

# ОРИГИНАЛЬНАЯ СТАТЬЯ

## ХРОМАТО-МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОПИЙНЫХ НАРКОТИЧЕСКИХ СРЕДСТВ В ТРУПНОМ БИОЛОГИЧЕСКОМ МАТЕРИАЛЕ

### GC-MS DETERMINATION OPIATE IN A CADAVERIC BIOLOGICAL MATERIAL

**В.А. Мищихин<sup>1,2\*</sup>, В.М. Смирнов<sup>1</sup>, А.А. Волков<sup>1,2</sup>, Е.А. Сальникова<sup>1</sup>  
V.A. Mishchikhin<sup>1,2\*</sup>, V.M. Smirnov<sup>1</sup>, A.A. Volkov<sup>1,2</sup>, E.A. Salnikova<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Бюро СМЭ департамента здравоохранения г. Москвы

<sup>2</sup> ГОУ ВПО ММА им. И.М. Сеченова, кафедра токсикологической химии.

<sup>1</sup> Bureau of Medicolegal Examination of Moscow Department of Public Health Care

<sup>2</sup> I.M. Sechenov Moscow Medical Academy, Department of Toxicological Chemistry.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** опиаты, хромато-масс-спектрометрия, калибровка, дериватизация, идентификация.

**KEYWORDS:** opiate narcotics, gas chromatography-mass-spectrometry, calibration, derivatization, identification.

**РЕЗЮМЕ:** Предложена методика определения опиатов в виде триметилсилильных производных в трупном биологическом материале с использованием хромато-масс-спектрометрического метода анализа. Показано, что методика позволяет анализировать извлечение из печени, почек, крови и мочи без дополнительной очистки. Проведена модификация методики, которая позволяет сохранить чувствительность масс-селективного детектора и повысить надежность идентификации и определения опиатов.

Методика применялась в практической экспертной работе Московского Бюро судебно-медицинской экспертизы в течение последних 14 лет. При этом наряду с опиатами было обнаружено много других наркотических и лекарственных средств. В первом этапе используются методики, которые позволяют провести скрининг на наркотические и лекарственные средства – методами тонкослойной хроматографии, ультрафиолетовый спектроскопии, а также с помощью системы экстренной лекарственной диагностики, которая основана на использовании метода высокоэффективной жидкостной хроматографии (исследуется только моча), – а затем все возможно положительные экспертизы на опиаты подтверждаются методом ГХ-МС с последующим количественным определением. Количественное определение других наркотических и лекарственных средств проводится методом газожидкостной хроматографии на пламенно-ионизационном детекторе.

Практический опыт показал, что методика с использованием ГХ-МС позволяет наряду с опиатами идентифицировать или надежно подтверждать с достаточной достоверностью в трупном биоматериале и другие наркотические и лекарственные средства.

**SUMMARY:** A method for measuring opiate in cadaveric biological material by gas chromatography-mass-spectrometry (GC-MS) as a trimethylsilyl derivative is proposed. It is shown, that this method is applicable to analyze extraction from liver, kidneys, blood or urine without additional clearing. Updating of the technique is carried out in order to preserve of sensitivity of the weight - selective detector and increase reliability of identification and definition of opiate.

The technique was applied in practical expert work of the Moscow Bureau of Medicolegal Examination within last 14 years. The circuit of realization of researches on opiate both other narcotic and medical products was developed. At the first stage chemical techniques which allow carrying out scrining on narcotic and medicinal means – a method of thin-layer chromatography, ultra-violet spectroscopy are used, the system of emergency medicinal diagnostics applied is based on a method of highly effective liquid chromatography (it is investigated only wetting), then all presumably positive examinations on opiate are to be verities by GC-MS with subsequent quantitative definition. Quantitative definition of other narcotic and medical products will be carried out by gas chromatography on flame-ionization detector.

Practical experience has shown, that technique GC-MS allows alongside with opiate to identify or reliably confirm presence of other narcotic and medical products in cadaveric material.

\*Адрес для переписки:

Мищихин Виктор Алексеевич  
121019 Россия, г. Москва, Никитский бульвар д.13  
ММА им. И.М. Сеченова, кафедра токсикологической химии

За последние годы в Бюро СМЭ ДЗ г.Москвы значительно увеличилось количество экспертных случаев, в которых установлена причина смерти от передозировки наркотическими средствами (Солохин и др., 2002).

