

V. Dufey, L. Dujourdy, F. Bescier, H. Chaudron

Szybka i zautomatyzowana metoda profilowania próbek heroiny do celów taktyczno-operacyjnych

Forensic Science International 2007, nr 169, s. 108–117

Prowadzenie badań porównawczych próbek heroiny nie jest zjawiskiem nowym; już od początku lat 80. ubiegłego wieku tematyce tej poświęcano wiele opracowań [1–4]. Większość metod profilowania służących scharakteryzowaniu heroiny bazującej na narkotynie i związkach norlaudanozyny opracował Allen i wsp. [5]. Między metodami istnieje jednak wiele niezgodności, np. odnośnie do wymogu dysponowania dość dużą ilością materiału (15 mg czystej diamorfiny – dla heroiny o czystości 10% potrzeba 150 mg proszku), co jest istotne w przypadku bardzo rozcieńczonych próbek heroiny. Wspomniana technika wymaga ponadto dobrego przygotowania zawodowego. Jest ono niezbędne do prawidłowego wykonania etapu izolacji i przeprowadzenia dość żmudnej procedury przygotowania próbek (konieczność odwirowania i odparowania).

W ostatnich latach zarówno Gueniat, jak i Esseiva wprowadzili opcjonalną metodę profilowania, która opiera się na charakterystyce składników głównych [6] i w przeciwieństwie do metody wcześniej stosowanej nie wymaga przygotowania próbek.

Laboratorium kryminalistyczne Policji francuskiej w Lyonie od ponad dziesięciu lat stosowało – jako rutynową metodę badawczą – analizę zanieczyszczeń. Do badań porównawczych próbek heroiny wykorzystywano obliczenia odległości Euklidesowej.

Od roku 1994 obserwuje się obniżanie stopnia czystości próbek skonfiskowanej heroiny ulicznej; przykładowo – w 2004 r. poziom czystości mieścił się w zakresie 5–10%; w tym samym roku 65% próbek heroiny poddanych analizie w pięciu policyjnych laboratoriach we Francji charakteryzowało się czystością poniżej 10% [7]. W związku z tym wykorzystanie ww. metody, zwłaszcza w przypadku próbek heroiny ulicznej, stało się bardziej problematyczne – aby móc zastosować analizę zanieczyszczeń, należy bowiem dysponować 15 mg czystej diamorfiny. Jeśli zatem posiada się niewielką ilość heroiny o czystości 4%, należy odważyć 375 mg proszku, co często jest niemożliwe.

W 2003 r. podjęto próbę zmodyfikowania stosowanej w laboratorium francuskim tzw. standardowej procedury operacyjnej (*standard operating procedure*, w skr. SOP) i przystosowania jej do badań porównawczych heroiny. Metoda miała spełniać następujące założenia:

- analiza w krótkim czasie;
- możliwość przeanalizowania nawet niewielkich próbek heroiny bez względu na ich stopień czystości;
- automatyzacja analizy, transferu danych i obliczeń korelacji;
- umożliwienie przechowania danych w dedykowanej bazie danych.

Aby spełnić ww. założenia postanowiono wykorzystać metodę analizy składników głównych, która jest od lat stosowana w Szwajcarii.

Materiały i metody

Metoda analizy mniejszych składników

Przygotowanie próbek. Próbkę heroiny (ok. 1 g) należy poddać homogenizacji w moździerzu agatowym, następnie zaś, po odważeniu 15 mg czystej zasady diamorfiny, umieścić w kolbie o pojemności 30 ml. W kolejnym etapie heroinę rozpuszcza się w 5 ml 0,5 M H_2SO_4 , po czym dodaje 5 ml toluenu. Próbkę należy następnie wstrząsnąć i odwirować. Po usunięciu 4 ml fazy organicznej – w celu uzyskania suchej masy – substancję przelewa się do fiolki i poddaje odparowaniu. Po dodaniu 200 μ l chloroformu całość dozuje się do GC.

Metoda analizy składników głównych

Przygotowanie próbek. Próbkę heroiny (ok. 1 g) należy poddać homogenizacji w moździerzu agatowym. Piętnaście miligramów heroiny umieszcza się w fiolce. Próbkę rozpuszcza się następnie w mieszaninie chloroformu i pirydyny w proporcji 5:1, dodaje do niej 100 μ l MSTFA, podgrzewa przez godzinę w temperaturze 80°C i dozuje do GC.

