



ORGANIC IMPURITY PROFILING OF 3,4-METHYLENEDIOXYMETHAMPHETAMINE (MDMA). COMPARISON OF ANALYTICAL AND STATISTICAL PROCEDURES

Karolina SEKUŁA, Dariusz ZUBA

Department of Forensic Toxicology, Institute of Forensic Research, Kraków, Poland

Abstract

Four popular procedures for MDMA impurity profiling were compared. Studies were performed both on MDMA samples prepared in the laboratory and seized ecstasy tablets. Extraction from carbonate buffer of pH = 9.0 into ethyl acetate gave the best results. GC-MS conditions differed slightly, and mainly influenced the total time of analysis. The most efficient chemometric approach was to calculate the fourth root of peak areas of key impurities, followed by calculation of correlations based on the Pearson coefficient or on the cosine and agglomeration by Ward's method.

Key words

Forensic science; 3,4-methylenedioxyamphetamine; Ecstasy; Profiling of impurities; Chemometric analysis.

Received 4 August 2010; accepted 9 September 2010

1. Introduction

The Drugs Action Plans (2005–2008, 2009–2012) implemented by the European Union has been aimed, among others, to reduce of manufacture and supply of synthetic drugs by developing and implementing a long term solution at the EU level, involving application of drug profiling results for law enforcement, strategic and operational purposes [14, 15]. The EU drugs strategy (2005–2012) [16] is that the focus should be on enhancing law enforcement, criminal investigation and forensic science cooperation between EU Member States that have common interests and/or face the same drug-related problems. Such policies have led to closer cooperation between institutions and forensic labs dealing with drug analysis. The first international research on drug profiling was initiated in 1997. A project entitled “Development of a harmonized method for the

profiling of amphetamines” was funded by the EU [1, 2, 3, 4, 5, 27]. The success of the project led to the initiation of the CHEDDAR (Collaborative Harmonized European Database Determination of Amphetamine Relations) project, the main objective of which was to create and develop a central database where all laboratories implementing the harmonized profiling procedure could transfer and store analytical profiles [12]. A similar approach was applied to methamphetamine and 3,4-methylenedioxyamphetamine (MDMA) in the CHAMP (Collaborative Harmonization of Methods for Profiling of Amphetamine Type Stimulants) project, which was also funded by the EU. The project involved numerous partner crime laboratories throughout Europe as well as the Drug Enforcement Administration (DEA) [11, 31, 46]. At the same time, several national and cross-border drug profiling projects were carried out, including ones in Germany, the Nether-

lands, France, Switzerland and Poland [10, 18, 19, 20, 22, 25, 26, 33, 37, 38, 39, 41]. Extensive studies on this topic were also performed in Hong Kong, Japan and Australia [6, 7, 24, 30, 34]. On the other hand, an Interpol report states that although certain drugs have been well characterized with respect to their impurity profiles, most have not been properly investigated [23].

Recently, researchers have focused most on MDMA, which is usually the main psychoactive substance in ecstasy tablets. Global ecstasy production, after strong increases in the 1990s, is now shrinking, primarily because of production falling in Europe. Up to 2003, the largest quantities of ecstasy were seized by the United Kingdom, followed by Germany, France and the Netherlands [17]. In the period 2000–2005, the largest numbers of ecstasy labs were dismantled in the Netherlands (111), followed by the USA (83), Canada (71) and Belgium (26). Of the 8.5 tons (weight equivalent) of ecstasy seized globally in 2004, 50% was recovered in Western and Central Europe, 23% in North America and 16% in Oceania [9]. An estimated 24,000 seizures led to the confiscation of about 28.3 million ecstasy tablets in the EU in 2004. Over the past 10 years, manufacture of ecstasy-group substances has shifted away from Europe to a number of consumer markets around the world. Nowadays, large-scale manufacturing operations are more frequently being dismantled in East and South-East Asia, the Americas and Oceania. In 2008, only four ecstasy laboratories were reported to have been dismantled in West and Central Europe, whereas there were 49 such operations in other regions [40].

Profiling of ecstasy tablets was originally based on a physical description of the tablet [21]. Then it moved towards a chemical characterization of impurities present as a result of the synthetic method. These impurities are derived from incomplete reactions and side reactions, inadequate purification procedures or contamination. Furthermore, the precursors, reagents and solvents used during the synthesis are also indicators of the applied route. Some impurities are specific to a particular synthetic route and are used as markers for profiling purposes [19, 36, 42, 43, 44, 45]. Gathering knowledge about the formation of so-called principal impurities could be of major importance in interpretation of results of comparison of chemical profiles. However, comparative analysis (e.g., the systematic application of impurity profiling to determine whether there is a common origin) is complicated due to both the high complexity of data and the large numbers of exhibits. Thus, improved analytical and data handling techniques are still needed [23].

Although different extraction techniques may be used to isolate the impurities from ecstasy tablets, liquid-liquid extraction (LLE) is the most common. The LLE

methods used for profiling of ecstasy tablets differ in many parameters, including: kind of buffer, its pH, extracting agent, duration of shaking and centrifugation and substance used as an internal standard (IS) [6, 10, 18, 19, 20, 22, 25, 26, 28, 33, 35, 37, 38, 39, 41]. The impurities are usually extracted from basic or neutral pH, and phosphate or carbonate buffer is used for this purpose. The most popular extracting agents are: toluene, n-heptane, ethyl acetate, methylene chloride and diethyl ether.

Most of the recently published analytical methods for organic impurity profiling of ecstasy tablets have utilized gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS), or with flame-ionization detection (GC-FID) [18, 19, 20, 27, 28, 32, 35, 37, 38, 39]. The advantage of GC-MS over GC-FID is simultaneous separation of the impurities and their identification on the basis of mass spectra. The parameters of GC-MS and GC-FID methods used in ecstasy profiling were reviewed by the authors in another paper [8].

The present paper aims to compare MDMA profiling methods in terms of procedures used for extraction of organic impurities and parameters of the applied GC-MS method as well as comparing statistical methods used for samples discrimination. Although studies on MDMA profiling are extensively performed in leading forensic laboratories, the procedures used differ to a great extent. Thus, the authors decided to analyze synthetic samples of MDMA prepared in the laboratory and ecstasy tablets seized by the police according to four popular procedures published in scientific papers, in order to evaluate their abilities to isolate impurities that can be used to distinguish between linked and unlinked samples.

2. Material and methods

2.1. Chemicals

The following chemicals were used in the studies: phosphate buffer, pH = 7.00 (K_2HPO_4/KH_2PO_4 , Merck, Darmstadt, Germany); carbonate buffers prepared in house: pH = 9.0 ($NaHCO_3/Na_2CO_3$), pH = 10.0 ($NaHCO_3/NaOH$), pH = 12.0 ($Na_2CO_3/NaOH$); n-heptane (HPLC grade, Aldrich, Darmstadt, Germany); diethyl ether (Lachemia, Neratovice, Czech Republic); ethyl acetate and toluene (Chempur, Piekary Śląskie, Poland); diphenylamine (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany).

2.2. Synthetic samples of MDMA

In total, 14 samples of MDMA were prepared in the laboratory. The syntheses were carried out at the Fac-

ulty of Chemistry, Jagiellonian University, Kraków, Poland. Three different routes, that is the Leuckart method, reductive amination using aluminum amalgam as a reducing agent, and safrole bromination, were applied. Details of the synthetic routes are given in the literature [19, 36, 42, 43, 44, 45].

2.3. Ecstasy tablets

Five seizures of ecstasy tablets that had been the subject of routine casework in the Institute of Forensic Research (IFR) were used in the study. The number of tablets was from 10 to 95 per seizure. Each tablet contained MDMA as the main psychoactive substance, but they differed in terms of color and logo. None of the tablets contained any other psychoactive substances (e.g. controlled substance, medicines or caffeine). Three randomly chosen tablets from each seizure were taken for each experiment.

2.4. Procedures of impurity extraction

Among published procedures of impurity extraction, four options were chosen. The original procedures [18, 19, 20, 27, 28, 35, 37, 38, 39] were modified to some extent to adapt them to available chemicals, laboratory equipment and especially to the form of the samples (powder or tablet).

For isolation of impurities from powder, the following procedures were used:

- procedure I (based on [37, 38, 39]): 50 mg of MDMA·HCl were dissolved in 2 ml of carbonate buffer of pH = 10.0 and the solution was vigorously shaken for 25 min. Extraction was performed using 200 μ l of n-heptane containing diphenylamine as an IS (35 mg/l). The mixture was shaken for another 25 min (2000 rpm) and the organic layer was subjected to analysis;
- procedure II (based on [27, 28]): 50 mg of MDMA·HCl were dissolved in 3 ml of phosphate buffer of pH = 7.0, vortex mixed for 10 min at 2000 rpm and centrifuged for 8 min at 4500 rpm. Then, 300 μ l of toluene containing diphenylamine as an IS (100 mg/l) were added, and the mixture was shaken for 10 min at 2000 rpm and centrifuged for 3 min at 3500 rpm. The toluene layer was separated and subjected to analysis;
- procedure III (based on [18, 19, 20]): 10 mg of MDMA·HCl were dissolved in 2 ml of carbonate buffer of pH = 12.0, then the mixture was shaken for 10 min at 2000 rpm. Extraction was carried out using 2 ml of diethyl ether, followed by shaking of the mixture for 10 min at 2000 rpm. The organic

layer was separated and evaporated to dryness. 500 μ l of diethyl ether containing diphenylamine as an IS (100 mg/l) were added and the mixture was shaken for a few seconds. The extract was subjected to analysis;

- procedure IV (based on [35]): 50 mg of MDMA·HCl were dissolved in 1 ml of carbonate buffer of pH = 9.0. The obtained solution was mixed on a rolling extractor for 30 min at 2000 rpm. Then, 1 ml of ethyl acetate was added and mixed for another 30 min. The solution was centrifuged for 5 min at 3000 rpm. After centrifugation, the organic layer was separated and evaporated to dryness in a nitrogen stream. Then, 200 μ l of ethyl acetate containing diphenylamine as an IS (100 mg/l) were added and shaken for a few seconds. The organic layer was subjected to analysis.

The first step in sample preparation for impurity profiling of ecstasy tablets was crushing tablets in a mortar and weighing out 200 mg of the sample for each analysis. Additionally – unlike in the case of synthetic sample preparation – the solution was filtered after dissolving the tablet in a buffer. This step was applied to prevent emulsion formation and to make separation and collection of the organic layer easier. The emulsion can be formed because of the presence of additives (e.g. fatty acids) in ecstasy tablets.

2.5. Chromatographic separation

Four sets of GC-MS parameters were analysed (i.e. the same number of sets as in the case of extraction procedures). Original GC-MS conditions presented in papers [18, 19, 20, 27, 28, 35, 37, 38, 39] were modified depending on equipment available to the authors.

GC-MS analyses were carried out on a Hewlett-Packard 6890 series gas chromatograph coupled to a 5973N mass spectrometer. An HP-5MS fused silica capillary column (30 m \times 0.25 mm \times 0.25 μ m) was applied and helium was used as a carrier gas (1.0 ml/min). Splitless injection (2 μ l) was used.