Нами апробирована и использована на практике хромато-масс-спектрометрическая (ГХ-МС) методика определения опиатов в крови, моче и внутренних органах трупа (Nakamura, Way, 1975). Наш практический опыт подтвердил, что надежное определение морфина и его производных возможно только после предварительной их дериватизации (Мищенко и др., 1999).

При многолетнем использовании эта методика модифицировалась с целью повышения надежности определения и сохранения чувствительности масс-селективного детектора.

Подготовка извлечений из крови, мочи, внутренних органов проводится по модифицированной сотрудниками химического отделения Бюро методике изолирования с предварительным солянокислым гидролизом (Саломатин и др., 1998).

Аликвота извлечения упаривается досуха, с помощью метанола количественно переносится в пробирку емкостью 1,5 мл с крышкой, добавляется 10 мкл внешнего стандарта налорфина (в качестве внешнего стандарта нами предложен также атропин, который был апробирован на затравках печени). К упаренному досуха током теплого азота (50°C) остатку добавляется 50 мкл реактива БСА – (бистриметилсилилацетамид), реакционная смесь тщательно встряхивается на вортексе, центрифугируется 5 минут (6000 об/мин), из надосадочной жидкости отбирается 1 мкл пробы (без пузырьков воздуха) и вводится в испаритель хроматографа (в течение 0,5 минуты введенная в испаритель проба потоком газа-носителя гелия переносится в хроматографическую колонку, затем включается режим продувки лайнера). Микрошприц после ввода пробы промывается раствором ацетон:хлороформ:метанол (1:1:1). Через 1 минуту после ввода анализируемой пробы в испаритель хроматографа вводится 1,5 мкл реактива БСА (с целью промывки лайнера от высококипящих примесей).

Исследование проводится на газовом хроматографе HP 5890 с масс-селективным детектором HP 5971A. Кварцевая капиллярная колонка, 25 м × 0,2 мм (привитая 5% фенилметилсиликоновая фаза с толщиной пленки 0,33 мкм). Скорость потока газа-носителя гелия 0,5 мл/мин, без сброса. Температура термостата колонок – начальная 70°C (2 мин), программирование со скоростью 20°C/мин, конечная температура 280°C (27,5 мин), температура термостата испарителя, детектора и интерфейса – 280°C. За время анализа – 40 минут – фон колонки практически возвращается к первоначальному. Для сохранения филамента от перегорания и увеличения продолжительности работы детектор включается через 11,0 мин после ввода пробы. Идентификация наблюдаемых на хроматограммах пиков осуществляется с помощью библиотек масс-спектров Wiley, PMW TOXR.

Нелетучие остатки исследуемых проб задерживаются на специальной вставке в испарителе хроматографа – лайнере, который по мере загрязнения заменяется на новый.

Загрязненные лайнеры заливаются раствором концентрированной серной кислоты с перекисью водорода (1:1), а затем промываются с помощью водоструйного насоса раствором аммиака, дистиллированной водой, ацетоном, гексаном, высушиваются током воздуха. Лайнер заполняется дезактивированной стекловатой, во вновь установленный в испаритель хроматографа лайнер с целью его тренировки несколько раз прокалывается реактив БСА (по 1,5 мкл).

Для количественного определения использовали метод калибровки по площадям молекулярного иона определяемого вещества и внешнего стандарта (429 а.е.м. – морфин 2 ТМС, 371 а.е.м. – кодеин ТМС, 455 а.е.м. – налорфин 2ТМС, 361 а.е.м. – атропин ТМС).

Калибровка проводится непосредственно перед исследованием экспертных образцов. С этой целью предварительно проверяется фон – вводится 1 мкл реактива БСА, затем стандартные растворы морфина с внешним стандартом по вышеприведенной методике (0,1-0,2 мг/мл). При этом соответствие масс-спектра морфина с библиотечным масс-спектром должно составлять 90-99%, в противном случае необходимо провести комплекс мероприятий (вплоть до чистки масс-селективного детектора) с целью вывода прибора на рабочий режим.

