве характеристических обязательно выбирали базовый ион масс-спектра и молекулярный ион анализируемого соединения. При отсутствии в масс-спектре интенсивного молекулярного иона в качестве дополнительного к базовому выбирали фрагментарный ион наибольшей интенсивности [6].

Для идентификации аналитов по масс-спектрам использовали электронные библиотеки масс-спектров NIST, PMW Tox 3, Wiley 275 [2, 7, 8].

Для определения пределов обнаружения морфина и кодеина в образцах крови в виде недериватизованных соединений, а также в виде Ац- и ТФА-derivатов готовили контрольные растворы вышеуказанных аналитов с использованием "холостых" образцов и стандартных растворов морфина и кодеина. Приготовленные контрольные растворы морфина и кодеина анализировали методом ГХ/МС по вышеописанной методике в порядке возрастания концентраций от 4 до 5 мкг/мл.

За предел обнаружения принимали минимальную концентрацию контрольного раствора, в котором достоверно обнаруживали целевой аналит по определенному комплексу критериев в зависимости от выбранного режима анализа.

В режиме SCAN использовали комплекс следующих критериев: совпадение времени удерживания на хроматограмме по полному ионному току (с точностью  $\pm 3S_{\bar{x}}$ ) с временем удерживания стандартных образцов; величина коэффициента подобия при оценке масс-спектра, вызванного на вершине хроматографического пика, не менее 90%.

В режиме SIM оценивали совпадение времен удерживания трех характеристических ионов, а также величину ионных отношений (отношение площадей хроматографических пиков характеристических ионов), которая должна составлять  $\pm 20,0\%$  от среднего значения ионных отношений, определенных на стандартных образцах морфина и кодеина.

## 2. Результаты и их обсуждение

Выбор для исследования хроматографических свойств морфина, кодеина, а также их Ац- и ТФА-derivатов неподвижной жидкой фазы — 5% фенил-диметилсилоксана (HP5-MS) обусловлен тем, что данная фаза наиболее часто используется в практике химико-токсикологического анализа на наркотические средства и психотропные вещества в лабораториях экспертных учреждений Российской Федерации.

Использованная методика ГХ/МС-анализа рекомендована Российским центром судебно-медицинской экспертизы для рутинных судебно-химических исследований отравлений опиатами.

Исследование стандартных образцов морфина и кодеина в виде метанольных растворов и в составе контрольных растворов крови показало, что при общем времени анализа, составляющем 14 мин, время удерживания недериватизованных соединений находилось в интервале от 8,00 до 9,00 мин; ТФА-derivатов — 7,50–8,50 мин; Ац-derivатов — 9,00–11,50 мин. На представленной хроматограмме по полному ионному току экстракта контрольного раствора крови, содержащего морфин и кодеин в концентрации 200 нг/мл при исследовании с дериватизацией уксусным ангидридом, хроматографические пики с временами удерживания 9,70 и 10,67 мин соответствуют морфину-2Ац (диацетилморфину) и кодеину-Ац, остальные многочисленные пики принадлежат веществам аналитического фона крови, среди кото-

рых кофеин (5,49 мин), а также компонент полимерных материалов лабораторной посуды — диэтилфталат (6,68 мин) (см. рисунок).