Oven temperatures were as follows:

- procedure I (based on [37, 38, 39]): 50°C (maintained for 1 min), increased at 10°C/min to 150°C (maintained for 5.5 min), then ramped at 10°C/min to 280°C (maintained for 10 min);
- procedure II (based on [27, 28]): 90°C (maintained for 1 min), increased at 8°C/min to 310°C (maintained for 10 min);
- procedure III (based on [18, 19, 20]): 50°C (maintained for 1 min), increased at 5°C/min to 150°C (maintained for 12 min), then ramped at 15°C/min to 300°C (maintained for 10 min);

– procedure IV (based on [35]): 80°C (maintained for 1 min), ramped at 35°C/min to 180°C (maintained for 18 min), then increased at 50°C/min to 300°C (maintained for 2 min).

Injector temperature was 250°C for procedures I and II, 280°C for procedure III and 270°C for procedure IV.

The mass spectrometer was operated in electron ionization mode (EI). The temperature of the ion source and quadrupole was 230°C and 150°C, respectively. Ionization energy was set at 70 eV. Mass spectra were recorded in the range from 50 to 550 amu and solvent delay was set at 3 min.

2.6. Statistical and chemometric analysis

Basic statistical calculations were done using Excel (Microsoft). Chemometric analysis was performed using Statistica 8.0 (StatSoft, Tulsa, USA).

Different methods (normalization, weighting, logarithm, fourth root) were used for data pre-treatment. Distances between samples were calculated by six measures: Euclidean, Euclidean square, Manhattan, Chebyshev, distance based on the Pearson correlation coefficient ($1-r$) and the cosine of the angle between vectors formed by the samples. Seven agglomeration rules, including single linkage (SL), complete linkage (CL), weighted and unweighted pair-group average (WA and UA, respectively), weighted and unweighted pair-group median (WM and UM, respectively) and Ward's method were tested in cluster analysis. Mathematical algorithms such as: calculation of the ratio of the means of unlinked and linked samples (*ED*), calculation of estimated discrimination and calculation of the area under the receiver operating curve (*ROC*) were applied to assess the statistical and chemometrical approaches.

3. Results and discussion

3.1. Influence of GC-MS conditions on impurity profiles

In the first step, the influence of GC-MS parameters on the obtained profiles was studied. Two synthetic MDMA samples were used for this purpose. Organic impurities were isolated by means of the four chosen extraction procedures and then chromatographic analyses were carried out using the four sets of GC-MS parameters.

Regardless of applied GC-MS conditions, the same impurities were detected (their mass spectra were identical). This is not surprising, because the procedures differed mainly in terms of oven temperature

programs, and consequently analysis time. The peaks were merely shifted between the tested conditions. The chromatograms obtained using the first and second set of conditions were very similar. When the third set of parameters was applied, total analysis time was the longest (53 min), causing broadening of the peaks. Thus, the separation was not improved because the peaks widths were larger. When using the fourth set, the peaks of impurities were usually poorly separated. On the other hand, the analysis time was the shortest (26.3 min). In some chromatograms, some extra high peaks corresponding to e.g. organic solvents, their impurities or stationary phase elution were observed. Nevertheless, they did not hinder the interpretation of the results. Example total ion chromatograms of an MDMA sample analyzed under four tested GC-MS conditions are shown in Figure 1.

As mentioned, the differences in obtained chromatograms did not significantly influence the final interpretation of the results. Therefore, it would be acceptable to apply any of the tested sets of GC-MS conditions. The first set was arbitrarily chosen for further studies by the authors.

3.2. Influence of extraction conditions on impurity profiles

In the next step, the influence of extraction conditions on the profiles was examined. This part of the study was performed on both synthetic samples and seized ecstasy tablets. Four extraction procedures were compared.

The main differences between the procedures concerned the kind of buffer used to dissolve the sample and the kind of extracting agent. Some procedures included sample centrifugation, while others only sample shaking. Alkaline buffer solution was used in procedures I, III and IV (I – pH = 10.0, III – pH = 12.0, IV – pH = 9.0), whereas neutral buffer (pH = 7.0) was applied in the second procedure. The choice of alkaline buffer seemed to be logical, because most of the key impurities, similarly to MDMA, are basic. However, when extraction was performed from a buffer of pH = 7.0, neutral impurity profiles were obtained and the influence of the high MDMA peak on chromatographic separation and chemometric analysis was eliminated, or at least reduced. In the third extraction procedure, a buffer of pH = 12.0 was applied instead of pH = 11.5 used in the original procedure. This was a compromise, because a buffer of pH = 12.8 was applied to MDMA profiling in another paper by these authors [19].

Different extracting agents were applied in the tested procedures: I – n-heptane, II – toluene, III – diethyl ether, IV – ethyl acetate. All these solvents have a low

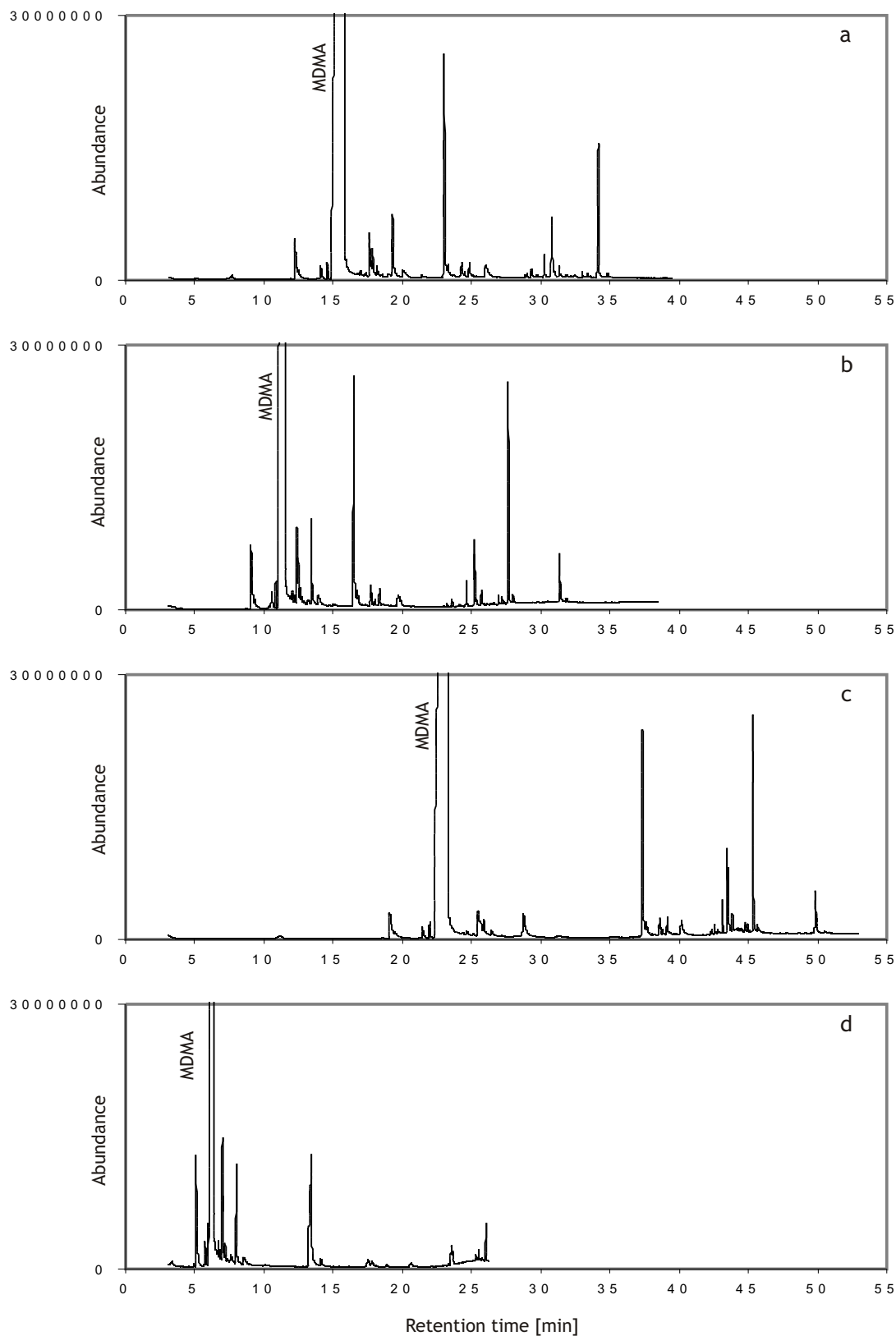


Fig. 1. Chromatograms of MDMA sample extracted by procedure IV (pH = 9.0, ethyl acetate), analyzed under four tested GC-MS conditions; a) I set [37, 38, 39], b) II set [27, 28], c) III set [18, 19, 20], d) IV set [35].

dielectric constant, therefore they are able to dissolve substances containing hydrophobic groups.

Moreover, 50 mg portions of MDMA powder (instead of 200 mg used in the original procedures, which were developed in order to analyze ecstasy tablets) were weighed out for impurity profiling according to procedures I, II and IV. The amount of MDMA taken for the analyses was equivalent to its real content in tablets. The recalculation was based on two assumptions: 1. total mass of a tablet is ca. 200 mg; 2. MDMA content in a tablet is usually between 20% and 30% (25% on average). Only in the third extraction procedure was the original amount (10 mg) used.

As mentioned above, dissolved ecstasy tablets were additionally filtrated. This enabled separation and collection of the organic layer.

3.3. Extraction of impurities from synthetic samples

Chromatograms of an example MDMA sample prepared by reductive amination using Al(Hg), extracted according to the procedures I–IV, are shown in Figure 2.

As can be seen in Figure 2, the pH of the buffer significantly influences the impurity profiles. Buffer selection (its pH) determines the character of the extracted impurities. This is especially noticeable for the second extraction procedure, where the peak corresponding to MDMA is significantly lower than in

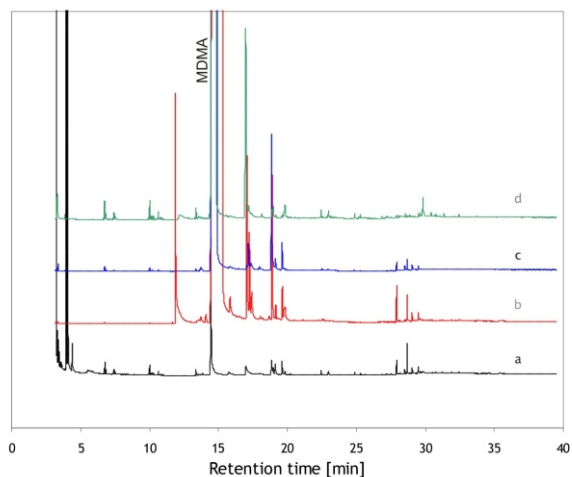


Fig. 2. Comparison of the chromatograms of an MDMA sample prepared by reductive amination using Al(Hg), obtained by different extraction procedures; a) II – pH = 7.0, toluene, b) IV – pH = 9.0, ethyl acetate, c) I – pH = 10.0, *n*-heptane, d) III – pH = 12.0, diethyl ether; (analyzed under the first set of GC-MS conditions).

other procedures. This shows that neutral impurities are extracted better at pH = 7.0, whereas a higher number of basic impurities is extracted from alkaline solutions.