По этой методике анализировались извлечения из крови, мочи, печени, почки без какой-либо дополнительной очистки в течение последних 10 лет. Диапазон определяемых концентраций морфина составил: 0,002-0,600 мг% (кровь); 0,002-10,760 мг% (моча); 0,001-0,460 мг% (печень); 0,001-0,390 мг% (почка). При этом в нескольких случаях помимо морфина были идентифицированы кодеин, ацетилкодеин, метилкодеин, гидроморфон, 6-моноацетилморфин. Героин идентифицирован только в вещественных доказательствах (порошки, шприцы, посуда). В целом ряде случаев при отрицательных результатах в крови и моче морфин был обнаружен в печени, почке или желудке.

В 1999 году было отмечено максимальное количество положительных анализов (1004), выполненных с использованием ГХ-МС методики, в которых обнаружены наркотические средства (морфин и его производные), в том числе: морфин – 908; героин – 4; 6-моноацетилморфин – 12; кодеин – 79, метилкодеин – 151, ацетилкодеин – 3.

Метод ГХ-МС обычно применяется нами с целью подтверждения положительных результатов, полученных при судебно-химическом исследовании – скрининге методами ТСХ и ВЭЖХ на экспертной системе BIO-RAD REMEDI (Волков А.А., 1999).

Так, на судебно-химическое исследование поступили кровь, моча и внутренние органы от трупа Л., 22 лет. Из обстоятельств дела известно, что тр. гр. Л. обнаружен в «доме туриста», в направлении

на судебно-химическую экспертизу дается задание – провести исследование на наркотики, снотворные, транквилизаторы.

При скрининге методом ВЭЖХ на экспертной системе BIO-RAD REMEDI в 1 мл мочи были идентифицированы и определены: морфин – 0,11 мг%, кодеин – 0,06 мг%, метадон – 0,44 мг%.

Скрининг проводился также методом ТСХ, исследовались щелочные хлороформные извлечения (после предварительного изолирования подкисленной водой) и щелочные хлороформно-бутанольные извлечения (после солянокислого гидролиза). В хлороформных извлечениях (pH 10-11) из крови, печени, почек, желудка идентифицирован метадон с Rf 0,75, пятно слабой интенсивности розово-оранжевого цвета, проявитель – реактив Драгендорфа (по Шталю) и 0,05 н. раствор серной кислоты, 6 н раствор соляной кислоты (в системе 1 – этилацетат-хлороформ-25% аммиак – 85:10:5).

При исследовании щелочных хлороформно-бутанольных извлечений из крови, мочи, печени, почки после солянокислого гидролиза получены следующие результаты (система 2 – этилацетат-метанол-25% аммиак 85:10:5): при проявлении реактивом Марки наблюдались пятна с Rf 0,25 – красно-фиолетовое – морфин (в крови, моче), Rf 0,45 – фиолетовое – кодеин (в крови – нет, в моче – слабой интенсивности), Rf 0,65 – розовато-сиреневатое – метадон (в крови – слабой интенсивности, в моче – интенсивное). В извлечениях из печени и почки наблюдались пятна очень слабой интенсивности с Rf 0,25 и 0,65.

Использовалась также методика изолирования метадона из желудка, печени и почки ацетонитрилом после подкисления соляной кислотой (pH 2-3) с последующей экстракцией эфиром при pH 11-12. В системе 1 во всех извлечениях идентифицировано пятно метадона с Rf 0,75 – буроватого цвета (проявитель – 0,3М раствор сульфата меди, подкисленного концентрированной серной кислотой, и 0,3М раствор иодида калия). В системе 2 – пятно метадона с Rf 0,65 – розовато-сиреневатого цвета (реактив Марки).

Далее с целью подтверждения полученных результатов проведено исследование методом ГХ-МС по вышеприведенной методике извлечений из крови, и мягких тканей с места укола (после солянокислого гидролиза).

На рисунке 1 приведена хроматограмма извлечения из крови (в режиме SCAN). На хроматограмме идентифицированы пики: 11,24 мин – метадон (87%), 11,68 мин – атропин ТМС, 12,94 мин – морфин 2 ТМС (92%).

Хроматограмма в режиме SIM (рис.2) представлена пиками молекулярных ионов – метадон – 309 а.е.м., атропин ТМС – 361 а.е.м., морфин 2 ТМС – 429 а.е.м.

На рисунках 3 и 4 приведены масс-спектры морфина и метадона.

