

CHEMIA SĄDOWA

**Uniwersytet im. Adama Mickiewicza
Wydział Chemii**



CHEMIA SĄDOWA

Opracowanie:

Beata Jasiewicz
Iwona Kowalczyk
Joanna Kurek
Arleta Sierakowska
Rafał Wawrzyniak

ISBN: 978-83-62783-11-3

Wydanie II

Poznań 2017

Opracowanie:

Beata Jasiewicz, Iwona Kowalczyk, Joanna Kurek, Arleta Sierakowska, Rafał Wawrzyniak

Skrypt przeznaczony jest dla studentów studiów stacjonarnych I oraz II stopnia Wydziału Chemii UAM ze szczególnym uwzględnieniem studentów specjalności chemia sądowa. Jest to II wydanie skryptu zawierające materiał rozszerzony o dodatkowe ćwiczenia.

Spis treści

I.	WPROWADZENIE	5
II.	PODSTAWY TEORETYCZNE	6
III.	CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA	22
	ĆWICZENIE 1 Wykrywanie związków patologicznych w płynach ustrojowych	23
	1.1. Analiza śliny	23
	1.1.1. Wykrywanie jonów tiocyjanowych	23
	1.1.2. Wytrącanie mucyny	23
	1.1.3. Wykrywanie białka w ślinie	24
	1.2. Analiza moczu	25
	1.2.1. Oznaczanie pH moczu	25
	1.2.2. Wykrywanie jonów NH_4^+	25
	1.2.3. Wykrywanie kwasu moczowego	26
	1.2.4. Wykrywanie mocznika	27
	1.2.5. Wykrywanie kreatyniny metodą Jaffego	27
	1.2.6. Wykrywanie kreatyniny metodą Weyla	28
	1.2.7. Wykrywanie indykanu	29
	1.2.8. Wykrywanie związków ketonowych	29
	1.2.9. Wykrywanie barwników żółciowych	30
	1.2.10. Wykrywanie białka kwasem sulfosalicylowym	30
	1.2.11. Wykrywanie białka Bence-Jonesa	31
	1.2.12. Półilościowe oznaczanie cukru w moczu – próba Benedicta	31
	1.2.13. Wykrywanie urobiliny - próba Bogomołowa	32
	ĆWICZENIE 2 Identyfikacja alkaloidów oraz niektórych leków w moczu	34
	2.1. Wykrywanie alkaloidów w moczu	35

2.2. Wykrywanie leków przeciwbólowych, przeciwzapalnych i nasennych w moczu	38
2.3. Wykrywanie opioidów w moczu	40
2.4. Oznaczanie metabolitów aspiryny w moczu	41
ĆWICZENIE 3 Ocena narażenia na toluen – oznaczanie kwasu hipurowego w moczu	43
ĆWICZENIE 4 Oznaczanie leków przeciwdepresyjnych w paznokciach i włosach	45
4.1. Oznaczanie środków przeciwdepresyjnych w paznokciach	46
4.1.1. Oznaczanie haloperidolu	46
4.1.2. Oznaczanie flupentixolu	47
4.1.3. Oznaczanie citalopramu i desmetylocitalopramu	48
4.1.4. Oznaczanie acebutololu i kwasu salicyłowego	49
4.2. Oznaczanie środków przeciwdepresyjnych we włosach	50
4.2.1. Oznaczanie haloperidolu i flupentixolu	50
4.2.2. Oznaczanie citalopramu i desmetylocitalopramu	51
4.2.3. Oznaczanie acebutololu i kwasu salicyłowego	51
ĆWICZENIE 5 Analiza włosów na obecność metali ciężkich	53
ĆWICZENIE 6 Oznaczanie nikotyny oraz amfetaminy i jej pochodnych we włosach za pomocą metody mikroekstrakcji z fazy nadpowierzchniowej (HS-SPME)	55
ĆWICZENIE 7 Identyfikacja muscymolu w próbkach grzybów z wykorzystaniem techniki GC-MS	60
ĆWICZENIE 8 Oznaczanie zawartości alkoholu etylowego w płynach ustrojowych człowieka metodą chromatografii gazowej HEAD-SPACE	64
ĆWICZENIE 9 Metody identyfikacyjne w chemii sądowej	69
9.1. Analiza odcisków palców	69
9.1.1. Ujawnianie odcisków palców za pomocą proszków daktyloskopijnych	69
9.1.2. Ujawnianie odcisków palców za pomocą par jodu	70
9.1.3. Ujawnianie odcisków palców za pomocą roztworu ninhydryny	71

9.1.4. Ujawnianie odcisków palców za pomocą za pomocą metody cyjanoakrylowej i barwnika <i>BASIC YELLOW 40</i>	73
9.1.5. Ujawnianie śladów linii papilarnych roztworem bazującym na reakcji red-ox	74
9.1.6. Ujawnianie śladów krwawych za pomocą luminolu i barwnika <i>AMIDO BLACK</i>	76
9.1.7. Ujawnianie śladów krwawych za pomocą leukofluoresceiny i H ₂ O ₂	78
9.2. Analiza odcisków uszu	80
9.2.1. Ujawnianie odcisków uszu za pomocą proszków daktyloskopijnych i białego cementu	80
9.2.2. Ujawnianie odcisków uszu za pomocą ninhydryny	80
9.2.3. Ujawnianie odcisków uszu za pomocą par jodu.....	81
9.3. Ujawnianie śladów stóp, butów oraz opon samochodowych za pomocą odlewów gipsowych	82
9.4. Ujawnianie usuniętych numerów i oznaczeń z klucza	83
ĆWICZENIE 10 Analiza materiałów dowodowych na obecność narkotyków	85
10.1. Analiza materiałów dowodowych na obecność amfetaminy i jej pochodnych.....	86
10.1.1. Analiza proszków na obecność amfetaminy	86
10.1.2. Analiza jakościowa proszków proszku na obecność amfetaminy (TLC)	87
10.1.3. Analiza tabletek na obecność pochodnych amfetaminy	88
10.2. Analiza materiałów dowodowych na obecność Δ^9 -tetrahydrokanabinolu (Δ^9 -THC) – TLC.....	88
ĆWICZENIE 11 Badania identyfikacyjno-porównawcze materiałów kryjących na dokumencie (analiza żeli długopisowych)	89
ĆWICZENIE 12. Ujawnianie tekstu nakreślonego atramentem sympatycznym..	92
IV. PIŚMIENICTWO.....	99

I. WPROWADZENIE

Chemia sądowa jest jedną z dziedzin nauk sądowych wspomagających rozwiązywanie spraw kryminalnych. Stosowana jest przede wszystkim w kryminalistyce i toksykologii sądowej.