Detekcja płomieniowo-jonizacyjna chromatografii gazowej (GC/FID)

Analizę składników mniejszych i głównych przeprowadzono na chromatografie gazowej firmy Agilent 6850 wyposażonym w detektor FID i autosampler. Dokonano nastrzyku próbek o objętości 2 µl w trybie split, w wyniku czego uzyskano rozdział chromatograficzny na kolumnie kapilarnej J&W DB-1 (długość kolumny: 30 m, średnica wewnętrzna: 0,25 mm, grubość błony: 0,25 µm). Zastosowano gaz nośny – hel, przy czym prędkość przepływu gazu wynosiła 1,4 ml/min.

Temperaturę kolumny zaprogramowano w następujący sposób:

- zanieczyszczenia: temp. 200°C przez 1 minutę, 4°C/min przyrost do 280°C, następnie 5°C/min przyrost do 300°C – przez 13 minut.
- składniki główne: temp. 150°C przez 1 minutę, 10°C/min przyrost do 250°C, następnie 4°C/min przyrost do 300°C – przez 4 minuty.

Temperaturę nastrzyku i detektora ustawiono odpowiednio na 280 i 300°C dla zanieczyszczeń oraz 290 i 325°C dla składników głównych. Uzyskane chromatogramy przedstawiono na rycinach 1 i 2.

Ocena i przechowywanie danych

Na etapie analizy zanieczyszczeń skoncentrowano się na różnicach między próbkami. Aby te różnice podkreślić, wykorzystano metodę obliczania odległości Euklidesowej. Podczas analizy składników głównych skoncentrowano się na wykazaniu podobieństw między nową próbką dowodową a próbkami porównawczymi (tzw. listą kandydatów) przechowywanymi w bazie danych. W tym celu skorzystano z pomiarów kąta funkcji cosinus [8]. Za każdym razem przeprowadzano normalizację ze zsumowaniem powierzchni pików dla zanieczyszczeń oraz powierzchni pików diamorfiny w przypadku analizy składników głównych.

Bazę danych składników głównych utworzono na serwerze sieciowym Apache z wykorzystaniem oprogramowania PHP i bazy typu open source MySQL.

Dla każdej próbki heroiny uzyskano profil chromatograficzny GC-FID, który został automatycznie przesłany poprzez wybór odpowiedniego katalogu danych w menu bazy danych. Następnie obliczono wyniki korelacji między próbką dowodową a całą bazą danych i wytypowano tzw. listę trafileń „hitów”.

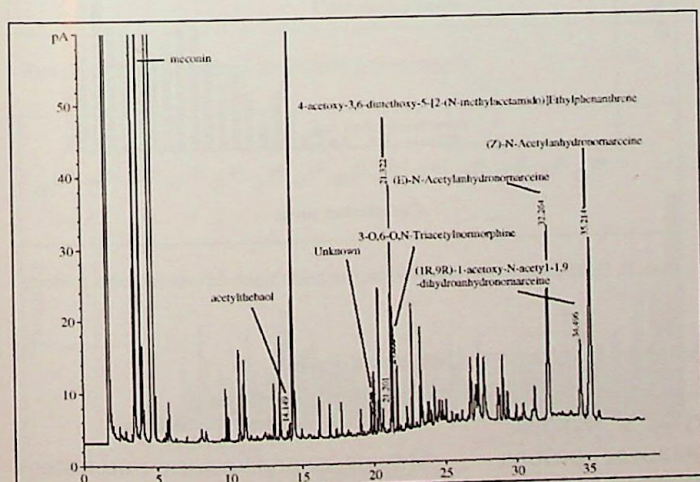
Wyniki i omówienie

Optymalizacja metody

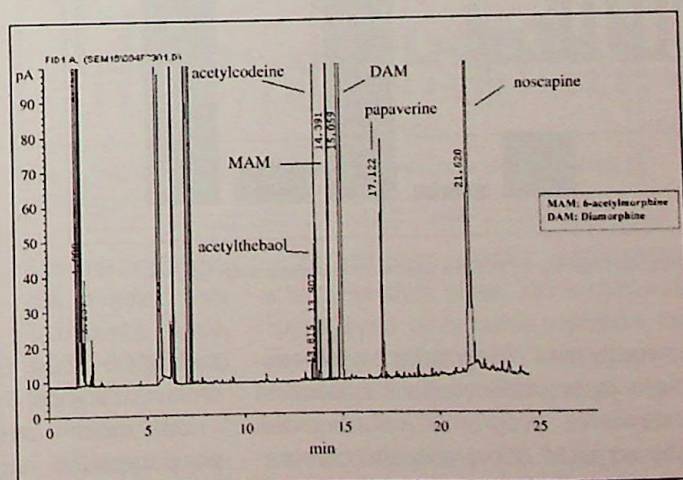
Jako że metodę przystosowano do analizy próbek szwajcarskich należało sprawdzić, czy próbki francuskie są podobne, i ewentualnie doposażyć metodę do nich.