Количество морфина в крови рассчитывалось по формуле:

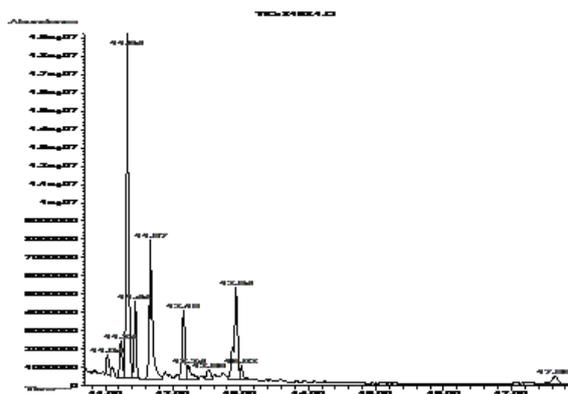


Рис. 1. Хроматограмма извлечения из крови (SCAN): метадон - 11,24 мин., атропин ТМС - 11,67 мин., морфин 2 ТМС - 12,94 мин.

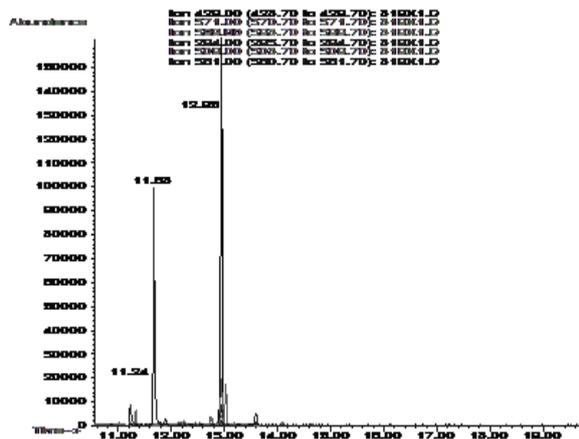


Рис. 2. Хроматограмма извлечения из крови (SIM): метадон (309 а.е.м.) - 11,24 мин, атропин ТМС (361 а.е.м.) - 11,68 мин., морфин 2 ТМС (429 а.е.м.) - 12,95 мин.

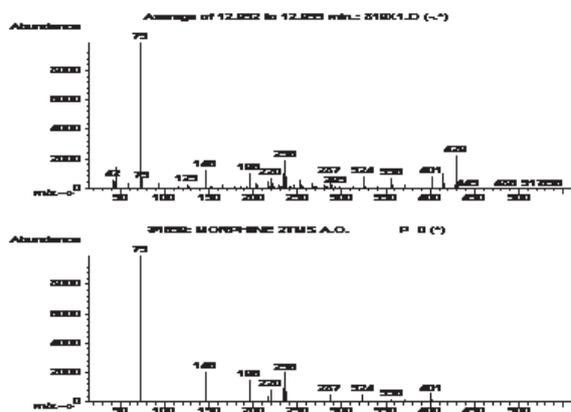


Рис. 3. Масс-спектры морфина 2 ТМС: верхний – масс-спектр пика морфина 2 ТМС в исследуемой крови; нижний – масс-спектр морфина 2 ТМС из библиотеки WILEY L. (Match Quality : 92)

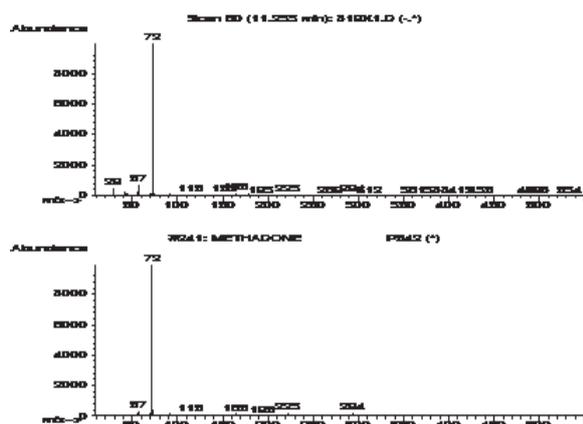


Рис. 4. Масс-спектры метадона: верхний – масс-спектр пика метадона в исследуемой крови; нижний – масс-спектр метадона из библиотеки WILEY L. (Match Quality: 87)

$$X = \frac{Sx/S_{BB} \times V1 \times V3 \times C_{CC} \times 100}{S_{CC}/S_{BB} \times V2 \times P}$$

Где

Sx – площадь пика морфина в исследуемом извлечении из крови,

S<sub>BB</sub> – площадь пика внешнего стандарта,

S<sub>CC</sub> – площадь пика стандартного раствора морфина,

C<sub>CC</sub> – концентрация стандартного раствора морфина (в мг/мл),

V1 – объем реагента ВСА, в котором растворялось упаренная аликвота извлечения из крови (0,05 мл),

V2 – объем извлечения, взятый на анализ ГХ-МС (25 мл),

V3 – общий объем извлечения из крови (50 мл),

P – навеска крови (10 г).