W kryminalistyce, spośród wielu zadań, dla chemików sądowych najważniejszym jest analiza i identyfikacja różnego rodzaju śladów znalezionych na miejscu przestępstwa oraz zabezpieczonych materiałów dowodowych. Zadaniem toksykologii sądowej jest przede wszystkim analiza materiału dowodowego pod kątem obecności substancji toksycznych zagrażających zdrowiu i życiu człowieka, takich jak: narkotyki, leki psychotropowe, alkohol, metale ciężkie i inne toksyny organiczne i nieorganiczne.

Zawarte w niniejszym skrypcie ćwiczenia obejmują dwie, oparte na wiedzy chemicznej, dyscypliny nauk sądowych: toksykologię sądową i fizykochemię kryminalistyczną. Służą one przedstawieniu metod doświadczalnych i dróg realizacji takich tematów jak:

Analiza materiału biologicznego

Metody identyfikacji kryminalistycznej

Ekspertyza traseologiczna

Ujawnianie i zabezpieczanie śladów mechanoskopijnych

Analiza materiału dowodowego na obecność narkotyków

Badanie dokumentów

II. PODSTAWY TEORETYCZNE

ANALIZA MATERIAŁU BIOLOGICZNEGO

Materiał biologiczny pochodzenia ludzkiego, zwierzęcego bądź roślinnego zwany jest w kryminalistyce śladem biologicznym. W praktyce kryminalistycznej ślady biologiczne można podzielić na trzy grupy:

pochodzenia tkankowego - np. krew, paznokcie, włosy, zęby, kości, fragmenty roślin
wydzieliny - ślina, nasienie, wydzielina łojowa, wydzielina pochwowa, pot

wydaliny - kał, mocz, wymiociny, smółka płodowa.

Ślad biologiczny jest śladem szczególnego rodzaju gdyż wilgoć i wysoka temperatura sprzyja rozwojowi procesów gnilnych oraz rozwoju mikroorganizmów, które całkowicie niszczą zabezpieczony ślad. Najczęściej analizowanym materiałem biologicznym są plamy krwi, włosy, ślady śliny oraz mocz.

ŚLINA

Ślina (łac. *saliva*) to płyn produkowany przez gruczoły ślinowe zwierząt. W organizmie człowieka wytwarzana jest przez trzy pary dużych ślinianek i przez około 200-400 mniejszych gruczołów ślinowych, które są rozmieszczone w całej jamie ustnej z wyjątkiem dziąseł i przedniej części podniebienia twardego.

Skład śliny zależny jest od wielu czynników, między innymi od wieku i płci. Na przykład u mężczyzn zawartość jonów wapnia, sodu i fosforu jest większa niż u kobiet. Około 99,5% śliny stanowi woda, reszta to związki nieorganiczne 0,2%, organiczne 0,3% oraz martwe i żywe komórki.

W ślinie obecne są kationy Mg^{2+} , Ca^{2+} , Na^{+} oraz K^{+} , a także amoniak powstający z deaminacji aminokwasów pochodzących z płytki nazębnej i płynu dziąsłowego (głównie argininy). W ślinie obecnych jest kilka grup anionów. Aniony ortofosforanowe ($H_2PO_4^{-}$, HPO_4^{2-} , PO_4^{3-}) i węglanowe (HCO_3^{-} , CO_3^{2-}) wykazują równocześnie właściwości buforowe śliny. Druga grupa to aniony: chlorkowe (Cl^{-}), fluorkowe (F^{-}), cytrynianowe ($C_6H_7O_7^{-}$, $C_6H_6O_7^{2-}$, $C_6H_5O_7^{3-}$) oraz rodankowe (SCN^{-}). Te ostatnie są produktem detoksykacji pobieranego z pokarmem CN^{-} i wykazują działanie bakteriobójcze.

Spośród związków organicznych obecnych w ślinie należy wymienić: peptydy (np. opiorfina, endogenna substancja działająca przeciwbólowo), polipeptydy o dużej zawartości

CHEMIA SĄDOWA

histrydyny (działanie bakteriobójcze dla *S. mutans* i *C. albicans*), białka, wśród których dużą grupę stanowią enzymy oraz czynniki wzrostu.

Powszechnie znaną funkcją śliny jest funkcja trawienna. Wśród enzymów peroksydazy śliny, białkowymi enzymami trawiennymi są między innymi: amylaza ślinowa, α -D-glukozydaza, maltaza. Ślina pełni także funkcję wydalniczą, gdyż wraz z nią wydzielanych i wydalanych jest wiele substancji takich jak mocznik, kwas moczowy, alkohol, morfina, jodki, tiocyjanki, hormony i niektóre metale ciężkie (Hg, Pb, Bi).

Substancjami niebiałkowymi wykrywanymi w ślinie są metabolity związków azotowych: mocznik, kwas moczowy i kreatynina. Obecne także są aminokwasy, węglowodany (np. glukoza), lipidy, w tym cholesterol i kortykosterydy pochodzące z wydzieliny ślinianek przyusznych. U ok. 80% ludzi w ślinie obecne są także substancje grupowe krwi (mucyny będące nośnikami antygenów grupowych), dzięki którym można określić grupę krwi w układzie AB0 opierając się jedynie na badaniu śliny.