W poprzedniej metodzie wykorzystywano sześć składników docelowych, tj.: mekoninę, papawerynę, noskapinę, acetylokodeinę, 6-acetylmorfinę i acetylthebaol. Niestety próbki analizowane w laboratorium policyjnym we Francji są w wysokim stopniu zanieczyszczone i nie wykryto w nich znaczącej ilości mekoniny (pierwsza różnica między próbkami szwajcarskimi a francuskimi [9]). Zwiększenie ilości heroiny do analizy nie rozwiązało tego problemu, gdyż piki acetaminofenu i kofeiny okazały się za duże i znajdowały się za blisko pików mekoniny.

W kolejnym etapie badano wpływ mekoniny na moc dyskryminacyjną metody. W tym celu przebadano pięć próbek (A-E), które zaszerzowano do trzech różnych partii (kategorii): pierwsza obejmowała próbki od A do F, druga G i H, a ostatnia, trzecia – tylko próbkę I. Wszystkie próbki poddano analizie. Wpływ mekoniny na badania porównawcze zbadano, obliczając wartości korela-



Ryc. 1. Chromatogram zanieczyszczeń heroiny

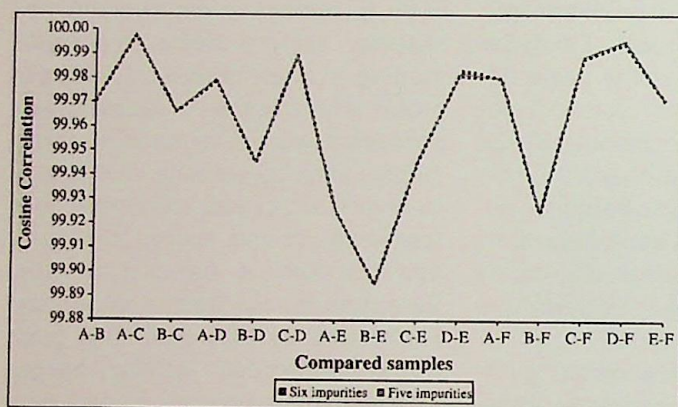


Ryc. 2. Chromatogram składników głównych heroiny

PRZEKŁADY

cji (funkcja cosinusa kwadratowego) zarówno z uwzględnieniem powierzchni mekoniny, jak i bez niej.

Wykres dystrybucji wartości korelacji obliczonych dla sześciu lub pięciu składników ukazuje rycina 3. Przedstawione na wykresie wartości mieściły się w zakresie od 0 do 100, gdzie 0 oznaczało całkowity brak podobieństwa, natomiast 100 – całkowite podobieństwo.

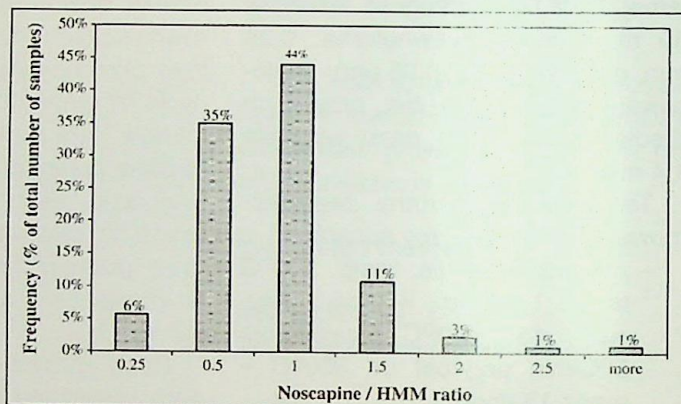


Ryc. 3. Dystrybucja wartości korelacji dla sześciu i pięciu składników

Całkowity czas przebiegu obniżyło z 30 do 23 minut.