Пик кодеина в извлечении из крови на хроматограммах в режимах SCAN и SIM (по молекулярному иону 371 а.е.м.) не наблюдался. В извлечении из мягких тканей с места укола (1,5 г) морфина и его производных, а также метадона, не обнаружено.

В связи с большой нагрузкой методом ГХ-МС проводятся исследования обычно одного объекта (кровь, моча, мягкие ткани с места укола, печень или почка). Поэтому параллельно методом газожидкостной хроматографии проводится количественное определение лекарственных и наркотических средств (кроме опиатов) во всех других объектах. Условия анализа: газовый хроматограф HP 5890 с пламенно-ионизационным детектором, кварцевая капиллярная колонка, 25 м × 0,2 мм (привитая 5% фенилметилсиликоновая фаза с толщиной пленки 0,33 мкм). Температура термостата колонок: начальная – 50°C (2 мин), программирование – 30°C/мин до 200°C, затем – 3°C/мин – до 280°C. Температура испарителя – 280°C, детектора – 200°C. Скорость потока газа-носителя гелия – 0,5 мл/мин (без деления потока), водорода – 40 мл/мин, воздуха – 400 мл/мин. Упаренные аликвоты щелочных извлечений растворялись в 0,3 мл этилового спирта (V1), добавлялись

30 мкл внешнего стандарта анестезина (2,5 мг/мл), 1 мкл раствора вводился в испаритель хроматографа. На полученных хроматограммах в извлечениях из крови, желудка, печени и почки наблюдались пики, совпадающие по временам удерживания с пиком метадона – 20,95 мин ( время удерживания анестезина – 11,57 мин).

Количество метадона в крови, желудке, печени и почке рассчитывалось по вышеприведенной формуле. При этом определено метадона: в крови – 0,003 мг%, в желудке – 0,11 мг%, в печени – 0,11 мг%, в почке – 0,04 мг%. Летальные концентрации морфина в крови – 0,005-0,4 мг%, метадона – свыше 0,4 мг% (Uges, 1996).

Таким образом, хромато-масс-спектрометрическая методика определения опиатов позволяет наряду с ними обнаруживать или подтверждать в исследуемых объектах из трупного биоматериала наличие и многих других наркотических и лекарственных средств (с 1991 года было идентифицировано более 70 соединений), а в комплексе с предварительными химическими методиками (ТСХ – скрининг, УФ-спектроскопия), системой BIO-RAD REMEDI и газохроматографическими методиками количественного определения позволяет сделать экспертизу отравлений наркотическими и лекарственными средствами достаточно надежной и достоверной

## Литература.

- Волков А.А. 1999. Использование экспертной системы "Bio-rad remedi HS drug profiling system" в судебно-химическом анализе // Судебно-медицинская экспертиза. №2. С.27-28.
- Мицихин В.А., Панов В.А., Смирнов В.М., Лаврешин А.Н. 1999. Хромато-масс-спектрометрическое определение наркотических средств в трупном биологическом материале. Современные проблемы химико-токсикологического анализа наркотических средств. СПб. С.20-23.
- Саломатин Е.М., Барцев А.И., Воронова Н.В., Кошелев А.С., Красилова Е.В., Медников В.М., Николаева О.О., Родионова В.С., Симонова Н.С., Степанов Ю.В. 1998. // Судебно-медицинская экспертиза. №6. С.26-31.
- Солохин Е.В., Каниболоцкий А.А., Чернолихова И.А., Лаптева М.И., Потемкин А.М. 2002. Отравление опиатами (анализ секционного материала). // Судебно-медицинская экспертиза. №2. С.32-35.
- Терапевтические, токсические и летальные концентрации лекарственных и других химических веществ. Международная ассоциация судебных токсикологов. Том 26, № 1, дополнение, 1996. Под редакцией Donald R.A. Uges, University Hospital Groningen, The Netherlands.
- Nakamura G.R., Way E.L. 1975. Determination of morphine and codeine in post-mortem specimens // Analytical Chemistry. Vol.47. P.775-8.