W przyszłości badanie śliny może pełnić funkcję diagnostyczną dla wielu poważnych chorób, podobnie jak badanie krwi. Skład śliny zmienia się bowiem w zależności od aktualnego stanu fizjologicznego organizmu. Obecnie na podstawie badania śliny można wykazać obecność biomarkerów raka trzustki oraz raka jamy ustnej. Ślina jest również użyteczna w diagnostyce HIV-1 i HIV-2 oraz wirusów zapalenia wątroby typu A, B i C. Ślinianki są ukrwione, co powoduje, że w ślinie, która jest częściowo przesączem osocza, znajdują się substancje przenoszone przez krew takie jak leki i hormony. Cząsteczki lipofilowe oraz obojętne występują w ślinie w takim samym stężeniu jak w osoczu, słabe kwasy w mniejszym, a słabe zasady w większym stężeniu. Dzięki temu możliwe jest diagnozowanie obecności w ślinie np. etanolu, teofiliny, antypiryny, digoksyny, niektórych hormonów (testosteron, estriol, progesteron i jego 17-OH pochodna, kortyzol). Ślina umożliwia też diagnostykę mikrobiologiczną. Sialometria jest badaniem pozwalającym zmierzyć ilość i szybkość wydzielania śliny przez ślinianki. Pomaga ono w zdiagnozowaniu chorób wydzielania śliny.

MOCZ

Badanie moczu należy do podstawowych badań analitycznych wykonywanych w laboratoriach klinicznych. Mocz jest produktem czynności nerek i zawiera prawie wszystkie końcowe produkty przemiany materii. W warunkach fizjologicznych przez nerki przepływa w ciągu 1 minuty ok. 1,2 litra krwi (tj. ok. 0,6 litra osocza), co stanowi 25% minutowej

CHEMIA SĄDOWA

pojemności serca. W tej samej jednostce czasu powstaje z przepływającego osocza ok. 120 cm³ przesącza kłębuszkowego, zwanego moczem pierwotnym, a jego skład chemiczny jest taki sam jak skład osocza pozbawionego białka. Z całości wytworzonego w ciągu doby moczu pierwotnego powstaje około 1-1,5 litra moczu ostatecznego. Rutynowo w badaniu najpierw ocenia się własności fizyczne i chemiczne, a na końcu osad. Mocz prawidłowy ma barwę jasnożółtą (słomkową), która zależy od barwników: urochromu (prawdopodobnie z przemiany tryptofanu) i urobiliny (redukcja bilirubiny daje bezbarwny urobilinogen, który utleniając się przechodzi w urobilinę). Bilirubina normalnie nie występuje w moczu, natomiast jeśli mocz ją zawiera to po pewnym czasie przybiera zabarwienie zielone. Mocz prawidłowy jest zwykle przejrzysty i klarowny, ale z upływem czasu mętnieje. Natomiast mocz od początku mętny może wskazywać na ropne zapalenie dróg moczowych oraz niektóre postaci kamicy nerkowej. Prawidłowy mocz wykazuje odczyn lekko kwaśny, pH jest równe 5,5-6,5. W przypadku wystąpienia niektórych schorzeń jego odczyn może być obojętny, a nawet zasadowy.

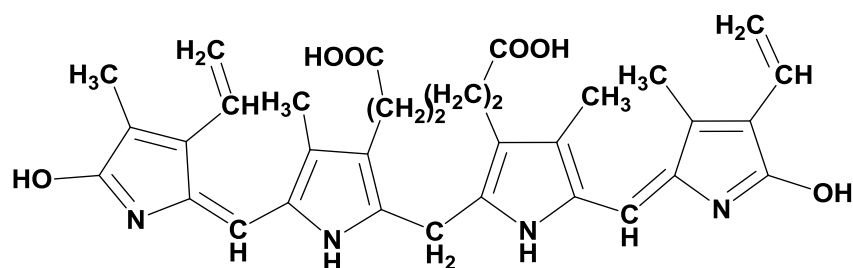
Ciężar właściwy moczu jest bardzo istotnym parametrem i powinien wynosić od 1,016-1,022 kg/l. Wystąpienie niższych wartości świadczyć może o utracie bardzo ważnej funkcji nerek, jaką jest zagęszczanie moczu. Taki wynik często sugeruje rozpoczynającą się niewydolność nerek.

Rozróżniamy mocz prawidłowy i patologiczny. W stanach patologicznych z moczem wydalane są substancje, które w warunkach prawidłowych praktycznie nie pojawiają się w moczu lub są wydalane w bardzo małych ilościach i taki mocz określamy jako patologiczny. Do patologicznych składników moczu należą: białko, ciała ketonowe, glukoza, bilirubina, kwasy żółciowe, hemoglobina, zwiększona ilość urobilinogenu. Przyczyny wydalania substancji patologicznych mogą być różne; związane nie tylko z zaburzeniami czynności nerek, ale także ze schorzeniami (zaburzeniami metabolizmu) innych narządów.

Badanie moczu może pomóc w rozpoznaniu choroby nerek i wątroby oraz dróg moczowych. Pozwala również ocenić predyspozycje do tworzenia się kamieni, a także ułatwia diagnozę cukrzycy i żółtaczki.

Badanie moczu przeprowadza się na obecność dwóch barwników: urobilinogenu oraz bilirubiny. Podstawowym barwnikiem żółciowym jest bilirubina, która powstaje w wyniku rozpadu krwinek czerwonych i hemoglobiny. Barwnik ten nie powinien występować w moczu w większych ilościach, w osoczu zdrowego człowieka jego stężenie wynosi 0,2-1,0 mg/100 ml. Duże stężenie barwników żółciowych w moczu świadczy o niewydolności

uszkodzonej wątroby w wyniku żółtaczki hemolitycznej bądź mechanicznym jej uszkodzeniu. Natomiast urobilinogen u zdrowego człowieka wydalany jest z moczem w śladowych ilościach (ok. 4 mg / dobę).