Druga różnica między próbkami heroiny szwajcarskimi i francuskimi polegała na tym, że te drugie zawierały duże ilości noskapi (do 48% [7]). Prawdopodobnie dodawano ją jako środek „obróbkowy” [10]. Sporządzono więc wykres częstotliwości występowania stosunku noskapi do HMM (HMM oznacza sumę stę-

dza to fakt, że heroina skonfiskowana we Francji pochodzi głównie z Azji Południowo-Zachodniej [11] i zawiera morfinę i noskapię w stosunku od 2:1 do 1:2 [12]. Jako że tylko kilka próbek (na poziomie 2%) wykazało wysoki stosunek noskapi do HMM, można wnioskować, że noskapina jest ich składnikiem oryginalnym. Aby uniknąć wpływu największych składników – zwłaszcza noskapi – na

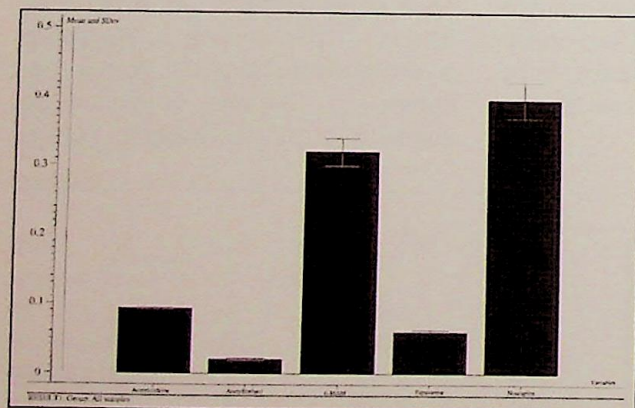


Ryc. 4. Częstotliwość występowania stosunku noskapi do HMM w próbkach

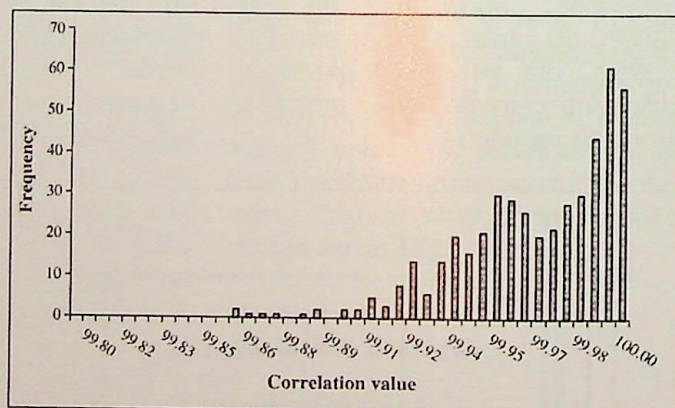
Zaobserwowano, że mekonina nie wpływa w sposób znaczący na wartości korelacji uzyskane zarówno wewnątrz poszczególnych partii, jak

żeń morfiny, monoacetylmorfiny i diacetylmorfiny (ryc. 4). Wykres opracowano na podstawie 670 próbek pochodzących z konfiskat w la-

wartości korelacji, zdecydowano się na przeprowadzenie standaryzacji powierzchni pików (po normalizacji do diamorfiny).



Ryc. 5. Wspólny wykres dla średnich i standardowych odchyleń



Ryc. 6. Dystrybucja wartości korelacji w badaniach odtwarzalności metody

i między nimi. W związku z tym pominięto ją w profilowaniu i zmieniono ustawienia programu kolumny, tak aby uzyskać dobry rozdział chromatograficzny dla pozostałych pięciu składników.

tach 2000–2004. Górna granica tego stosunku wynosi 3,2.

Jak można wyczytać z wykresu, w przypadku większości próbek (85%) stosunek noskapi do HMM nie przekracza wartości 1. Potwier-

Odtwarzalność i powtarzalność metody

Metodę zweryfikowano pod kątem jej odtwarzalności i powtarzalności. W początkowym etapie operator

przeprowadził kilka pomiarów na tym samym sprzęcie i w stosunkowo krótkim odstępie czasu. Dwie próbki heroiny o czystości odpowiednio 3 i 49% wstrzyknięto dziesięć razy, a następnie obliczono względne odchylenia standardowe każdego składnika i porównano uzyskane profile za pomocą funkcji cosinusa kwadratowego.