Visual inspection of all obtained chromatograms revealed that the largest number of peaks was detected when the third extraction procedure was applied. However, after detailed investigation, it turned out that some of these peaks corresponded to the solvent, its impurities and the stationary phase. For this reason, analysis of chromatograms was significantly hindered.

The applied extraction procedures were assessed by means of statistical and chemometric methods. Two kinds of data were taken into account. The first approach assumed selection of peaks corresponding to characteristic impurities present in MDMA samples. 47 peaks were chosen on the basis of previous studies performed at the IFR [39], thus the dataset was composed of 47 variables and 14 cases (14 samples). The second approach was to treat chromatograms as a set of independent points (variables) and to analyze “full chromatograms”, thus the dimensions of the data matrix were 4612 × 14 (4612 variables and 14 cases).

At first, different pre-treatment methods and mathematical algorithms were assessed. Certain algorithms required some “normalization” procedures, because in many cases peaks originating from some substances were 100 to 1000 times bigger than others. This poses problems in further mathematical comparisons as large peaks will have a huge influence on the numerical results. There are many methods that can be employed for pre-treatment of data, which can be used individually or in combination with each other [13, 25, 29]. Thus, it would be unrealistic to test all of them and all possible combinations. Therefore, the authors limited this part of the study to the four following methods, which seemed to be adequate for our purposes: 1. normalization (N) – each target peak in a chromatogram (its area) was divided by the sum of all target peak areas; 2. weighting (W) – the area of each peak was divided by its standard deviation calculated from the whole data set (this procedure gives small peaks the same influence as large ones); 3. logarithm (Log) – a common method used to reduce the influence of large peaks while still allowing large peaks to have a greater influence than small peaks (the problem of “zeroes” was solved by replacing them by “ones”); 4. fourth root (4R) – for this method, large peaks have a somewhat higher influence as compared to the logarithm method.

In the next stage, the distances between samples were calculated. Different measures, including Euclidean, Euclidean square, Manhattan and Chebyshev distances as well as ones based on the Pearson correlation

coefficient ($1-r$) and the cosine of the angle between vectors formed by the samples, were applied. The calculated distances were divided into two groups, which corresponded to linked and unlinked samples. The MDMA samples, prepared according the same procedure, were treated as "linked". In total, the datasets contained 26 linked and 65 unlinked distances.

The impacts of the approaches were evaluated in three ways: 1. calculation of the ratio of the means of (the distances between) unlinked and linked samples (MR values); 2. calculation of estimated discrimination (ED) defined as the ratio of the value representing the mean minus the standard deviation (SD) of the obtained unlinked distances to the value representing the mean plus SD of the linked distances; 3. calculation of the area under the ROC (Receiver Operating Curve), AUC [25]. The results of calculations are presented in Tables I and II.

Table I was drawn up in order to compare different pre-treatment methods and extraction procedures. The eight highest values of the parameters are in boldface. The results showed that the most efficient pre-treatment methods were the calculations of the fourth root and of the logarithm. The application of a combination of methods to the same data did not improve the efficiency of separation between linked and unlinked samples significantly. Thus, in further calculations, "single" approaches were applied.

The data were also used for assessment of the tested extraction procedures. When comparing the values of MRs , EDs and $AUCs$ obtained for different extractions, it can be seen that the fourth procedure gives the highest values. Thus, one can assume that this approach could lead to the best separation between linked and unlinked samples, and therefore to the best results.

The ability of different distance measures to discriminate between linked and unlinked samples is compared in Table II. For each pre-treatment method, the two highest scores for the MR , ED and AUC values are printed in bold type. Of the tested distance measures, those based on the Pearson correlation coefficient followed by the cosine gave the best results. In some approaches, the Chebyshev distance also allowed discrimination of the samples efficiently, but the authors decided to use only the distance matrixes calculated on the basis of the Pearson coefficient and the cosine in cluster analysis.

The values of all mentioned parameters were generally lower than expected by the authors and lower than e.g. ED values for heroin [13] and cocaine samples [25], but they enabled a comparison between procedures. The lower values could result from the fact that a lower number of samples was used for calcula-

tions. The other reason could be the lower specificity of MDMA impurities to distinguish the synthetic route or synthesis batches than those used in cocaine or heroin profiling.

TABLE I. THE VALUES OF THE MEAN RATIO (MR), THE ESTIMATED DISCRIMINATION (ED) AND THE AREA UNDER CURVE (AUC), LISTED ACCORDING TO PRE-TREATMENT METHOD (SELECTED PEAKS, MEAN OF DISTANCE MEASURES)

Pre-treatment method	Extraction method	MR	ED	AUC
Withoutpre-treatment	I	1.08	0.10	0.53
	II	1.13	0.12	0.50
	III	1.01	0.06	0.48
	IV	1.18	0.13	0.56
Normalisation	I	1.20	0.47	0.58
	II	1.34	0.67	0.57
	III	1.08	0.34	0.54
	IV	1.33	0.66	0.64
Weighting	I	1.12	0.49	0.52
	II	1.10	0.60	0.54
	III	1.05	0.59	0.52
	IV	1.18	0.69	0.53
4 th root	I	1.28	0.59	0.67
	II	1.25	0.61	0.61
	III	1.10	0.54	0.57
	IV	1.49	0.79	0.68
Logarithm	I	1.24	0.77	0.65
	II	1.17	0.74	0.66
	III	1.11	0.71	0.62
	IV	1.31	0.85	0.76
Logarithm + 4 th root	I	1.22	0.80	0.69
	II	1.14	0.76	0.62
	III	1.10	0.73	0.63
	IV	1.24	0.84	0.75

Different cluster agglomeration rules, including single linkage (SL), complete linkage (CL), weighted and unweighted pair-group average (WA and UA, respectively), weighted and unweighted pair-group median (WM and UM, respectively) and Ward's method, were tested. The efficiency of clustering was assessed by

TABLE II. THE VALUES OF THE MEAN RATIO (*MR*), THE ESTIMATED DISCRIMINATION (*ED*) AND THE AREA UNDER CURVE (*AUC*), DEPENDING ON THE DISTANCE METHOD USED (SELECTED PEAKS, EXTRACTION METHOD IV)

Pre-treatment metod	Distance	<i>MR</i>	<i>ED</i>	<i>AUC</i>
Without pre-treatment	Euclidean	1.00	-0.04	0.49
	Squared Euclidean	1.02	-0.33	0.49
	Manhattan	1.06	0.06	0.51
	Chebyshev	0.98	-0.10	0.49
	Pearson	1.32	0.47	0.60
	Cosine	1.23	0.57	0.52
Normalisation	Euclidean	1.17	0.6	0.56
	Squared Euclidean	1.31	0.37	0.63
	Manhattan	1.24	0.68	0.57
	Chebyshev	1.17	0.52	0.60
	Pearson	1.32	0.47	0.60
	Cosine	1.23	0.57	0.52
Weighting	Euclidean	1.08	0.52	0.55
	Squared Euclidean	1.17	0.28	0.56
	Manhattan	1.16	0.41	0.57
	Chebyshev	1.02	0.71	0.49
	Pearson	1.26	0.85	0.69
	Cosine	1.00	0.77	0.31
4 th root	Euclidean	1.16	0.69	0.57
	Squared Euclidean	1.31	0.46	0.66
	Manhattan	1.24	0.69	0.62
	Chebyshev	1.12	0.52	0.59
	Pearson	1.47	0.70	0.69
	Cosine	1.38	0.73	0.67
Logarithm	Euclidean	1.13	0.83	0.66
	Squared Euclidean	1.27	0.68	0.70
	Manhattan	1.24	0.73	0.71
	Chebyshev	1.04	0.86	0.56
	Pearson	1.33	0.77	0.73
	Cosine	1.24	0.73	0.67
Logarithm + 4 th root	Euclidean	1.12	0.84	0.69
	Squared Euclidean	1.24	0.70	0.69
	Manhattan	1.23	0.71	0.70
	Chebyshev	1.01	0.96	0.53
	Pearson	1.27	0.76	0.75
	Cosine	1.19	0.74	0.65

verification of MDMA samples classification according to the synthetic routes. The classification was acknowledged as “correct” if all prepared samples were classified in accordance with the route used (three homogenous clusters were formed), and “almost correct” if one sample was misclassified. Correct classification was achieved only when the fourth extraction procedure was used and pre-treatment was done by calculation of the fourth root (procedures: 4R + Pearson + WA, 4R + Pearson + UA, 4R + Pearson + Ward, 4R + cosine + CL, 4R + cosine + WA, 4R + cosine + UA, 4R + cosine + Ward). An example dendrogram of MDMA samples classified correctly is shown in Figure 3.

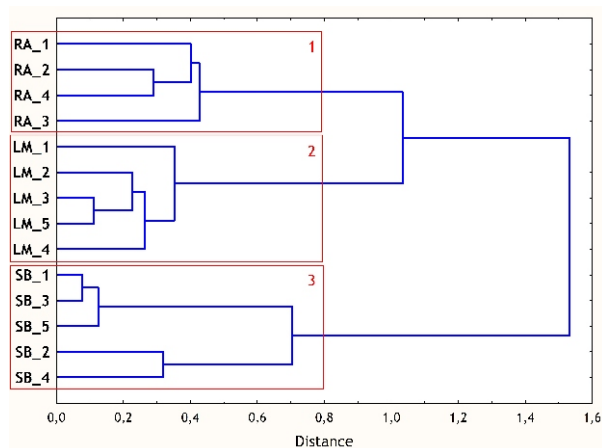


Fig. 3. Dendrogram of synthetic MDMA samples; RA – reductive amination using aluminum amalgam, LM – Leuckart method, SB – safrole bromination; (pre-treatment by fourth root, distances based on Pearson’s correlation coefficient, Ward’s cluster agglomeration rule).

Almost correct classification was achieved for approaches based on the fourth extraction and the logarithm procedure as the pre-treatment method (procedures: Log + Pearson + Ward, Log + cosine + CL, Log + cosine + Ward) as well as when the first extraction procedure was used (Log + Pearson + Ward).

Comparison of the results of cluster analysis and the calculations presented above leads to the conclusion that in MDMA profiling, the fourth root was the best pre-treatment method (the second was logarithm), the best distance calculation method was based on the Pearson correlation coefficient (the second, which gave similar results, was the cosine method), and the best agglomeration rule was Ward’s method.

As mentioned at the beginning of this paragraph, similar calculations were performed for “full chromatograms”. The results are presented in Tables III and IV.