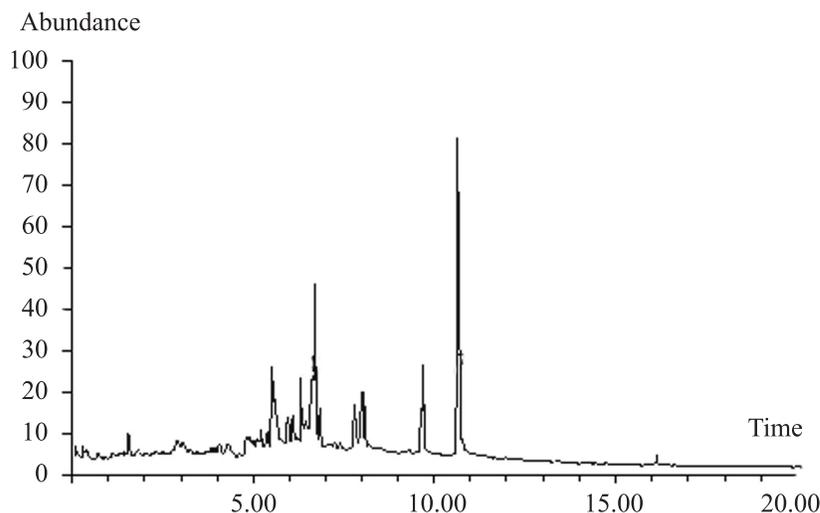


Рис. Хроматограмма по полному ионному току экстракта контрольного раствора крови, содержащего морфин (200 нг/мл) и кодеин (200 нг/мл) при исследовании в виде Ац-derivатов

Результаты определения хроматографических характеристик морфина, кодеина и их дериватов представлены в табл. 1.

Таблица 1

**Хроматографические характеристики морфина, кодеина и их дериватов**

№	Вещество	Время удерживания $t_r$ , мин	Среднеквадратичное отклонение $S_{\bar{x}}$	Коэффициент вариации, %
1	Морфин	8,95	0,573	6,4
2	Кодеин	8,63	0,406	4,7
3	Морфин-2Ац	10,34	0,207	2,0
4	Кодеин-Ац	9,42	0,132	1,4
5	Морфин-2ТФА	7,79	0,070	0,9
6	Кодеин-ТФА	8,11	0,089	1,1

При сравнении величин коэффициентов вариации времени удерживания исследуемых аналитов отмечено, что наиболее стабильные и воспроизводимые результаты были получены при проведении ГХ/МС-анализа морфина и кодеина в виде дериватов — коэффициент вариации не превышал 2,0%; причем для варианта анализа в виде ТФА-производных его значение было близко к 1,0%.

Масс-спектральные характеристики морфина, кодеина и их Ац- и ТФА-производных, полученные при исследовании стандартных образцов, представлены в табл. 2 (ионы расположены по убыванию интенсивности в масс-спектре).

Из полученных масс-спектров стандартных образцов исследуемых аналитов были выбраны пять ионов с  $m/z$  не менее 150, имеющих наибольшие значения интен-

сивности, — характеристические ионы (наиболее информативные ионы). Особенностью масс-спектров морфина, кодеина и их дериватов является наличие достаточно выраженных молекулярных ионов; необходимо отметить, что молекулярные ионы морфина, кодеина и кодеина-Ац имеют максимальные значения интенсивности.

Таблица 2

**Масс-спектральные характеристики морфина, кодеина и их дериватов**

№	Вещество	Mr	Характеристические ионы, m/z				
			285	162	286	268	215
1	Морфин	285	285	162	286	268	215
2	Кодеин	299	299	229	162	283	282
3	Морфин-2Ац	369	327	369	310	268	215
4	Кодеин-Ац	341	341	282	229	342	204
5	Морфин-2ТФА	477	364	380	477	365	311
6	Кодеин-ТФА	395	282	395	396	283	286

Для ГХ/МС-анализа в режиме SIM из определенного перечня характеристических ионов выбирали три иона — базовый и подтверждающие; условиями отбора были высокие значения интенсивности и отсутствие в масс-спектрах других исследуемых аналитов ионов с аналогичным значением m/z. Так как морфин, кодеин и их дериваты имеют в масс-спектрах молекулярные ионы, их включение в перечень ионов для анализа в режиме SIM было обязательным (табл. 3).

Таблица 3

**Ионные отношения в масс-спектрах морфина, кодеина и их дериватов**

№	Вещество	m/z ионов	Величина ионного соотношения, %
1	Морфин	286/285	24,0
		268/285	16,0
2	Кодеин	229/299	28,0
		283/299	12,0
3	Морфин-2Ац	369/327	68,0
		310/327	38,0
4	Кодеин-Ац	282/341	86,0
		229/341	32,0
5	Морфин-2ТФА	380/364	84,0
		477/364	50,0
6	Кодеин-ТФА	395/282	74,0
		396/282	24,0

При химико-токсикологических исследованиях крови, реализуемых в рамках судебно-химической экспертизы, а также при освидетельствовании живых лиц на факт употребления наркотических средств и психотропных веществ наличие данных о величине предела обнаружения исследуемого аналита является одним из основных факторов, обеспечивающих достоверность полученного результата.