BILIRUBINA

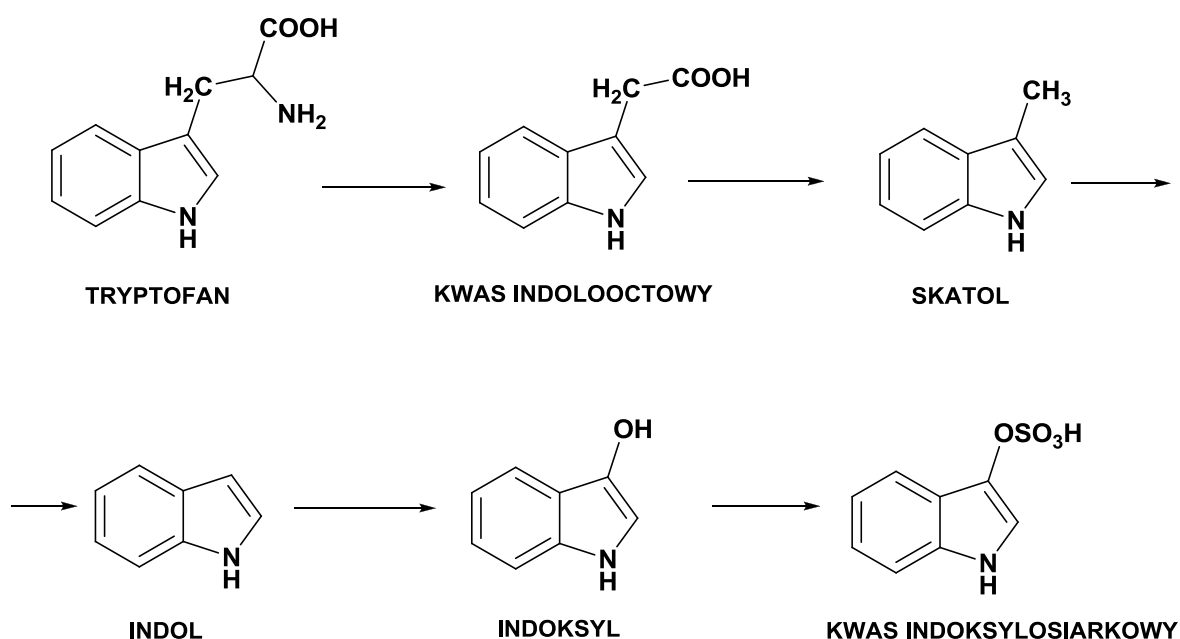
U ludzi zdrowych w moczu białka wydalone są w niewielkiej ilości do 100 mg na dobę. Znaczne ilości białka (białkomocz) może towarzyszyć kamicy nerkowej, zapaleniom dróg moczowych, a także, u niektórych pacjentów z niewydolnością krążenia czy w czasie wysokiej gorączki, w przebiegu chorób ogólnoustrojowych.

W zdrowych nerkach białka osocza przedostają się do moczu w bardzo małych ilościach ze względu na zbyt duży rozmiar i ujemny ładunek. Białko Bence'a-Jonesa jednak jest na tyle małe, że z łatwością przedostaje się przez błonę filtracyjną do moczu. Ten rodzaj białkomoczu określa się jako białkomocz z przeładowania, inaczej białkomocz nadmiarowy. U zdrowego człowieka nie wykrywa się w moczu białka Bence-Jonesa. Badanie to jest wykonywane przy podejrzeniu gammapatii monoklonalnych, takich jak **szpiczak mnogi** (szpiczak plazmocytowy) czy **makroglobulinemia Waldenstroma**. Stanowi ono jedno z ważnych kryteriów diagnostycznych w tych chorobach. Schorzenia te powstają w wyniku nowotworowego rozrostu pojedynczego klonu komórek nazywanych plazmocytami. Komórki te produkują w nadmiarze jeden rodzaj immunoglobulin, czyli tak zwane białko M, których lekkie łańcuchy są z łatwością przefiltrowywane przez nerki do moczu i wykrywane w badaniach jako białko Bence-Jonesa. Białko to może też być wykryte zupełnie przypadkowo, kiedy to w badaniu ogólnym moczu stwierdzi się białkomocz, a w bardziej szczegółowych badaniach okazuje się, że jest to białkomocz Bence-Jonesa. Należy wówczas natychmiast rozpocząć dalszą diagnostykę w kierunku gammapatii monoklonalnych. Sama obecność tego białka w moczu często staje się przyczyną niewydolności nerek w przebiegu szpiczaka mnogiego, ponieważ gromadzące się w nich złogi łańcuchów lekkich działają na nerki uszkadzająco.

Kolejnym istotnym parametrem jest stężenie cukru w surowicy krwi. Obecność cukromoczu informuje między innymi o nieprawidłowym leczeniu cukrzycy.

W moczu obecna jest też kreatynina będąca produktem degradacji kreatyny.

Ilość indykanu w prawidłowym moczu jest nieznaczna (do 20 mg na dobę). Indykan tworzy się w wyniku działania bakterii, szczególnie *Escherichia coli* na tryptofan. Tryptofan przechodzi kolejno w kwas indoloctowy, skatol i indol. Indol w wątrobie ulega utlenieniu do silnie toksycznego indoksyłu, który w organizmie ulega detoksykacji na drodze sprzężania z kwasem glukuronowym. Powstająca sól potasowa kwasu indoksyloglukuronowego nosi nazwę indykanu. Ilość wydzielanego indykanu jest miarą nasilenia procesów gnilnych w organizmie.