TABLE III. THE VALUES OF THE MEAN RATIO (*MR*), THE ESTIMATED DISCRIMINATION (*ED*) AND THE AREA UNDER CURVE (*AUC*), LISTED ACCORDING TO PRE-TREATMENT METHOD (FULL CHROMATOGRAMS, MEAN OF DISTANCE MEASURE)

Pre-treatment method	Extraction method	<i>MR</i>	<i>ED</i>	<i>AUC</i>
Withoutpre-treatment	I	1.21	0.50	0.51
	II	1.05	0.32	0.47
	III	0.95	0.40	0.40
	IV	1.32	0.50	0.62
4 th root	I	1.09	0.53	0.51
	II	1.06	0.43	0.51
	III	1.00	0.46	0.47
	IV	1.19	0.62	0.57
Logarithm	I	1.04	0.50	0.52
	II	1.07	0.48	0.55
	III	1.02	0.45	0.49
	IV	1.19	0.66	0.56

The values of *MRs*, *EDs* and *AUCs* were lower than corresponding ones in Tables I and II. This indicates that this general approach is less effective than the approach based on selected peaks. The obtained results were also subjected to cluster analysis. Unfortunately, none of the applied approaches led to correct classification of the synthetic MDMA samples. In some cases (mainly where the best approach was chosen after the analysis of selected peaks, that is based on fourth root pre-treatment, Pearson correlation distance and Ward’s clustering rule), the samples prepared by Leuckart reaction and safrole bromination were clustered correctly, but mostly the samples were not classified into groups corresponding to the synthesis route. This probably resulted from the fact that the peaks, which did not correspond to MDMA impurities, were also subjected to chemometric analysis and they significantly influenced the obtained dendrograms. The results indicated strongly that a general “blind” approach to the chromatograms does not yield satisfactory results.

3.4. Extraction of impurities from ecstasy tablets

In the case of ecstasy tablets, the findings regarding the pH of the buffer solution were similar to those for synthetic samples. After extraction according to the second procedure, the peak corresponding to MDMA

was lower than in other procedures. Furthermore, a higher number of impurities was extracted from the alkaline solution, and this confirms that most of the impurities are basic, similarly to MDMA.

TABLE IV. THE VALUES OF THE MEAN RATIO (*MR*), THE ESTIMATED DISCRIMINATION (*ED*) AND THE AREA UNDER CURVE (*AUC*), DEPENDING ON THE DISTANCE METHOD USED (FULL CHROMATOGRAMS, EXTRACTION METHOD IV)

Pre-treatment metod	Distance	MR	ED	AUC
Without pre-treatment	Euclidean	1.12	0.49	0.52
	Squared Euclidean	1.21	0.27	0.57
	Manhattan	1.11	0.40	0.55
	Chebyshev	1.05	0.73	0.32
4 th root	Pearson	1.17	0.26	0.55
	Euclidean	1.07	0.57	0.55
	Squared Euclidean	1.12	0.35	0.55
	Manhattan	1.04	0.49	0.53
Logarithm	Chebyshev	1.03	0.76	0.38
	Pearson	1.16	0.38	0.56
	Euclidean	1.06	0.60	0.54
	Squared Euclidean	1.09	0.36	0.55
	Manhattan	1.03	0.49	0.51
	Chebyshev	1.04	0.69	0.45
	Pearson	1.17	0.46	0.59

The number of impurities and their amounts in a drug sample depends on the purification process. After synthesis and evaporation of the reaction solvent, the product is usually purified by liquid-liquid extraction. Crude product is obtained and production can be finished at this stage. However, if necessary, a drug may be subjected to further purification, e.g. by distillation or crystallization. Most ecstasy tablets that are distributed on the black market are subjected to these processes. This causes some difficulties in profiling. The profiles contain less peaks corresponding to the impurities, and consequently determination of the synthesis route is sometimes more difficult. Ecstasy tablets contain some 20–30% MDMA, the remainder being composed of additives and diluents, which can be

added to the main component before compression into tablets. These substances make interpretation of profiling results more complicated. Thus, an important part of impurity isolation from ecstasy tablets is filtration. In the preliminary study, this process was not performed. However, formation of emulsion hindered separation and collection of the organic layer. Filtration after addition of extracting agent was also tested, but in this case the loss of organic solvent and consequently of impurities was too great. Therefore, the authors decided to apply filtration after dissolving tablets in a buffer solution.

In order to assess the extraction procedures, cluster analysis was also performed for ecstasy tablets. 15 tablets originating from 5 seizures were tested (3 per seizure). The data were prepared in a similar way to those for powders (pre-treatment by fourth root, distances based on Pearson's correlation coefficient and Ward's cluster agglomeration rule). A dendrogram of examined samples prepared according to the fourth extraction procedure is shown in Figure 4.

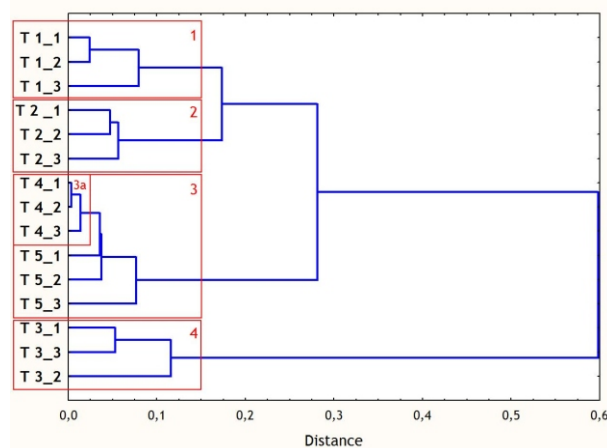


Fig. 4. Dendrogram of ecstasy tablets; T_{i_j} – tablet description, where: i – seizure, j – sample; (pre-treatment by fourth root, distances based on Pearson's correlation coefficient, Ward's cluster agglomeration rule).

As can be seen in Figure 4, at least four clusters corresponding to the seizures were formed. One cluster (no. 3) contained samples coming from two seizures, but according to operational sources these seizures were connected. Therefore, this classification can be treated as correct. Analysis of ecstasy tablets according to the remaining tested extraction procedures (I, II and III) led to misclassification of the samples. This confirmed that the fourth tested procedure (carbonate buffer of $pH = 9.0$, ethyl acetate as an extracting agent) was the most efficient of the tested procedures.

It is also important to point out that a smaller number of peaks (originating from MDMA impurities) were obtained in the chromatograms of ecstasy tablets. Thus, interpretation of the results was more difficult than for MDMA samples prepared in the laboratory. The presence or absence of a given peak in some samples could significantly influence the results of cluster analysis and change sample classification.

4. Conclusions

Differences in GC-MS conditions among the four compared procedures did not significantly influence the interpretation of results. The best performance was achieved using the carbonate buffer of pH = 9.0 for samples dissolution and ethyl acetate as an extracting agent, as was proposed by Rashed et al [35]. When MDMA samples prepared in the laboratory were extracted according to this procedure, they were classified correctly. Chemometric interpretation of the profiles should be based on the areas of selected peaks corresponding to the key impurities. Calculation of the fourth root of the peak areas allows "weighting" of their influence on profiles classification. The best distance calculation methods were based on correlation measures (Pearson, cosine), whereas the best cluster agglomeration rule was Ward's method.

Acknowledgements

This work was supported by project O N204 0060 33 of the Ministry of Science and Higher Education, Warsaw, Poland. The authors would like to acknowledge Dr. Jarosław Wilamowski of the Faculty of Chemistry, Jagiellonian University, Kraków, Poland, for synthesis of the MDMA samples.

References

1. Aalberg L., Andersson K., Bertler C. [et al.], Development of a harmonised method for the profiling of amphetamines I. Synthesis of standards and compilation of analytical data, *Forensic Science International* 2005, 149, 219–229.
2. Aalberg L., Andersson K., Bertler C. [et al.], Development of a harmonised method for the profiling of amphetamines II. Stability of impurities in organic solvents, *Forensic Science International* 2005, 149, 231–421.
3. Andersson K., Jalava K., Lock E. [et al.], Development of a harmonised method for the profiling of amphetamines III. Development of the gas chromatographic method, *Forensic Science International* 2007, 169, 50–63.
4. Andersson K., Jalava K., Lock E. [et al.], Development of a harmonised method for the profiling of amphetamines IV. Optimisation of sample preparation, *Forensic Science International* 2007, 169, 64–76.
5. Andersson K., Lock E., Jalava K. [et al.], Development of a harmonised method for the profiling of amphetamines VI. Evaluation of methods for comparison of amphetamine, *Forensic Science International* 2007, 169, 86–99.
6. Cheng J. Y. K., Chan M. F., Chan T. W. [et al.], Impurity profiling of ecstasy tablets seized in Hong Kong by gas chromatography-mass spectrometry, *Forensic Science International* 2006, 162, 87–94.
7. Cheng W. C., Poon N. L., Chan M. F. J., Chemical profiling of 3,4-methylenedioxy-methamphetamine (MDMA) tablets seized in Hong Kong, *Journal of Forensic Sciences* 2003, 48, 1249–1259.
8. Cioroch K., Zuba D., Analytical approaches used for profiling of ecstasy tablets, *Problems of Forensic Sciences* 2007, 69, 71–89.
9. Commission on Narcotic Drugs, United Nations Economic and Social Council. World drug situation with regard to drug trafficking: Report of the Secretariat, United Nations Publications, Vienna 2006.
10. Dujourdy L., Besacier F., Headspace profiling of cocaine samples for intelligence purposes, *Forensic Science International* 2008, 179, 111–122.
11. Dujourdy L., Dufey V., Besacier F. [et al.], Drug intelligence based on organic impurities in illicit MA samples, *Forensic Science International* 2008, 177, 153–161.
12. Efficient amphetamine profiling by use of a Harmonised Method and a Common Database, <http://www.enfsi.org/agenda/cheddar> [accessed January 2008].
13. Esseiva P., Dujourdy L., Anglada F. [et al.], A methodology for illicit heroin seizures comparison in a drug intelligence perspective using large databases, *Forensic Science International* 2003, 132, 139–152.
14. EU Drugs Action Plan (2005–2008), *Official Journal of the European Union* 2005, C168, 1–18.
15. EU Drugs Action Plan (2009–2012), *Official Journal of the European Union* 2008, C326, 9–27.
16. EU drugs strategy (2005–2012), <http://www.emcdda.europa.eu/?fuseaction=public.Content&nnodeid=6790&sLanguageiso=EN&LayoutFormat=print> [accessed May 2010].
17. European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA). The state of the drugs problem in Europe Annual report 2006, <http://www.emcdda.europa.eu/publications/annual-report/2006> [accessed May 2010].
18. Gimeno P., Besacier F., Bottex M. [et al.], A study of the impurities in intermediates and 3,4-methylenedioxy-methamphetamine (MDMA) samples produced via reductive amination routes, *Forensic Science International* 2005, 155, 141–157.
19. Gimeno P., Besacier F., Chaudron-Thozet H. [et al.], A contribution to the chemical profiling of 3,4-methylenedioxy-methamphetamine (MDMA) tablets, *Forensic Science International* 2002, 127, 1–44.