Пределы обнаружения морфина и кодеина определяли в модельных опытах с использованием контрольных растворов крови как в виде недериватизованных соединений, так и в формах Ац- и ТФА-дериватов в режимах SCAN и SIM (табл. 4).

Таблица 4

**Пределы обнаружения морфина и кодеина в крови методом ГХ/МС**

Вещество	Предел обнаружения, нг/мл					
	Недериватизованные		Ац-производные		ТФА-производные	
	SCAN	SIM	SCAN	SIM	SCAN	SIM
Морфин	2400,0	100,0	100,0	20,0	240,0	10,0
Кодеин	200,0	40,0	100,0	14,0	100,0	10,0

Предел обнаружения в образцах крови в режиме SCAN составляет: для морфина — 2400,0 нг/мл; для кодеина — 200,0 нг/мл. При использовании режима SIM предел обнаружения уменьшается: для морфина в 24 раза — 100,0 нг/мл; для кодеина в 5 раз — 40,0 нг/мл. Влияние веществ аналитического фона при обнаружении указанных концентраций аналитов не наблюдается.

После дериватизации обоими вышеуказанными способами предел обнаружения опиатов при исследовании в режимах SCAN и SIM существенно уменьшается (в частности, для морфина).

Для морфина при использовании дериватизации уксусным ангидридом отмечается наибольшее уменьшение предела обнаружения в режиме SCAN — в 24 раза, т.е. до 100,0 нг/мл, что соответствует пределу обнаружения в режиме SIM недериватизованного морфина. При анализе морфина в виде ТФА-derivата (режим SCAN) предел обнаружения снижается в 10 раз — до уровня 240,0 нг/мл.

Способ дериватизации кодеина не оказывает влияния на величину предела обнаружения при анализе в режиме SCAN.

При исследовании в режиме SIM морфина в виде Ац-derivата его предел обнаружения в крови уменьшается в 5 раз, в виде ТФА-derivата — в 10 раз; для кодеина наблюдается приблизительно одинаковое снижение пределов обнаружения до 14,0 и 10,0 нг/мл для Ац- и ТФА-derivатов соответственно.

ГХ/МС-исследование в режиме SIM позволяет значительно понизить пределы обнаружения морфина и кодеина, однако в данном режиме надежность идентификации снижается вследствие использования ограниченного числа ионов, а не полного масс-спектра.

При исследовании крови на опиаты без стадии дериватизации, в частности на морфин в режиме SCAN, пределы обнаружения имеют достаточно высокие значения, находятся на уровне летальных концентраций (для морфина 2400,0 нг/мл), что крайне редко встречается в практике судебно-химической экспертизы при исследовании трупной крови. Таким образом, проведение в рамках химико-токсикологической экспертизы ГХ/МС-анализа крови на опиаты без дериватизации последних ТФА или уксусным ангидридом является нецелесообразным.

## Заключение

Таким образом, в результате проведенных исследований определены времена удерживания морфина, кодеина и их Ац-, ТФА-derivатов на 5% фенил-диметилсилоксане. Показано, что наиболее воспроизводимы результаты ГХ/МС-анализа в виде derivатов по сравнению с недериватизованными опиатами — значение коэффициента вариации времени удерживания не превышало 2,0%; установлены величины ионных отношений наиболее интенсивных характеристических ионов масс-спектра.

Пределы обнаружения морфина в крови в недериватизованном виде, в форме Ац- и ТФА-derivатов составили соответственно в режиме сканирования (SCAN), — 2400,0, 100,0 и 240,0 нг/мл; в режиме селективного ионного мониторинга (SIM) — 100,0, 20,0 и 10,0 нг/мл; аналогичные показатели для кодеина составили: 200,0, 100,0 и 100,0 нг/мл, а также 40,0, 14,0 и 10,0 нг/мл.