Ciała ketonowe to prawidłowe produkty metabolizmu syntetyzowane w wątrobie z acetylo-CoA. Należą do nich: aceton, acetoctan i β -hydroksymaślan. W warunkach prawidłowych ich stężenie we krwi jest bardzo niewielkie i wynosi od 0,2 do 0,8 mg/100 cm³. Ciała ketonowe u zdrowego człowieka wydalone są z moczem w bardzo małych ilościach do 20 mg na dobę i nie można ich wykryć stosowanymi dotychczas metodami. W pewnych warunkach np. w niedożywieniu czy na diecie wysokotłuszczowej oraz w stanach gorączkowych, a także przy ciężkiej niewydolności nerek może dochodzić do wzmożonej syntezy tych związków w wątrobie.

W osadzie moczu mogą być obecne nabłonki, które pochodzą z nerek i dróg moczowych, a ich obecność nie ma istotnego znaczenia rozpoznawczego. Natomiast nadmierne wydalanie leukocytów (krwinek białych) może być objawem leukocyturii, której przyczyną mogą być

ostre i przewlekłe bakteryjne zakażenia układu moczowego. Erytrocyty (krwinki czerwone) w moczu zdrowego człowieka mogą być wydalane w liczbie nie przekraczającej 3 milionów na dobę, a źródłem krwimoczu może być uszkodzenie zarówno nerki, jak też każdego odcinka dróg moczowych. Najczęstszą przyczyną jest kamica nerkowa, czy też atak kolki nerkowej.

Walczki są to białkowe odlewy mikro fragmentów nerki i należą do niekorzystnych składników w badaniu moczu, ponieważ najczęściej świadczą o poważnej patologii nerek. W prawidłowym moczu o odczynie lekko kwaśnym mogą występować niewielkie ilości kryształów kwasu moczowego, szczawianów i moczanów wapnia.

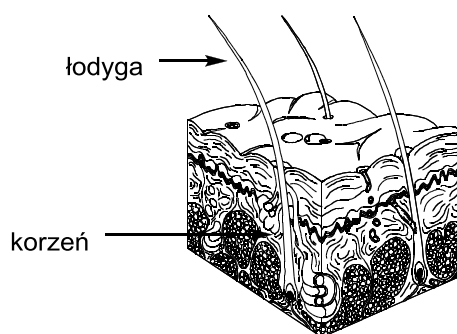
Wiele związków chemicznych ma szkodliwy wpływ na tkanki i narządy organizmu ludzkiego. W celu określenia stopnia zagrożenia zawodowego coraz częściej wykonuje się pomiar stężenia substancji chemicznych lub ich metabolitów w płynach biologicznych. Ze względu na swoje właściwości i sposób pobierania próbki to właśnie mocz jest najczęściej wykorzystywany przy badaniach oceny narażenia środowiskowego i zawodowego. Mocz jest materiałem niezwykle bogatym w niezbędne informacje na temat funkcjonowania organizmu i efektów narażenia go na szkodliwe substancje pochodzące z otaczającego środowiska. W moczu mogą pojawiać się określone związki chemiczne, ksenobiotyki lub ich metabolity (biomarkery) które normalnie nie powinny się w nim znajdować. Biomarkery są wskaźnikiem zmian, które mogą zachodzić w organizmie w wyniku oddziaływań czynników szkodliwych o bardzo zróżnicowanej budowie i pochodzeniu. Wśród biomarkerów możemy wyróżnić związki nieorganiczne (np. nikiel, rtęć, cynk), związki organiczne (np. benzen, toluen, fenol, alkohol metylowy) oraz halogenowodory (np. chloroform, tetrachloroeten).

WŁOSY I PAZNOKCIE

Badania płynów ustrojowych takich jak krew, ślina czy mocz mające na celu oznaczenie i identyfikację różnorodnych składników często napotykają na trudności. Eliminacja składników z organizmu człowieka (alkohol, narkotyki, leki, środki psychotropowe), w kierunku których prowadzi się badania, z krwi czy moczu jest stosunkowo szybka i po dłuższym czasie trudno jest stwierdzić ich obecność w płynie ustrojowym badanego człowieka. Alternatywną metodą, pozwalającą na stwierdzenie obecności pewnych związków w organizmie badanej osoby nawet już po zaprzestaniu ich przyjmowania, jest analiza włosów. Od wielu lat stosuje się badania związane z analizą włosów na określone składniki, co związane jest z faktem iż badanie płynów ustrojowych ma swoje ograniczenia czasowe.

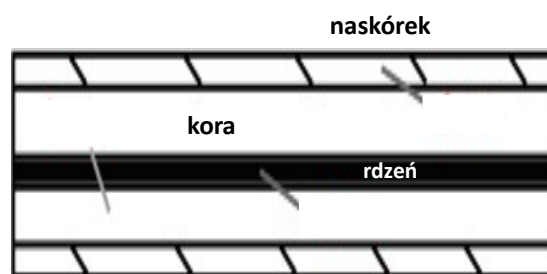
Włosy jako materiał do badań narażenia na trucizny znajdują się w polu zainteresowania od przeszło stu lat. Pierwsze analizy związane były głównie z wykrywaniem arsenu i rtęci. Już w 1858 roku opublikowano pierwszą informację o wykryciu arsenu we włosach z ekshumowanego po 11 latach ciała. Jednak dopiero od 1960 roku włosy ludzkie stały się materiałem do badań zawartości innych pierwiastków w organizmie człowieka. Na całej długości włosa gromadzą się bowiem minerały i substancje aktywne obecne w organizmie. Za pośrednictwem plazmy, limfy i płynów, stanowiących środowisko metaboliczne, wszystkie elementy nierozpuszczalne takie jak: leki, środki odurzające, metale, mikroelementy, docierają do cebulki i można je wykryć podczas analizy.