20. Gimeno P., Besacier F., Chaudron-Thozet H., Optimization of extraction parameters for the chemical profiling of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) tablets, *Forensic Science International* 2003, 132, 182–194.
21. Gomm P. J., Humphreys I. J., Armstrong N. A., Physical methods for the comparison of illicitly produced tablets, *Journal of Forensic Science Society* 1976, 16, 283–293.
22. Gröger T., Schäfer M., Pütz M. [et al.], Application of two-dimensional gas chromatography combined with pixel-based chemometric processing for the chemical profiling of illicit drug samples, *Journal of Chromatography A* 2008, 1200, 8–16.
23. Janovsky T., Drugs and toxicology, [in:] Nic Daéid N. [ed.], Review papers. 15th International Forensic Science Symposium, Interpol, Lyon 2007.
24. Lee J. S., Chung H. S., Kuwayama K. [et al.], Determination of impurities in illicit methamphetamine seized in Korea and Japan, *Analytica Chimica Acta* 2008, 619, 20–25.
25. Locicero S., Esseiva P., Hayoz P. [et al.], Cocaine profiling for strategic intelligence, a cross-border project between France and Switzerland: Part II. Validation of the statistical methodology for the profiling of cocaine, *Forensic Science International* 2008, 177, 199–206.
26. Locicero S., Hayoz P., Esseiva P. [et al.], Cocaine profiling for strategic intelligence purposes, a cross-border project between France and Switzerland: Part I. Optimisation and harmonisation of the profiling method, *Forensic Science International* 2007, 167, 220–228.
27. Lock E., Aalberg L., Andersson K. [et al.], Development of a harmonised method for the profiling of amphetamines V. Determination of the variability of the optimized method, *Forensic Science International* 2007, 169, 77–85.
28. Lock E., Aalberg L., Kohtamaki E. [et al.], Impurity profiling of MDMA: The use of the same method in different laboratories. Book of abstracts of the 4th European Academy of Forensic Science Conference 2006, Jun 13–16, Helsinki 2006.
29. Lock E., Development of a harmonized method for profiling of amphetamine, Université de Lausanne, Lausanne 2005 [Ph.D. dissertation].
30. Makino Y., Kurobane S., Miyasaka K. [et al.], Profiling of ecstasy tablets seized in Japan, *Microgram Journal* 2003, 1, 169–176.
31. Marquis R., Delaporte C., Esseiva P. [et al.], Drug intelligence based on MDMA tablets data 2. Physical characteristics profiling, *Forensic Science International* 2008, 178, 34–39.
32. Nic Daéid N., Waddell R. J. H., The analytical and chemometric procedures used to profile illicit drug seizures, *Talanta* 2005, 67, 280–285.
33. Palhol F., Boyer S., Naulet N. [et al.], Impurity profiling of seized MDMA tablets by capillary gas chromatography, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2002, 374, 274–281.
34. Perkal M., Ng Y. L., Pearson J. R., Impurity profiling of methylamphetamine in Australia and the development of a national drug database, *Forensic Science International* 1994, 69, 77–87.
35. Rashed A. M., Anderson R. A., King L. A., Solid-phase extraction for profiling of ecstasy tablets, *Journal of Forensic Science* 2000, 45, 413–417.
36. Renton R. J., Cowie J. S., Oon M. C. H., A study of the precursors, intermediates and reaction by-products in the synthesis of 3,4-methylenedioxymethamphetamine and its application to forensic drug analysis, *Forensic Science International* 1993, 60, 189–202.
37. Świst M., Wilamowski J., Parczewski A., Basic and neutral route specific impurities in MDMA prepared by different synthesis methods. Comparison of impurity profiles, *Forensic Science International* 2005, 155, 100–111.
38. Świst M., Wilamowski J., Parczewski A., Determination of synthesis method of ecstasy based on the basic impurities, *Forensic Science International* 2005, 152, 175–184.
39. Świst M., Wilamowski J., Zuba D. [et al.], Determination of synthesis route of 1-(3,4-methylenedioxyphenyl)-2-propanone (MDP-2-P) based on impurity profiles of MDMA, *Forensic Science International* 2005, 149, 181–192.
40. United Nations Office on Drugs and Crime. 2010 world drug report, United Nations Publications, Vienna 2010.
41. van Deursen M., Lock E., Poortman-van der Meer A., Organic impurity profiling of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) tablets seized in the Netherlands, *Science & Justice* 2006, 46, 135–152.
42. Verweij A. M. A., Clandestine manufacture of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) by low pressure reductive amination. A mass spectrometric study of some reaction mixtures, *Forensic Science International* 1990, 45, 91–96.
43. Verweij A. M. A., Impurities in illegal drug preparations. Amphetamine and methylamphetamine. A review, *Forensic Science Review* 1989, 1, 1–11.
44. Verweij A. M. A., Impurities in illicit drug preparations: 3,4-(methylenedioxy)amphetamine and 3,4-(methylenedioxy)methylamphetamine, *Forensic Science Review* 1992, 4, 137–146.
45. Waddell-Smith R. J. H., A review of recent advances in impurity profiling of illicit MDMA samples, *Journal of Forensic Sciences* 2007, 52, 1297–1304.
46. Weyermann C., Marquis R., Delaporte C. [et al.], Drug intelligence based on MDMA tablets data I. Organic impurities profiling, *Forensic Science International* 2008, 177, 11–16.

Corresponding author

dr Dariusz Zuba
Instytut Ekspertyz Sądowych
ul. Westerplatte 9
PL 31-033 Kraków
e-mail: dzuba@ies.krakow.pl

PROFILOWANIE ZANIECZYSZCZEŃ ORGANICZNYCH 3,4-METYLENODIOKSYMETFAMINY (MDMA). PORÓWNANIE METOD ANALITYCZNYCH I STATYSTYCZNYCH

1. Wstęp

Plany działań na lata 2005–2008 oraz 2009–2012 dotyczące narkotyków, a wprowadzone przez Unię Europejską (UE), zakładały ograniczenie produkcji oraz podaży narkotyków syntetycznych poprzez opracowanie długoterminowego rozwiązania na szczeblu UE w zakresie wykorzystania profilu sądowego do strategicznych i operacyjnych celów ścigania [14, 15]. Europejska Strategia Antynarkotykowa (2005–2012) [16] wskazuje, że polityka antynarkotykowa powinna skupiać się na wzmocnieniu współpracy w zakresie egzekwowania prawa, dochodzeń karnych i nauk sądowych pomiędzy państwami członkowskimi UE, które mają wspólne interesy i (lub) stają wobec tych samych problemów związanych z narkotykami. Taka polityka doprowadziła do bliższej współpracy między instytucjami i laboratoriami sądowymi. Pierwsze międzynarodowe badania dotyczące profilowania rozpoczęły się w 1997 roku. Projekt „Development of a harmonized method for the profiling of amphetamines”, sfinansowany przez UE, był poświęcony metodzie profilowania zanieczyszczeń amfetaminy [1, 2, 3, 4, 5, 27]. Jego sukces doprowadził do podjęcia kolejnego projektu CHEDDAR (Collaborative Harmonized European Database Determination of Amphetamine Relations). Głównym jego celem było stworzenie wspólnej bazy danych, dzięki której laboratoria mogłyby porównywać profile narkotyków skonfiskowanych w różnych krajach [12]. Podobny charakter (w stosunku do metamfetaminy i metylenodioksymetamfetaminy) posiadał projekt CHAMP (Collaborative Harmonization of Methods for Profiling of Amphetamine Type Stimulants), który także został sfinansowany przez UE. Obejmował on laboratoria kryminalistyczne w całej Europie, jak również Urząd do Walki z Narkotykami (Drug Enforcement Administration) [11, 31, 46]. Równocześnie prowadzonych było kilkanaście projektów dotyczących profilowania narkotyków, m.in. w Niemczech, Holandii, Szwajcarii i Polsce [10, 18, 19, 20, 22, 25, 26, 33, 37, 38, 39, 41]. Obszerne badania w tym zakresie prowadzone były także w Hong Kongu, Japonii i Australii [6, 7, 24, 30, 34]. Jednak z drugiej strony raport Interpolu zawierał informację, że chociaż pewne narkotyki były odpowiednio scharakteryzowane pod względem ich profili zanieczyszczeń, to większość z nich nie była dobrze rozpoznana.

W ostatnim czasie naukowcy szerzej zajęli się badaniem MDMA, głównego składnika psychoaktywnego tabletek *ecstasy*. Globalny wyrób tego narkotyku, po znac-

nym wzroście w latach dziewięćdziesiątych 20. wieku zaczął maleć, głównie z powodu spadku produkcji w Europie. Do 2003 roku największe ilości *ecstasy* skonfiskowano w Wielkiej Brytanii, Niemczech, Francji i Holandii [17]. W latach 2000–2005 największą liczbę laboratoriów produkujących *ecstasy* zlikwidowano w Holandii (111), Stanach Zjednoczonych (83), Kanadzie (71) oraz Belgii (26). Z 8,5 ton (masa równoważna) *ecstasy* skonfiskowanych na świecie w 2004 roku 50% przechwycono w Europie zachodniej i centralnej, 23% w Ameryce Północnej, a 16% w Oceanii [9]. W 2004 roku blisko 24 000 konfiskat doprowadziło do przejęcia ok. 28,3 miliona tabletek *ecstasy* na terenie Unii Europejskiej. Jednak w ciągu ostatnich 10 lat produkcja *ecstasy* przesunęła się z Europy na inne kontynenty; obecnie na dużą skalę prowadzona jest częściej w Azji wschodniej i południowo-wschodniej, w Ameryce oraz Oceanii. W 2008 roku tylko 4 laboratoria produkujące *ecstasy* zostały zlikwidowane w Europie wschodniej i centralnej, podczas gdy aż 49 w innych regionach świata [40].

W przypadku tabletek *ecstasy* profilowanie opierało się pierwotnie na określeniu cech fizykochemicznych, takich jak kształt, masa czy logo [21]. Potem procedura profilowania zaczęła obejmować badanie chemiczne zanieczyszczeń obecnych w próbce. Zanieczyszczenia te stanowią substancje wprowadzone w czasie syntezy narkotyku, a pochodzące z zanieczyszczeń prekursorów, reagentów i rozpuszczalników oraz wszystkie substancje, które powstają w trakcie syntezy głównego składnika, czyli produkty reakcji ubocznych. Niektóre zanieczyszczenia stanowią związki specyficzne nazywane markermi, które powstają tylko w danej metodzie syntezy [19, 36, 42, 43, 44, 45]. Gromadzenie wiedzy na temat tworzenia głównych zanieczyszczeń może być istotnym aspektem wykorzystywanym w interpretacji wyników porównania profili chemicznych. Jednakże analiza porównawcza, np. systematyczne stosowanie profili zanieczyszczeń do określania pochodzenia (stopnia pokrewieństwa) próbek, jest skomplikowana ze względu na wysoki poziom złożoności danych oraz dużą liczbę badanych próbek. W związku z tym nadal potrzebny jest rozwój metod analitycznych i technik przygotowania danych [23].