Дериватизация морфина и кодеина уксусным и трифторуксусным ангидридами позволяет обнаруживать их на уровне терапевтических концентраций и использовать данный вариант пробоподготовки в ГХ/МС-анализе при проведении судебно-химической экспертизы и освидетельствовании живых лиц по факту медицинского применения опиатов.

## Литература

- [1] Еремин, С.К. Анализ наркотических средств / С.К.Еремин, Б.Н.Изотов, Н.В.Веселовская. — М.: Мысль, 1993. — 25 с.
- [2] Maurer, H.H. Systematic toxicology analysis of drugs and their metabolites by gas chromatography-mass spectrometry / H.H.Maurer // J. Chromatogr. — 1992. — V. 580. — P. 3–41.
- [3] Мелентьев, А.Б. Определение морфина и кодеина в крови в виде их пропионовых эфиров методом газовой хроматографии-масс-спектрометрии / А.Б.Мелентьев // Журн. аналит. химии. — 2004. — Т. 59. — №6. — С. 637–641.
- [4] Дериватизация в ГХ/МС-анализе лекарственных и наркотических веществ, имеющих токсикологическое значение: матер. к сем-ру судеб.-мед. экспертов. — М.: Рос. Центр судеб.-мед. экспертизы; Бюро судеб.-мед. экспертизы МЗ МО., 2002. — 86 с.
- [5] Мелентьев, А.Б. Практическое руководство по скринингу лекарственных, наркотических веществ и их метаболитов методом газовой хроматографии с масс-селективным детектором для целей судебной токсикологии / А.Б.Мелентьев. — Челябинск, 2001. — Ч. 1. — 62 с.
- [6] Симонов, Е.А. Наркотики: методы анализа на коже, в ее придатках и выделениях / Е.А.Симонов, Б.Н.Изотов, А.В.Фесенко. — М.: Анахарсис, 2000. — 130 с.
- [7] Обнаружение морфина, кодеина и диацетилморфина (героина) при судебно-химическом исследовании трупной крови: пособие для врачей судеб.-мед. экспертов-химиков / Е.М.Саломатин [и др.]. — М., 2005. — 35 с.
- [8] Вершинин, В.И. Компьютерная идентификация органических соединений / В.И.Вершинин, Б.Г.Дерендяев, К.С.Лебедев. — М.: Академкнига, 2002. — 197 с.

Поступила в редакцию 13/ХII/2006;  
в окончательном варианте — 13/ХII/2006.

## GAS-CHROMATOGRAPHY-MASS-SPECTROMETRY IDENTIFICATION OF MORPHINE AND CODEINE IN FORENSIC CHEMICAL ANALYSIS

© 2007 A.V. Voronin, I.F. Shatalaev<sup>4</sup> T.V. Voevodina<sup>5</sup> P.P. Purygin<sup>6</sup>

Analytical characteristics of gas-chromatography-mass-spectrometry identification procedure of morphine and codeine in blood are considered. The detection limit for morphine in blood were 2400,0 ng/mL under total ion current conditions and 100,0 ng/mL under selected ion monitoring conditions; for codeine—200,0 and 40,0 ng/mL respectively. The detection limit of morphine and codeine as acetic and trifluoroacetic derivatives in forensic chemical analysis is lower.

Paper received 13/*XII*/2006.

Paper accepted 13/*XII*/2006.

---

<sup>4</sup>Voronin Alexander Vasilievich ([dimmu2000@mail.ru](mailto:dimmu2000@mail.ru)), Shatalaev Ivan Fedorovich, Dept. of Pharmaceutical Faculty Chemistry, Samara State Medical University, Samara, 443099, Russia.

<sup>5</sup>Voevodina Tat'yana Vladimirovna, Samara State Forensic Medical Examination Bureau, Samara, 443001, Russia.

<sup>6</sup>Purygin Pyotr Petrovich ([purygin2002@mail.ru](mailto:purygin2002@mail.ru)), Dept. of Organic Chemistry, Samara State University, Samara, 443011, Russia.