Drugi etap obejmował analizę tych samych próbek na tym samym sprzęcie, przy czym próbki badano przez dwa tygodnie (jedna analiza dziennie). Obliczono względne odchylenia standardowe każdego składnika i porównano uzyskane profile metodą funkcji cosinusa kwadratowego.

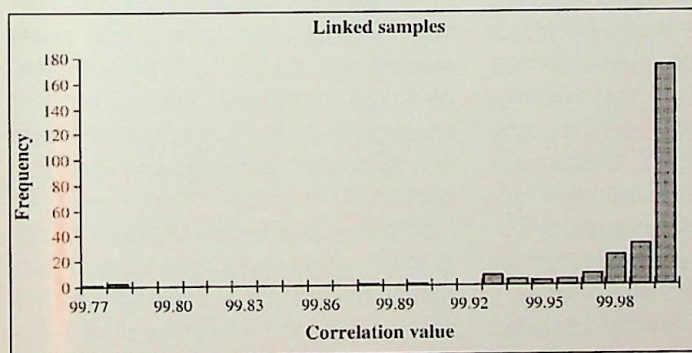
W następnej kolejności analizowano jedną próbkę na tym samym sprzęcie przez osiem miesięcy. Na rycinach 5 i 6 przedstawiono wykres blokowy każdego składnika oraz dystrybucję wartości korelacji. Analiza uzyskanych wyników wykazała powtarzalność i odtwarzalność metody:

wszystkie pomiary RSD (względnych standardowych odchyień) dla każdego składnika głównego miały wartość poniżej 8%, a wszystkie wartości korelacji wynosiły ponad 99,90%.

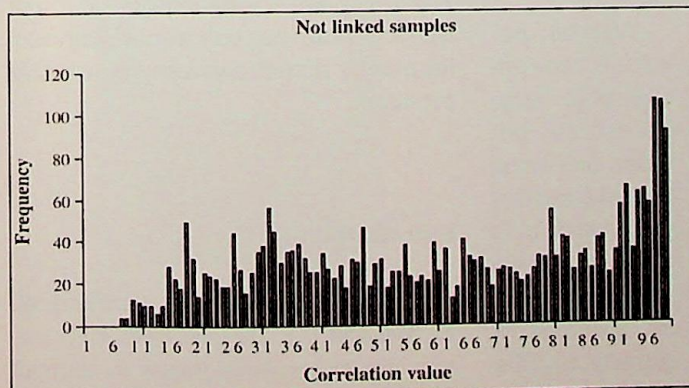
Moc dyskryminacyjna metody analitycznej. Po wykonaniu badań Autorzy skoncentrowali się na analizie powiązanych i niepowiązanych ze sobą próbek, aby ustalić wielkość graniczną, według której można stwierdzić, że dwie próbki pochodzą z tego samego źródła (partii). W tym celu przeprowadzono profilowanie próbek heroiny wykazujących pewne podobieństwo. Wybrano trzy partie próbek powiązanych ze sobą (każda partia zawierała odpowiednio 29, 16 i 10 próbek, zaś całkowita liczba par wynosiła 571), a następnie porównano próbki niepowiązane. W kolejnym etapie wykorzystano skonfiskowaną heroinę magazynowaną od ponad dwóch lat oraz 30 próbek skonfiskowanych w 2001 r., 4 próbki – w 2002 r., 70 – w 2003 r. i 72 – w 2004 r., po czym do-

dla powiązanych i niepowiązanych ze sobą próbek. W przypadku próbek niepowiązanych zakres wartości korelacji był duży, tj. wynosił od 6,86 do 99,88%. Inaczej sytuacja przedstawiała się w przypadku próbek powiązanych – 97,7% wartości korelacji przekraczało 99,92%. Porównanie tych dwóch wartości pozwoliło na ocenę możliwości metody pod kątem ustalenia powiązań chemicznych między konfiskatami.