Włosy porastają u człowieka prawie całe ciało, a najwięcej znajduje się na skórze głowy. Włos jest zrogowaciałym tworem naskórka pokrywającym skórę, zbudowany jest z części zwanej łodygą położonej powyżej skóry oraz korzenia położonego pod powierzchnią skóry. Głównym materiałem budulcowym włosa jest keratyna. Natomiast obecna we włosach melanina jest składnikiem odpowiedzialnym za jego kolor. Miesięczny przyrost włosa wynosi około 1 centymetra.



Budowa włosa

Diagram włosa



CHEMIA SĄDOWA

Naskórek włosa stanowi najbardziej zewnętrzną część włosa, odporną chemicznie. Różni się między poszczególnymi gatunkami zwierząt. Może przybierać różne kształty.

- Koronowa struktura naskórka



- Struktura brukowa (kostki brukowe)



Rdzeń włosa - najbardziej wewnętrzna część włosa, nie zawsze obecna.

Typy: Typ ciągły —————

Typ przerywany - - - - -

Typ rozdrobniony (fragmentaryczny) —····—

Brak rdzenia

Obecnie w wielu krajach badanie włosów traktowane jest jako rutynowa metoda stosowana w medycynie sądowej, w medycynie komunikacyjnej i toksykologii klinicznej.

Od niedawna do analizy toksykologiczno – sądowej wprowadzona została także analiza paznokci, które są potencjalnym, alternatywnym do włosów, materiałem dowodowym, gdyż nie zawsze badany (podejrzany / poszkodowany) ma włosy. Pobieranie paznokci do badań jest metodą nieinwazyjną, ponadto zebrane materiały nie wymagają żadnych szczególnych warunków transportowania czy przechowywania.

CHEMIA SĄDOWA

Zarówno paznokcie jak i włosy zbudowane są z keratyny i określane jako przydatki skóry. Wzrost paznokcia przeciętnie wynosi 3 mm na miesiąc, jednak wartość ta może być różna, ze względu na cechy osobnicze i tryb życia człowieka. Przyrost płytki paznokciowej kciuka w ciągu doby wynosi 0,1 mm, a całkowity odrost paznokci u rąk wynosi około 3-6 miesięcy, natomiast u stóp średnio 12-18 miesięcy. Na to jak szybko rosną paznokcie ma wpływ płeć, wiek (najszybciej rosną w 2 i 3 dekadzie życia, z wiekiem wzrost paznokci jest coraz wolniejszy), dieta, czynniki dziedziczne, pora roku (zaobserwowano, że paznokcie rosną szybciej latem niż zimą).

Materiał biologiczny jakim są włosy i paznokcie może być wykorzystany do badań w czasie życia jak i po śmierci badanego. Ponadto są materiałem, który można wykorzystać do badań toksykologicznych wiele miesięcy po zaprzestaniu zażywania leku. Z reguły wykorzystywanym materiałem biologicznym są włosy, a metody analizy paznokci stanowią alternatywną formę badań.

METODY IDENTYFIKACJI KRYMINALISTYCZNEJ

DAKTYLOSKOPIA jest jedną z najstarszych i zarazem najpowszechniejszą metodą identyfikacji człowieka. Zajmuje się identyfikacją osób na podstawie wizerunku linii papilarnych. Dzięki trzem głównym cechom jakie posiadają linie papilarne na opuszkach palców badania daktyloskopijne są praktycznie niezawodne. Wzory linii papilarnych nie zmieniają się zasadniczo przez całe życie człowieka, są nieusuwalne, gdyż regenerują się wraz z naskórkiem i nie można ich usunąć prostymi sposobami. Ponadto wzory linii papilarnych są indywidualne, charakterystyczne dla każdego człowieka.

Jakość wzorów linii papilarnych pozostawionych na powierzchniach jest uzależniona od wielu czynników. Istotna jest temperatura danej powierzchni. Lepsze odciski powstają gdy dotykana powierzchnia ma temperaturę niższą od temperatury ciała. Pozostawione na przedmiotach ślady linii papilarnych są tym wyraźniejsze im bardziej jest ona chropowata czy szorstka. Działanie sił adhezji jest wtedy silniejsze. Metodę pobierania śladów odcisków palców dobiera się odpowiednio do rodzaju powierzchni na jakiej zostały one zostawione.

W przypadku trudności w doborze odpowiedniego proszku daktyloskopijnego do zastosowania na danej powierzchni najpierw wykonuje się testy różnych proszków daktyloskopijnych, a następnie tym najlepszym pobiera się ślady dowodowe.

Pozostawione ślady linii papilarnych są niewidoczne dla oka, dlatego w pierwszym etapie oględzin miejsca zdarzenia należy posłużyć się lampą UV. Badanie prowadzi się w zakresie światła niebieskiego (440-445 nm). Powoduje ono fluorescencję wielu płynów ustrojowych. Po odnalezieniu właściwych śladów można w kolejnym etapie zastosować proszki daktyloskopijne lub inne metody zestawione poniżej:

Proszki daktyloskopijne – są to proszki stosowane rutynowo przez grupy ekspertów zajmujących się ujawnianiem odcisków palców i innych śladów. Z chemicznego punktu widzenia proszki daktyloskopijne można podzielić na 4 rodzaje: podstawowe, wykazujące luminescencję, metaliczne i termoplastyczne. Do najczęściej stosowanych substancji zalicza się biel cynkową, argenterat (pył glinowy), grafit, sadzę angielską, tkanol, sproszkowane żelazo i tlenki metali np. tlenek żelaza(III). Do ujawniania pozostawionych śladów linii papilarnych z powodzeniem stosuje się też biały cement. Najlepsze rezultaty otrzymuje się badając za ich pomocą wszelkie powierzchnie gładkie np. szklane. Odcisk palca zawiera substancje potowo-tłuszczowe, zawarta w nich woda i związki tłuszczowe powodują

przyleganie do nich proszku na skutek sił adhezji. Siła adhezji jest proporcjonalna do powierzchni wzajemnego kontaktu cząstek proszku ze śladem.