Ekstrakcja ciecz-ciecz jest najczęściej stosowaną metodą izolacji zanieczyszczeń z tabletek *ecstasy*. Sposoby ekstrakcji ciecz-ciecz wykorzystanej w profilowaniu tabletek *ecstasy* różnią się kilkoma parametrami, takimi jak pH, rodzaj użytego buforu oraz odczynnika ekstrahującego, czas wytrąsania i wirowania, a także stosowany

wzorzec wewnętrzny (IS), który dodawany jest na etapie przygotowania próbki [10, 18, 19, 20, 22, 25, 26, 33, 37, 38, 39, 41]. Zanieczyszczenia są najczęściej ekstrahowane z pH zasadowego lub obojętnego, a w tym celu stosuje się bufor węglanowy lub fosforanowy. Najczęściej jako odczynnik ekstrahujący wykorzystuje się toluen, *n*-heptan, octan etylu, chlorek metylenu oraz eter dietylowy.

Do tej pory większość metod profilowania zanieczyszczeń pojawiających się w publikacjach bazuje na chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas (GC-MS) lub z detektorem płomieniowo-jonizacyjnym (GC-FID) [18, 19, 20, 27, 28, 32, 35, 37, 38, 39]. Zaletą metody GC-MS nad GC-FID jest jednoczesny rozdział zanieczyszczeń oraz ich identyfikacja na podstawie widm masowych związków. Parametry metod GC-MS i GC-FID używanych do profilowania *ecstasy* zostały opisane w innej publikacji autorów [8].

Celem tego artykułu jest porównanie metod profilowania MDMA pod względem procedur stosowanych do ekstrakcji organicznych zanieczyszczeń oraz parametrów metody GC-MS, a także zestawienie metod statystycznych stosowanych do rozróżniania próbek. Mimo iż w wiodących laboratoriach sądowych prowadzone są obszerne badania dotyczące profilowania MDMA, to stosowane procedury różnią się w znacznym stopniu. Dlatego autorzy zdecydowali się przeprowadzić badania syntetycznych próbek MDMA otrzymanych w laboratorium oraz tabletek *ecstasy* skonfiskowanych przez policję, stosując opublikowane w artykułach cztery popularne metody profilowania w celu oceny ich zdolności do izolacji zanieczyszczeń, które mogą być używane do rozróżniania próbek powiązanych i niepowiązanych.

2. Materiały i metody

2.1. Odczynniki chemiczne

Podczas ekstrakcji zanieczyszczeń użyto następujących odczynników: bufor fosforanowy, pH = 7,00 (K_2HPO_4/KH_2PO_4 , Merck, Darmstadt, Niemcy); bufony węglanowe o różnych pH sporządzono w laboratorium, tj. o pH = 9,0 ($NaHCO_3/Na_2CO_3$); pH = 10,0 ($NaHCO_3/NaOH$); pH = 12,0 ($Na_2CO_3/NaOH$); *n*-heptan (HPLC grade, Aldrich, Darmstadt, Niemcy); eter dietylowy (Lachemia, Neratovice, Czechy); octan etylu i toluen (Chem-pur, Piekary Śląskie, Polska); difenyloamina (Sigma-Aldrich, Steinheim, Niemcy).

2.2. Próbkę syntetyczne MDMA

Do badań wykorzystano 14 próbek syntetycznych MDMA otrzymanych w laboratorium. Syntezy prowadzone były na Wydziale Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie. Zastosowano trzy różne metody

syntezy: metodę Leuckarta, redukcyjnego aminowania z użyciem amalgamatu glinu (Al/Hg) jako reduktora oraz metodę bromowania safrolu. Wszelkie szczegóły dotyczące syntezy znajdują się w publikacjach naukowych [19, 36, 42, 43, 44, 45].

2.3. Tabletki *ecstasy*

Do badań wybrano po trzy tabletki pochodzące z pięciu serii będących przedmiotem rutynowych badań w Instytucie Ekspertyz Sądowych. Liczba tabletek przypadająca na każdą serię wynosiła od 10 do 95. Wszystkie przebadane tabletki *ecstasy* zawierały jako substancję aktywną 3,4-metylenodioksymetamfetaminę, natomiast wizualnie różniły się logo oraz kolorem. Żadna z tabletek nie zawierała innych substancji psychoaktywnych (np. substancji kontrolowanych, leków czy kofeiny).

2.4. Procedura ekstrakcji zanieczyszczeń MDMA

Spośród opublikowanych procedur ekstrakcji zanieczyszczeń MDMA wybrano cztery warianty, które stosowano podczas badań w celu ich porównania. Oryginalne procedury [18, 19, 20, 27, 28, 35, 37, 38, 39] zostały w nieznaczny sposób zmienione, aby dostosować je do dostępnych odczynników, naczyń laboratoryjnych, sprzętu i przede wszystkim rodzaju badanych próbek (proszki i tabletki).

W celu izolacji zanieczyszczeń z proszku zastosowano następujące procedury:

- procedura I (oparta na [37, 38, 39]) – 50 mg proszku MDMA·HCl rozpuszczono w 2 ml buforu węglanowego o pH = 10,0, następnie roztwór energicznie wytrząsano przez 25 min (2000 obr/min). Ekstrakcję prowadzono przy użyciu 200 l *n*-heptanu zawierającego difenyloaminę (35 mg/l) jako IS. Roztwór wytrząsano przez 25 min (2000 obr/min) i poddano analizie;
- procedura II (oparta na [27, 28]) – 50 mg proszku MDMA·HCl rozpuszczono w 3 ml buforu fosforanowego o pH = 7,0, następnie wytrząsano przez 10 min (2000 obr/min) i wirowano przez 8 min (4500 obr/min). Dodano 300 l toluenu (zawierającego difenyloaminę o stężeniu 100 mg/ml jako IS) i wytrząsano przez 10 min (2000 obr/min) oraz wirowano przez 3 min (3500 obr/min). Oddzielono warstwę toluenową i pobrano do analizy;
- procedura III (oparta na [18, 19, 20]) – 10 mg proszku MDMA·HCl rozpuszczono w 2 ml buforu o pH = 12,0, następnie roztwór mieszano przez 10 min (2000 obr/min). Ekstrakcję prowadzono przy użyciu 2 ml eteru dietylowego i wytrząsano przez 10 min (2000 obr/min). Oddzieloną fazę organiczną odparowano do sucha, dodano 500 l eteru dietylowego z dodatkiem difeny-

loaminy (100 mg/l) jako IS, mieszano przez kilka sekund i poddano analizie;

- procedura IV (oparta na [35]) – 50 mg proszku MDMA·HCl rozpuszczono w 1 ml buforu węglanowego o pH = 9,0 i otrzymany roztwór mieszano na wytrząsarce przez 30 min (2000 obr/min). Następnie dodano 1 ml octanu etylu i mieszano na wytrząsarce przez 30 min (2000 obr/min). Roztwór wirowano przez 5 min (3000 obr/min). Po odwirowaniu oddzielono warstwę organiczną, odparowano do sucha, dodano 200 l octanu etylu z dodatkiem difenylloaminy (100 mg/l) jako IS, mieszano przez kilka sekund i poddano analizie.

Procedura przygotowania tabletek obejmowała rozdrobnienie tabletek w moździerzu w celu ujednorodnienia i następnie odważaniu 200 mg do każdej analizy. Dodatkowo, w odróżnieniu od sposobu przygotowania próbek syntetycznych, zastosowano filtrację buforu po rozpuszczeniu w nim tabletki. Substancje dodatkowe stanowiące masę tabletkową (np. kwasy tłuszczowe) powodowały powstawanie emulsji i utrudniały proces ekstrakcji, dlatego wykorzystano proces przepuszczania roztworu przez filtr nylonowy.

2.5. Rozdział chromatograficzny

Wybrano cztery warianty parametrów metody GC-MS, które odpowiadały (co do numeru) metodom ekstrakcji. Oryginalne przepisy zamieszczone w publikacjach [18, 19, 20, 27, 28, 35, 37, 38, 39] zostały częściowo zmodyfikowane ze względu na dostępny sprzęt.

W badaniach wykorzystano chromatograf gazowy Hewlett-Packard, seria 6890, sprzężony ze spektrometrem masowym Hewlett-Packard, seria 5973. Rozdział chromatograficzny prowadzono na kwarcowej kolumnie kapilarnej HP5-MS (30 m × 0,25 mm × 0,25 m). Jako gazu nośnego użyto helu (1 ml/min). Dozowanie próbki (2 l) odbywało się w trybie bez dzielenia strumienia gazu nośnego.

Zastosowano następujące programy temperaturowe kolumny:

- procedura I (oparta na [37, 38, 39]) – temperatura początkowa kolumny (50°C) była utrzymywana przez 1 min, następnie wzrastała liniowo z szybkością 10°C/min do 150°C, utrzymywana przez 5,5 min, wzrastała liniowo z szybkością 10°C/min do 280°C i pozostawała niezmienną przez 10 min;
- procedura II (oparta na [27, 28]) – temperatura początkowa kolumny (90°C) była utrzymywana przez 1 min, następnie wzrastała liniowo z szybkością 8°C/min do 310°C i pozostawała niezmienną przez 10 min;
- procedura III (oparta na [18, 19, 20]) – temperatura początkowa kolumny (50°C) była utrzymywana przez 1 min, następnie wzrastała liniowo z szybkością

5°C/min do 150°C, utrzymywana przez 12 min, wzrastała liniowo z szybkością 15°C/min do 300°C i pozostawała niezmienną przez 10 min;

- procedura IV (oparta na [35]) – temperatura początkowa kolumny (80°C) była utrzymywana przez 1 min, następnie wzrastała liniowo z szybkością 35°C/min do 180°C, utrzymywana przez 18 min, wzrastała liniowo z szybkością 50°C/min do 300°C i pozostawała niezmienną przez 2 min.

Temperatura dozownika wynosiła 250°C dla procedur I i II, 280°C dla procedury III oraz 270°C (procedura IV).

Spektrometr masowy pracował w elektronowym trybie jonizacji (EI) i wyposażony był w analizator kwadrupolowy. Temperatury źródła jonów oraz kwadrupola wynosiły odpowiednio 230°C i 150°C. Energia wiązki elektronów wynosiła 70 eV. Widma masowe zbierano w zakresie 50 do 550 amu, natomiast czas rozpoczęcia zbierania danych (ang. solvent delay) ustawiono na 3 min.

2.6. Analiza statystyczna i chemometryczna

Podstawowe obliczenia statystyczne prowadzono, korzystając z programu Excel (Microsoft). Do analizy chemometrycznej wykorzystano pakiet Statistica 8.0 (StatSoft, Tulsa, Stany Zjednoczone).

Zastosowano różne metody przygotowania danych do analizy (normalizacja, ważenie, logarytm, pierwiastek czwartego stopnia). Do obliczenia odległości między próbkami wykorzystano następujące miary: odległość euklidesową, kwadrat odległości euklidesowej, odległość Manhattan, Czebyszewa, odległość mierzoną współczynnikiem korelacji Pearsona (1-r) oraz miarę opartą na pomiarze korelacji z wykorzystaniem cosinusa kąta pomiędzy wektorami odpowiadającymi poszczególnym próbkami.