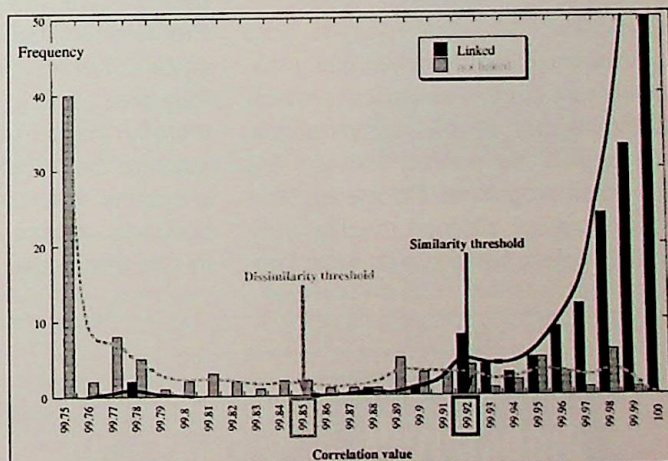
W trakcie badań określano liczbę wyników fałszywie pozytywnych i fałszywie negatywnych. Rycina 9 przedstawia częstotliwość wystąpienia wartości korelacji zarówno wewnątrz partii, jak i pomiędzy partiami próbek. Wykres blokowy został „wygładzony” za pomocą oprogramowania do modelingu wykresów (Statistica®). Przecięcie się tych dwóch krzywych (99,91) oraz pokrytej powierzchni ujawniło procent wyników fałszywie pozytywnych (0,2%) oraz fałszywie negatywnych (6%).



Ryc. 7. Wartości korelacji dla próbek powiązanych



Ryc. 8. Wartości korelacji dla próbek niepowiązanych



Ryc. 9. Wspólny obszar dla dwóch wykresów próbek (wewnątrz partii i pomiędzy partiami)

konano porównania między nimi (całkowita liczba par wynosiła 10,500).

Na rycinach 7 i 8 przedstawiono dystrybucję wartości korelacji

W kolejnym etapie wyznaczono arbitralnie dwa progi, które minimalizują ryzyko otrzymania wyników fałszywie pozytywnych i negatywnych oraz odpowiadają następującym poziomom decyzji:

- podobieństwo (99,92) z procentem odpowiedzi fałszywie pozytywnych rzędu 0,003,

– brak podobieństwa (99,85) z procentem odpowiedzi fałszywie negatywnych rzędu 0,2.

Wpływ substancji fałszujących skład. Przeprowadzono badania wpływu adulteracji (zafałszowania) na badania porównawcze heroiny. W 90% konfiskat zasady heroiny we Francji występuje mieszanina kafeiny/acetaminofenu w proporcji 45/55 [7] i dlatego zbadano wpływ tych produktów na badania porównawcze. Próbkę zasady heroiny o czystości 49% zmieszano z innymi składnikami, tak aby uzyskać zakres czystości między 5–49%. Następnie porównano ze sobą różne zestawy próbek i uzyskano korelacje. Wyniki badań wskazują na brak znaczącego wpływu adulteracji na wartości korelacji.

W następnej kolejności podjęto próbę oszacowania, do jakiego stopnia metoda jest wiarygodna. Do próbki zasady heroiny o czystości 13% dodawano mieszaninę kafeiny/acetaminofenu do momentu uzyskania czystości 1,5%. Dla różnych grup próbek wyznaczono minimalne, maksymalne i średnie wartości korelacji. Odnotowano, że pik acetylthebaolu nie pojawił się poniżej wartości 3% na chromatogramie. Co więcej, wartości korelacji zliczone między chromatogramem heroiny o czystości po-

niżej 1,5% a innymi chromatogramami znajdowały się pod progiem braku prawdopodobieństwa (średnia C wynosi 99,78 w porównaniu z 99,92). Zaobserwowano również, że replikaty nie były odtwarzalne z próbkami o czystości nieprzekraczającej 2%. Z tego powodu postanowiono wykorzystywać tę metodę jedynie w przypadku próbek heroiny o czystości powyżej 3%, tak aby uwzględnić acetylthebaol i uzyskać odtwarzalność między replikatami.

Porównanie charakterystyki składników głównych i zanieczyszczeń. Ostatnie badanie polegało na porównaniu wyników obu metod poprzez analizę 30 próbek heroiny. Okazało się, że 95% powiązań dokonanych metodą analizy zanieczyszczeń potwierdzono metodą analizy składników głównych (ryc. 10). Jest to zgodne z wnioskami Esseiva i wsp. [6]. Probki powiązane charakteryzowały się wynikiem poniżej 0,05 (pierwsza metoda) oraz ponad 99,92 w przypadku nowej metody (biały obszar). Probki niepowiązane miały wynik powyżej 0,1 w przypadku pierwszej metody oraz poniżej 99,85 w przypadku metody nowej (obszar zaznaczony kolorem ciemnoszarym). Obszar zaznaczony kolorem jasnoszarym odpowiada obszarowi niepewności. W tym przypadku analityk podejmuje