Pary jodu – do analizy stosuje się jod w postaci stałej (kryształki) lub lotnej (pary). Ślady ujawnione pod wpływem jodu są widoczne przez stosunkowo krótki czas. W celu utrwalenia w ten sposób ujawnionych odcisków palców należy przeprowadzić dodatkowe reakcje chemiczne (np. ze skrobią) lub wykonać zdjęcie fotograficzne.

Roztwór ninhydryny jest najczęściej stosowany do ujawniania odcisków palców na powierzchniach papierowych i drewnianych. Metoda ta jest szeroko stosowana podczas badań śledczych, gdyż pozwala na wykrywanie zarówno odcisków świeżych jak i tych pozostawionych nawet kilka lat wcześniej (nawet po 20 latach na papierowych tapetach ścian, różnego rodzaju papierowych dokumentach).

Metoda cyjanoakrylowa została wynaleziona w 1978 roku w Oddziale Identyfikacji Kryminalnej Japońskiej Policji Narodowej. W praktyce kryminalistycznej stosuje się specjalny pistolet z palnikiem zawierający cyjanoakryl. Dzięki temu uzyskuje się formę sprayu nanoszonego na daną powierzchnię i w wyniku reakcji cyjanoakrylu z wodą zawartą w odcisku tworzy się biało-szary osad. Często, dla wzmocnienia efektu, taki ślad zabezpiecza się jeszcze proszkiem daktyloskopijnym (np. fioletem krystalicznym) lub spryskuje roztworem fluorescencyjnym (np. Rodaminą 6G lub Safraniną 0). Jeżeli badany przedmiot z pozostawionymi odciskami jest dostatecznie mały, ślady można ujawnić w komorze cyjanoakrylowej. Za pomocą tej metody ujawnia się odciski palców na gładkich powierzchniach np. metalach, powierzchniach plastikowych czy gumie.

Inne metody – to np. oddziaływanie pędzlem magnetycznym przy zastosowaniu proszków ferromagnetycznych, albo metoda oddziaływania promieniem lasera argonowego czy miedziowego. W przypadku tego ostatniego do ujawniania odcisków na przedmiotach metalowych, szklanych i plastikowych stosuje się pary estru cyjanoakrylowego po czym badany materiał poddaje się działaniu barwnika, a następnie przemywa metanolem. Wyraźne ślady linii papilarnych łatwo można zaobserwować w wiązce promieni lasera miedziowego i sfotografować.

Do coraz częściej stosowanych innych metod identyfikacji kryminalistycznej należą między innymi:

CHELIOSKOPIA – identyfikacja człowieka na podstawie śladów czerwieni wargowej

OTOSKOPIA - identyfikacja człowieka na podstawie śladów małżowiny usznej

ODONTOSKOPIA - identyfikacja człowieka na podstawie śladów zębów

Przykładowe ślady linii papilarnych ujawnione za pomocą różnych proszków



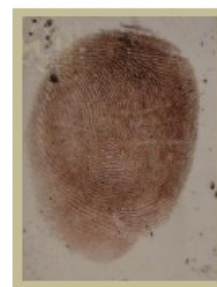
pary jodu



proszek grafitowy



sproszkowane żelazo



tlenek żelaza (III)

EKSPERTYZA TRASEOLOGICZNA

Traseologia zajmuje się analizą śladów przemieszczania się osób, pojazdu lub zwierzęcia pozostawionych na miejscu zdarzenia. Zabezpieczony ślad obuwia umożliwia między innymi identyfikację rodzaju obuwia, jego rozmiaru, czasem producenta. Bardzo często możliwe jest także określenie płci, wagi i wzrostu podejrzanej osoby oraz jej cech sprawności fizycznej (osoba starsza, człowiek wysportowany itp.). Badania te nie są już tak popularne jak kiedyś ze względu na ogólnie stosowaną twardą nawierzchnię dróg (asfalt, płyty chodnikowe). Bywają jednak istotne w odniesieniu do śladów opon samochodowych pozostawionych na asfalcie. Na ich podstawie można określić np. drogę hamowania samochodu.

UJAWNIANIE I ZABEZPIECZANIE ŚLADÓW MECHANOSKOPIJNYCH

Mechanoskopia zajmuje się badaniem śladów oddziaływania jednego przedmiotu (narzędzia) na drugi oraz analizą samego przedmiotu. Mikrostruktura użytego narzędzia jest bardzo istotna, gdyż w trakcie jego stosowania ulega on zniekształceniu, dzięki czemu możliwa jest jego identyfikacja. Analizowane są zarówno cechy grupowe narzędzi (powstałe w toku produkcji np. wada formy odlewniczej pozostawia ślad na wszystkich wytworzonych narzędziach) jak i indywidualne, charakterystyczne dla danego egzemplarza narzędzia (powstałe w toku produkcji, używania oraz napraw, regeneracji czy renowacji).

Ślady narzędzi występują przede wszystkim jako zmiany w zewnętrznej geometrii ciał stałych oraz jako następstwa tych zmian. Podstawowe mechanizmy powstawania śladów mekhanoskopijnych to: wygniatanie, tarcie oraz cięcie.

Ślady ze względu na mechanizm ich powstawania można podzielić na dwie grupy:

- ślady odkształceń podłoża powstałe w miejscu bezpośredniego kontaktu z określonym ciałem stałym,
- ślady mechaniczne odkształceń podłoża w wyniku działania wypadkowej dwóch lub więcej sił.

Ze względu na fakt, że ślady te są dostatecznie widoczne nie ma konieczności ich ujawniania. Przy mniejszych śladach ujawnia się je optycznie powiększając 5-8 razy za pomocą lupy. Ślady takie należy odpowiednio zabezpieczyć pod względem techniczno-kryminalistycznym, aby nie zmieniły się ich cechy charakterystyczne, indywidualne oraz ich stan.