Podczas analizy skupień przetestowano 7 reguł aglomeracji: metodę pojedynczego wiązania (SL), metodę pełnego wiązania (CL), metodę średnich połączeń (UA), metodę średnich połączeń ważonych (WA), metodę środków ciężkości (UM), metodę ważonych środków ciężkości (mediany) (WM) oraz metodę Warda. Dodatkowo do oceny stopnia zastosowania metod statystycznych i chemometrycznych wykorzystano algorytmy matematyczne: stosunek wartości średnich odległości pomiędzy powiązаныmi i niepowiązаныmi próbkami, wartość współczynnika rozróżnienia (ED) oraz krzywe charakterystyki roboczej odbiorcy, zwane krzywymi ROC.

3. Wyniki i dyskusja

3.1. Wpływ warunków GC-MS na profile zanieczyszczeń

W pierwszym etapie zbadano wpływ parametrów metody GC-MS na jakość otrzymanych profili. Z dwóch próbek syntetycznych wyekstrahowano zanieczyszczenia organiczne czterema metodami i przeprowadzono ich analizę, stosując warunki GC-MS odpowiadające danej metodzie profilowania.

Bez względu na wybór parametrów GC-MS, w trakcie analizy wykryto te same zanieczyszczenia (ich widma masowe były identyczne). Nie jest to zaskoczeniem, ponieważ procedury różniły się głównie programami temperaturowymi kolumny, a w konsekwencji czasem analizy, dlatego piki otrzymane w danych warunkach były jedynie przesunięte względem siebie. Chromatogramy uzyskane po zastosowaniu zestawu I i II warunków GC-MS były bardzo podobne. W przypadku zestawu III całkowity czas analizy był najdłuższy (53 min), co powodowało poszerzanie pików, a w konsekwencji niedostateczną separację związków. Po użyciu zestawu IV uzyskane piki były zazwyczaj słabo rozdzielone, ale czas analizy był najkrótszy (26,3 min). W przypadku niektórych chromatogramów zaobserwowano piki pochodzące od rozpuszczalników, ich zanieczyszczeń oraz fazy stacjonarnej. Niemniej jednak piki te nie przeszkadzały w znaczący sposób w ocenie otrzymanych profili. Na rycinie 1 przedstawiono przykładowe chromatogramy próbek MDMA przeanalizowanej z użyciem czterech zestawów parametrów GC-MS.

Jak wspomniano, różnice w otrzymanych chromatogramach nie wpływały znacząco na ostateczną interpretację wyników. W związku z tym arbitralnie wybrano pierwszy zestaw parametrów GC-MS.

3.2. Wpływ warunków ekstrakcji na profile zanieczyszczeń

W kolejnym etapie zbadano wpływ ekstrakcji na jakość otrzymanych profili. Badania przeprowadzono, używając próbek syntetycznych oraz tabletek *ecstasy*. Porównano cztery wybrane metody ekstrakcji.

Podane warianty ekstrakcji różniły się w głównej mierze zastosowanym buforem i odczynnikiem ekstrahującym, a ponadto niektóre obejmowały wirowanie próbek, a inne tylko wytrząsanie. W metodach I, III i IV zastosowany bufor miał pH zasadowe (I – pH = 10,0; III – pH = 12,0; IV – pH = 9,0), tylko w metodzie II pH buforu wynosiło 7,0. Fakt ten związany był z tym, że większość zanieczyszczeń posiada charakter zasadowy tak jak MDMA, natomiast użycie buforu o pH = 7,0 pozwoliło otrzymać profile zanieczyszczeń o charakterze obojętnym oraz wyeliminować wpływ dużego piku pochodzą-

cego od MDMA na rozdział i analizę chemometryczną. W III procedurze ekstrakcji zastosowano roztwór buforowy o pH = 12,0. Oryginalny przepis przewidywał rozpuszczanie próbki MDMA w buforze o pH = 11,5, ale w jednym z artykułów tych samych autorów wykorzystano do profilowania MDMA bufor o pH = 12,8 [19], dlatego też zdecydowano o użyciu roztworu buforowego o pH = 12,0.

W każdej z metod użyto innego odczynnika ekstrahującego: I – n-heptanu, II – toluenu, III – eteru dietylowego, IV – octanu etylu. Wszystkie te rozpuszczalniki charakteryzują się dość niską względną przenikalnością elektryczną, co umożliwia rozpuszczanie w nich substancji, w których przeważają grupy hydrofobowe.

W przypadku procedur I, II i IV do ekstrakcji próbek syntetycznych odważano 50 mg MDMA (zamiast 200 mg podanych w oryginalnych przepisach). Tylko w III procedurze zachowano oryginalną ilość MDMA (10 mg). Natomiast podczas profilowania zanieczyszczeń MDMA z tabletek *ecstasy* do ekstrakcji pobierano 200 mg próbki. Wybór do badań takiej ilości MDMA wynikał z faktu, że całkowita masa tabletki wynosi 200 mg, a MDMA stanowi 20–30% (średnio ok. 25%) całej masy tabletkowej. Ponadto, jak już wspomniano wcześniej, rozpuszczone w buforze tabletki *ecstasy* były dodatkowo filtrowane, aby ułatwić oddzielanie fazy organicznej.

3.3. Ekstrakcja zanieczyszczeń z próbek syntetycznych

Na rycinie 2 przedstawiono chromatogramy przykładowej próbki MDMA (synteza metodą redukcyjnego aminowania z użyciem amalgamatu glinu (Al/Hg) jako reduktora) otrzymane po zastosowaniu czterech sposobów ekstrakcji I–IV.

Analizując chromatogramy (rycina 2) zaobserwowano, że istotną rolę w kształtowaniu profili zanieczyszczeń odgrywa pH roztworu buforowego użytego do rozpuszczenia próbki MDMA przed ekstrakcją zanieczyszczeń. Stosując odpowiednie pH, można selektywnie ekstrahować zanieczyszczenia o określonym charakterze. Jest to szczególnie widoczne w przypadku II metody ekstrakcji, gdzie pik pochodzący od MDMA jest zdecydowanie mniejszy niż w innych metodach. Fakt ten świadczy o tym, że z pH = 7,0 ekstrahowane są głównie zanieczyszczenia o charakterze obojętnym. Natomiast w przypadku zmiany pH na zasadowe profile są bogatsze w piki pochodzące od zanieczyszczeń zasadowych MDMA.

Po wizualnej ocenie chromatogramów przebadanych próbek syntetycznych stwierdzono, że najbogatsze w piki są profile otrzymane po ekstrakcji metodą III. Jednak głębsza analiza pozwoliła stwierdzić, że część z tych pików pochodzi od rozpuszczalnika, jego zanieczyszczeń oraz fazy stacjonarnej kolumny. Z tego powodu analizowanie chromatogramów było znacznie utrudnione.

Ocenę zastosowanych metod ekstrakcji prowadzono za pomocą metod statystycznych i chemometrycznych. Do analizy wzięto pod uwagę dwa rodzaje danych. Pierwszy rodzaj danych stanowiły wybrane piki odpowiadające charakterystycznym zanieczyszczeniom występującym w próbkach MDMA. Na podstawie badań prowadzonych wcześniej w Instytucie Ekspertyz Sądowych [39] wybrano 47 pików pochodzących od zanieczyszczeń MDMA. W związku z tym zestaw danych składał się z 47 zmiennych i 14 przypadków (14 próbek). Drugi rodzaj danych stanowiły „całe chromatogramy” traktowane jako niezależne punkty (zmiennie), tak więc wymiar macierzy danych wynosił 4612×14 (4612 zmiennych i 14 przypadków).

W pierwszym etapie poddano ocenie różne metody wstępnej obróbki wyników. Pewne algorytmy wymagały „operacji normalizacyjnych”, ponieważ w wielu przypadkach piki podchodzące od niektórych substancji były 100 do 1000 razy większe od pozostałych. Sytuacja ta powodowała problemy w trakcie analizy chemometrycznej, ponieważ duże piki wpływały znacząco na wynik przeprowadzanych operacji matematycznych. Istnieje wiele metod przygotowania danych do analizy statystyczno-chemometrycznej, które mogą być stosowane indywidualnie lub w połączeniu z innymi [13, 25, 29]. Nie jest możliwe przetestowanie wszystkich metod oraz ich kombinacji, w związku z czym autorzy zdecydowali się wybrać do dalszej oceny cztery z nich, które wydawały się adekwatne do założonego celu badań: 1. normalizacja (N) – pole powierzchni każdego pików podzielone jest przez sumę pól powierzchni wszystkich pików; 2. ważenie (W) – pole powierzchni każdego pików podzielone jest przez odchylenie standardowe obliczone dla pól powierzchni wszystkich pików (operacja ta powoduje, że małe piki mają porównywalne znaczenie w analizie jak duże piki); 3. logarytm (log) – obliczenie logarytmu dziesiętnego z pól powierzchni wszystkich pików – znana metoda służąca do zredukowania wpływu dużych pików na wynik analizy (problem „0” został wyeliminowany przez zastąpienie ich w zestawie danych przez „1”); 4. pierwiastek czwartego stopnia (4R) – obliczenie pierwiastka czwartego stopnia z pól powierzchni wszystkich pików – metoda mająca działanie podobne do logarytmowania.

W kolejnym etapie obliczono odległości między próbkami. W tym celu wykorzystano różne miary: odległość euklidesową, kwadrat odległości euklidesowej, odległość Manhattan, Czebyszewa, odległość mierzoną współczynnikiem korelacji Pearsona ($1-r$) oraz miarę opartą na pomiarze korelacji z wykorzystaniem cosinusa kąta pomiędzy wektorami odpowiadającymi poszczególnym próbkom. Obliczone odległości zostały podzielone na dwie grupy odpowiadające powiązanym i niepowiązanym próbkom. Probki MDMA przygotowane tą samą metodą syntezy zostały zaklasyfikowane do próbek powiązanych.

W związku z tym zestaw danych składał się z 26 powiązanych i 65 niepowiązanych odległości.

Ocena poszczególnych zastosowań dokonywana była na trzy sposoby: 1. obliczenie stosunku średnich wartości odległości pomiędzy powiązanymi i niepowiązanymi próbkami (wartość MR); 2. obliczenie wartości współczynnika rozróżnienia (ED) definiowanego jako stosunek średnich wartości odległości próbek niepowiązanych minus odchylenie standardowe do średnich wartości odległości próbek powiązanych plus odchylenie standardowe; 3. obliczenie powierzchni pod krzywą ROC (AUC) [25]. Otrzymane wyniki przedstawiono w tabeli I i II.