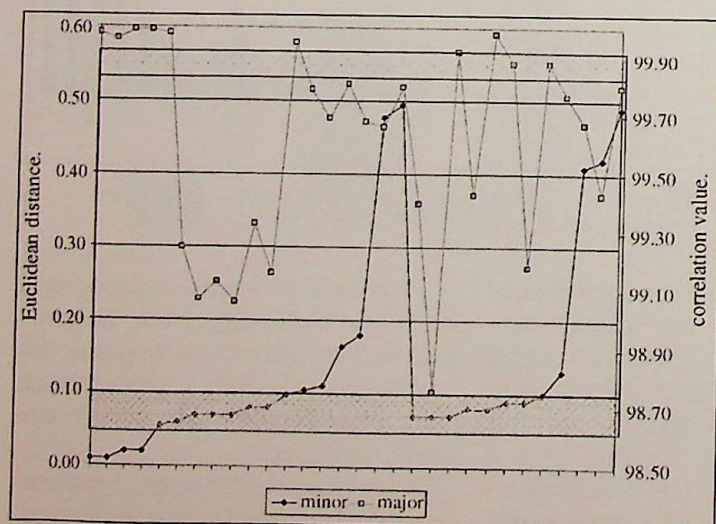
większych składników większość próbek znajdujących się w obszarze niepewności przesuwają się do strefy decyzyjnej. Należy jednak pamiętać, że badania zostały przeprowadzone na 30 próbkach, zatem aby zweryfikować wyniki, należy je powtórzyć na liczniejszej grupie próbek.

Wnioski

Omówiona powyżej metoda polegająca na charakteryzacji głównych składników okazała się efektywna i wiarygodna. Obecnie profilowanie próbki dowodowej heroiny można przeprowadzić w czasie jednej godziny, podczas gdy poprzednia metoda bazująca na charakteryzacji zanieczyszczeń wymagała co najmniej czterech godzin. Ponadto metoda analizy składników głównych wykazała się dobrą mocą dyskryminacyjną o niskim procencie wskazań fałszywie negatywnych i fałszywie pozytywnych. Zakładając jednak, że do ustalenia powiązania chemicznego wymaga się tylko pięciu parametrów, zaleca się, by brać pod uwagę także inne dane, jak np. procent zawartości heroiny bądź dodatkowe informacje od jednostki prowadzącej dochodzenie. Warto podkreślić, że metoda głównych składników nie pozostaje tylko i wyłącznie narzędziem analitycznym, ale – z uwagi na swą innowacyjność i wykorzystanie techniki komputerowej – pozwala na przekazywanie danych z profilowania z urządzenia analitycznego do bazy danych oraz na obliczenie wartości korelacji z przechowywanymi w bazie profilami.

BIBLIOGRAFIA

1. Dams R., Benijts T., Lambert W. E., Massart D.I., De Leenheer A.P.: Heroin impurity profiling: trends throughout a decade of experimenting, „Forensic Sci. Int.” 2001, nr 123 (2–3), s. 81–88;



Ryc. 10. Zbiorcze wyniki uzyskane za pomocą dwóch metod profilowania

d e c y z j ę , uwzględniając inne czynniki dotyczące konfiskaty.

Wykres pokazuje, że powiązania uzyskane za pomocą pierwszej metody zostały potwierdzone przez nową metodę (analiza składników głównych). Co więcej, w przypadku metody

PRZEKŁADY

2. Myors R.B., Crisp P.T., Skopec S.V., Wells R.J.: Investigation of heroin profiling using trace organic impurities, „Analyst” 2001, nr 126, s. 679–689;

3. Office on drugs and crime. Methods for Impurity Profiling of Heroin and Cocaine, ONZ, Nowy Jork 2005;

4. Bora T., Merdivan M., Hamamci C.: Levels of trace and major elements in illicit heroin, „J. Forensic Sci.” 2002, nr 47 (5), s. 959–963;

5. Allen A.C., Cooper D.A., Moore J.M., Grogger M., Neumann H.: Illicit heroin manufacturing by products: capillary gas chromatography, determination and structural elucidation of narcotine and norlaudanone-related compounds, „Analyst” 1984, nr 56, s. 2940–2947;

6. Esseiva P., Dujourdy L., Anglada F., Taroni F., Margot P.: A methodology for illicit heroin seizures comparison in a drug intelligence perspective using large databases, „Forensic Sci. Int.” 2003, nr 132 (2), s. 139–152;