W tabeli I porównano różne sposoby wstępnej obróbki danych oraz metody ekstrakcji. Pogrubioną czcionką zaznaczono 8 największych wartości obliczonych parametrów. Wyniki wskazały, że najbardziej efektywną metodą przygotowania danych jest obliczenie pierwiastka czwartego stopnia oraz logarytmu. Zastosowanie kombinacji tych operacji nie zwiększyło efektywności rozróżnienia próbek powiązanych i niepowiązanych. W związku z tym w dalszych obliczeniach wykorzystano pojedynczo operację logarytmowania i pierwiastkowania. Dane zostały także wykorzystane do oceny użytych metod ekstrakcji. Porównując parametry MR , ED oraz AUC można zauważyć, że najwyższe wartości uzyskano dla IV procedury, dlatego przyjęto, że zastosowanie tej metody ekstrakcji prowadzi do najlepszego rozróżnienia próbek powiązanych i niepowiązanych.

W tabeli II porównano zdolność różnych miar odległości do dyskryminacji próbek powiązanych i niepowiązanych. Dla każdej metody wstępnej obróbki danych wybrano po dwie największe wartości MR , ED oraz AUC i zaznaczono je pogrubioną czcionką. Najbardziej efektywne wyniki uzyskano dla odległości mierzonej współczynnikiem korelacji Pearsona ($1-r$) oraz miary opartej na pomiarze korelacji z wykorzystaniem cosinusa kąta pomiędzy wektorami odpowiadającymi poszczególnym próbkom. W niektórych przypadkach wykorzystanie odległości Czebyszewa prowadziło także do dobrego rozróżnienia próbek, jednak autorzy postanowili wybrać do analizy skupień odległości oparte na współczynniku Pearsona oraz na cosinuse.

Wartości wspomnianych wcześniej parametrów były generalnie mniejsze niż oczekiwane oraz mniejsze niż np. wartości ED dla heroiny [13] czy kokainy [25], jednak pozwoliły na porównanie wykorzystanych procedur. Niższe wartości można wytłumaczyć faktem, że podczas badań dysponowano mniejszą liczbą próbek oraz że zanieczyszczenia MDMA cechuje mniejsza specyficzność do rozróżniania metod i partii syntezy niż w przypadku profilowania kokainy i heroiny.

Podczas analizy skupień przetestowano kilka zasad łączenia: metodę pojedynczego wiązania (SL), metodę pełnego wiązania (CL), metodę średnich połączeń (UA), metodę średnich połączeń ważonych (WA), metodę śred-

ków ciężkości (UM), metodę ważonych środków ciężkości (mediany) (WM) oraz metodę Warda. Efektywność grupowania oceniana była na podstawie klasyfikacji próbek MDMA w grupy odpowiadające danej metodzie syntezy. W przypadku, gdy wszystkie próbki zostały odpowiednio podzielone na grupy odpowiadające danej metodzie syntezy, wówczas klasyfikacja była uznana za „poprawną”, natomiast gdy jedna próbka została źle przydzielona – klasyfikacja była uznana za „prawie poprawną”. Po przeprowadzeniu analizy skupień okazało się, że „poprawną” klasyfikację uzyskano po zastosowaniu IV metody ekstrakcji oraz przygotowaniu danych poprzez pierwiastkowanie czwartego stopnia (procedury: 4R + Pearson + WA, 4R + Pearson + UA, 4R + Pearson + Ward, 4R + cosinus + CL, 4R + cosinus + WA, 4R + cosinus + UA, 4R + cosinus + Ward). Na rycinie 3 przedstawiono przykładowy dendrogram próbek MDMA poprawnie sklasyfikowanych.

„Prawie poprawną” klasyfikację otrzymano dla procedury opartej na IV metodzie ekstrakcji oraz logarytmowaniu danych (procedury: Log + Pearson + Ward, Log + cosinus + CL, Log + cosinus + Ward) oraz na I metodzie ekstrakcji i obróbce danych poprzez logarytmowanie (Log + Pearson + Ward).

Porównanie wyników otrzymanych w trakcie analizy skupień prowadzi do wniosku, że najlepsze rezultaty otrzymano, przygotowując dane przez pierwiastkowanie czwartego stopnia (drugie w kolejności jest logarytmowanie) oraz stosując odległość opartą na współczynniku Pearsona i metodę Warda jako regułę aglomeracji.

Jak wspomniano na początku rozdziału, podobne obliczenia przeprowadzono dla „całych chromatogramów” traktowanych jako niezależne punkty (zmiennie). Otrzymane wyniki przedstawiono w tabeli III i IV.

Otrzymane wartości *MR*, *ED* i *AUC* były mniejsze od odpowiednich parametrów przedstawionych w tabeli I i II, co wskazuje, że to zastosowanie jest mniej efektywne niż analiza oparta na wybranych pikach. Wstępnie przygotowane dane poddano analizie skupień. Niestety w przypadku żadnej z zastosowanych procedur nie uzyskano „poprawnej” klasyfikacji próbek. Tylko próbki otrzymane metodą Leuckarta oraz bromowania safrolu zostały przydzielone odpowiednio (przy zastosowaniu najlepszego zestawu dla analizy opartej na wybranych pikach: 4R + Pearson + WA), jednak w większości przypadków próbki nie były sklasyfikowane według grup odpowiadających danej metodzie syntezy. Prawdopodobnie wynika to z faktu, że piki nie pochodzące od zanieczyszczeń MDMA były także poddawane analizie chemometrycznej i wpływały znacząco na otrzymane dendrogramy, dlatego takie zastosowanie nie dało satysfakcjonujących wyników.

3.4. Ekstrakcja zanieczyszczeń z tabletek *ecstasy*

W przypadku tabletek *ecstasy* wnioski dotyczące pH roztworu buforowego były podobne do wyników uzyskanych dla próbek syntetycznych. Po zastosowaniu II metody ekstrakcji pik pochodzący od MDMA był zdecydowanie mniejszy niż w innych metodach. Poza tym profile otrzymane po izolacji z roztworu zasadowego były znacznie bogatsze w piki pochodzące od zanieczyszczeń MDMA, co potwierdza, że większość zanieczyszczeń ma charakter zasadowy, podobnie jak 3,4-metyleniodioksymetamfetamina.

Liczba zanieczyszczeń i ich poziom w próbce narkotyku zależy przede wszystkim od tego, czy i jakie procesy oczyszczania były stosowane po syntezie. Generalnie w syntezie organicznej po przeprowadzeniu reakcji i odparowaniu rozpuszczalnika mieszaninę reakcyjną oczyszcza się, stosując serię ekstrakcji ciec-z-ciecz. W ten sposób otrzymuje się surowy produkt i na tym etapie synteza narkotyku może być zakończona. Jeśli jednak chce się otrzymać produkt lepszej jakości, tj. czystszy, surowy produkt poddaje się dalszym procesom oczyszczania, takim jak destylacja, krystalizacja itp. Tabletki *ecstasy*, które trafiają na rynek narkotykowy, poddawane są najczęściej takim procesom. Wiąże się z tym utrudnienia w profilowaniu MDMA. Uzyskane profile są ubogie w piki pochodzące od zanieczyszczeń, zatem stwierdzenie, jaką metodą syntezy została otrzymana dana próbka, jest często bardzo trudne. MDMA stanowi 20–30% całej masy tabletkowej, a pozostała część to domieszki i lepiszcza dodawane już po syntezie składnika aktywnego. Dodatki te utrudniają interpretację wyników profilowania, dlatego ważnym aspektem w przypadku ekstrakcji próbek rzeczywistych jest dodatkowa filtracja roztworów. We wstępnym etapie analizy tabletek *ecstasy* przeprowadzono ekstrakcję zanieczyszczeń organicznych bez etapu filtracji, jednak tworzenie się emulsji uniemożliwiało oddzielenie i pobranie warstwy organicznej. Sprawdzono także wersję z filtracją po dodaniu rozpuszczalnika organicznego. Jednak używane objętości ekstrahenta w stosunku do objętości roztworu buforowego są kilkakrotnie (w metodzie I i II nawet dziesięciokrotnie) mniejsze, dlatego też jego straty, a tym samym straty zanieczyszczeń, byłyby zbyt duże. Zdecydowano więc, aby etap filtracji zastosować po rozpuszczeniu tabletek w roztworze buforowym.

Do oceny metod ekstrakcji przeprowadzono analizę skupień dla tabletek *ecstasy*. Do badań użyto 15 tabletek pochodzących z 5 partii (po 3 tabletki z każdej serii). Dane przygotowane były w podobny sposób, jak w przypadku próbek syntetycznych (wstępna obróbka danych poprzez obliczenie pierwiastka czwartego stopnia, odległość oparta na współczynniku korelacji Pearsona oraz metoda Warda jako reguła aglomeracji). Na rycinie 4 przedstawiono przykładowy dendrogram dla tabletek *ecstasy* ekstrahowanych z użyciem IV metody.

Jak widać na rycinie 4, tabletki utworzyły cztery grupy odpowiadające danym partiom. Jeden klaster zawierał próbki z dwóch serii, jednak jak wiadomo z dokumentacji tych spraw, te partie były ze sobą powiązane, dlatego też klasyfikacja została uznana za poprawną. W przypadku zastosowania pozostałych metod ekstrakcji (I, II i III) analiza skupień nie doprowadziła do poprawnego grupowania tabletek *ecstasy*. Fakt ten potwierdza, że IV procedura ekstrakcji (bufor węglanowy, pH = 9,0, octan etylu jako odczynnik ekstrahujący) jest najbardziej efektywna spośród testowanych metod.

Dodatkowo należy zaznaczyć, że w przypadku tabletek *ecstasy* uzyskano mało pików pochodzących od zanieczyszczeń MDMA. Fakt ten powodował trudności w interpretacji otrzymanych wyników. Pojawienie się danego pików w przypadku jednej próbki, a drugiej nie, wpływało znacząco na wynik analizy skupień i mogło powodować zmianę klasyfikacji badanych próbek.

4. Wnioski

Badając wpływ warunków GC-MS na otrzymane profile, okazało się, że różnice w stosowanych parametrach nie wpływały znacząco na interpretację wyników. Najlepsze rozróżnienie próbek udało się uzyskać dzięki zastosowaniu IV metody ekstrakcji z użyciem buforu węglanowego o pH = 9,0 oraz octanu etylu jako odczynnika ekstrahującego proponowanej przez Rasheda i in. [35]. W przypadku tej metody próbki syntetyczne MDMA zostały sklasyfikowane poprawnie. Analiza chemometryczna oparta była na wybranych pikach odpowiadających zanieczyszczeniom MDMA. Dane zostały przygotowane poprzez obliczenie pierwiastka czwartego stopnia z pól powierzchni wybranych pików, co spowodowało zredukowanie wpływu dużych pików na wynik analizy. Najlepsze rezultaty otrzymano, stosując podczas analizy skupień odległość oparta na współczynniku Pearsona i cosinusie oraz metodę Warda jako regułę aglomeracji.

Podziękowania

Temat został opracowany w ramach projektu O N204 0060 33 Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego. Autorzy chcieli także podziękować dr Jarosławowi Wilanowskiemu z Wydziału Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego za syntezę próbek MDMA.