7. Wewnętrzny raport statystyczny Policji francuskiej: 2004 S.T.U.P.S., Laboratoire de Police Scientifique de Lyon, Ministerstwo Spraw Wewnętrznych, Francja 2005;

8. Legendre P., Legendre L.: Numerical Ecology, Elsevier Science B.V., The Netherlands 1998;

9. Esseiva P.: Le profilage de l'heroine et de la cocaïne. Mise en place d'une systématique permettant une utilisation opérationnelle des liens chimiques,

praca doktorska, Uniwersytet w Lozannie, Wydział Prawa, Szkoła Nauk Sądowych, Instytut Policji Naukowej, Szwajcaria 2004;

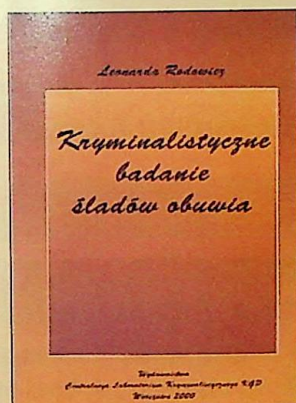
10. Klemenc S.: Noscapine as an adulterant in illicit heroin samples, „Forensic Sci. Int.” 2000, nr 108, s. 45–49;

11. National report on use and trafficking of illicit drugs in France. Usage et trafic des produits stupéfiants en France en 2004, Office Central pour la répression du trafic illicite des stupéfiants, Ministère de l'Intérieur, France 2004;

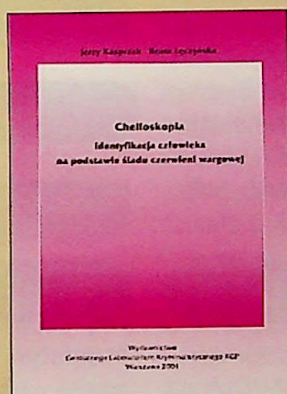
12. ONZ. Recommended Methods for Testing Opium/Crude Morphine, ONZ – Nowy Jork 1987, s. 4–6.

oprac. Agnieszka Łukomska

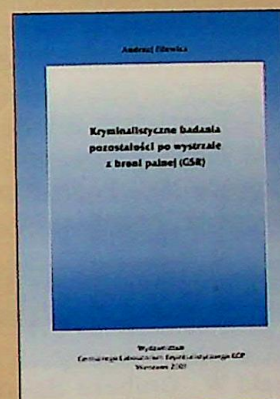
Czytelniku, do nabycia są poniższe publikacje CLK KGP



LEONARDA RODOWICZ
Kryminalistyczne badanie śladów obuwia
cena 10 zł



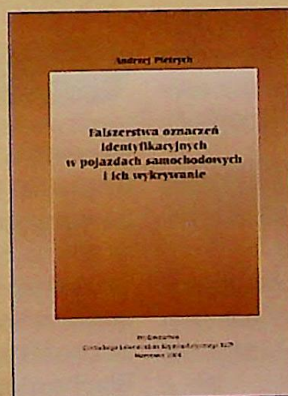
JERZY KASPRZAK, BEATA ŁĘCZYŃSKA
Cheiloskopia. Identyfikacja człowieka na podstawie śladu czerwieni wargowej
cena 15 zł



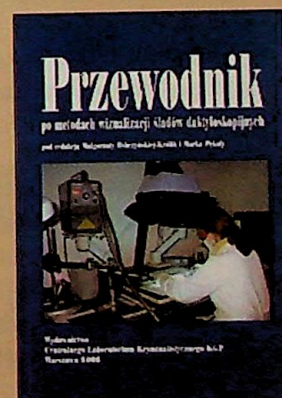
ANDRZEJ FILEWICZ
Kryminalistyczne badania pozostałości po wystrzale z broni palnej (GSR)
cena 35 zł



WALDEMAR KRAWCZYK
Nielegalne laboratoria narkotykowe
cena 29 zł



ANDRZEJ PIETRZYCH
Falszerstwa oznaczeń identyfikacyjnych w pojazdach samochodowych i ich wykrywanie
cena 18 zł



MAŁGORZATA RYBCZYŃSKA-KRÖLIK, MAREK PĘKAŁA
Przewodnik po metodach wizualizacji śladów daktyloskopijnych
cena 54 zł