ANALIZA MATERIAŁU DOWODOWEGO NA OBECNOŚĆ NARKOTYKÓW

Do najczęściej występujących substancji zawartych w zabezpieczonych materiałach dowodowych należą: siarczan amfetaminy, chlorowodorek amfetaminy, 3,4-metylenodioksymetamfetamina (MDMA) oraz Δ^9 -tetrahydrokanabinol (Δ^9 -THC), który jest składnikiem aktywnym preparatów *cannabis* (haszysz, marihuana).

Jako składniki towarzyszące (zafałszowania) w materiałach dowodowych spotyka się często węglowodany (monosacharydy, disacharydy, skrobię) jak również tak zwane "leki obojętne" (kofeina, paracetamol, efedryna).

Od 1927 r. amfetamina stosowana była w medycynie w leczeniu astmy oskrzelowej i tzw. narkolepsji (napadowej senności). Obecnie stosowanie tego związku w lecznictwie jest w Polsce zakazane. Najpopularniejsze pochodne amfetaminy to metamfetamina i 3,4-metylenodioksymetamfetamina (Ecstasy). Ta ostatnia wykazuje zarówno działanie stymulujące układ nerwowy jak i działanie psychodeliczne. Nazwa Ecstasy często używana jest także w szerszym znaczeniu w odniesieniu do innych analogów amfetaminy o podobnym, jednocześnie stymulującym i halucynogennym działaniu.

Kolejna grupa związków obecnych w materiałach dowodowych to alkaloidy opium (opiaty). Opiaty są substancjami znanymi od stuleci, stosowane w medycynie głównie w celach uśmierzania bólu. Do grupy opiatów zaliczane są przede wszystkim: opium, morfina i

heroina. Do tej grupy związków należy też wiele syntetycznych substancji chemicznych podobnych w działaniu do morfiny, np. Dolargan, Palfium, Fentanyl.

Morfina stosowana jest jako silny środek przeciwbólowy w leczeniu bólu występującego między innymi w zawale mięśnia sercowego, niedokrwieniu mięśnia sercowego, ciężkich urazach klatki piersiowej z uszkodzeniem oskrzeli i płuc, w leczeniu bólów nowotworowych. Dostępna jest zarówno w postaci tabletek jak i roztworu. Alkaloid ten działa na receptory opiatowe zlokalizowane w ośrodkowym i obwodowym układzie nerwowym.

Heroina – pochodna morfiny jest związkiem bardziej uzależniającym niż morfina. Dobrze się wchłania z przewodu pokarmowego oraz błon śluzowych nosa. Końcowy metabolizm heroiny następuje w wątrobie, gdzie dochodzi do jej przemiany w morfinę.

BADANIE DOKUMENTÓW

Według definicji stosowanej w kryminalistyce dokumentem jest każdy przedmiot zawierający treść utrwaloną różnymi metodami. Podczas ekspertyzy dokumentów w celu ustalenia ich autentyczności identyfikuje się zarówno materiał kryjący (materiał, którym wykonano dokument) jak i podłoże dokumentu. Kryminalistyczny zakres badań dokumentów opiera się na analizie porównawczej i można podzielić na badania fizyczne, chemiczne i fizykochemiczne.

Metody fizyczne to przede wszystkim optyka, która pozwala na określenie intensywności i odcienia barwy środka kryjącego, stopnia przenikania lub przebiccia atramentu. Jak również przeprowadzenie analizy fluorescencyjnej.

Metodą fizykochemiczną jest głównie spektroskopia w podczerwieni i Ramana. W ekspertyzie dokumentów dotyczących ustalenia ich autentyczności, badania fizykochemiczne są wykorzystywane między innymi do identyfikacji zarówno podłoża dokumentu jak i materiału kryjącego, którym dokument sporządzono.

Wśród **metod chemicznych** największe znaczenie ma obecnie chromatografia cienkowarstwowa i wysokosprawna chromatografia cieczowa, a ostatnio także stosuje się w tym celu metodę elektroforezy kapilarnej. Techniki te wymagają wstępnego przygotowania badanej próbki, tj. najczęściej ekstrakcji badanego materiału kryjącego z podłoża (papieru).

Do najczęściej stosowanych materiałów kryjących należą przede wszystkim atramenty (wodne roztwory barwników), pasty długopisowe (mieszanki żywicy syntetycznej i

barwników rozpuszczone w lotnym rozpuszczalniku), tonery (zabarwione drobnoziarniste polimery wykazujące właściwości elektrostatyczne) oraz ołówki.

W skład **atramentu** wchodzi barwnik naturalny lub syntetyczny, rozpuszczalnik (woda destylowana, spirytus), dodatki nadające konsystencję (gliceryna, guma arabska) oraz środki konserwujące: fenol, formalina.

Do najtrwalszych atramentów należą **atramenty chińskie** zawierające sproszkowany węgiel (grafit) w roztworze wody i gumy lub w roztworze szelaku (rodzaj żywicy naturalnej) i boraksu z odczynnikiem dodającym wilgotność. Są to atramenty o najtrwalszym i najintensywniejszym zabarwieniu. Kolejna grupa to **atramenty kampszowe** zawierające wyciąg z igieł Modrzejca kampechianskiego (*Haematoxylon campechianum*) zawierających hematoksylinę i chromian potasu. Skład **atramentów żelazo-garbnikowych** to przede wszystkim kwas galusowy, siarczan żelaza, zasadowe barwniki anilinowe (syntetyczne) oraz kwas garbnikowy (tanina). Są to atramenty wnikające w papier, czasami nawet składniki reagują z włóknami papieru, dzięki czemu atramenty te charakteryzują się dużą trwałością.

Obecnie powszechnie spotykane atramenty to atramenty barwnikowe, zawierające różne mieszaniny głównie syntetycznych barwników wanadowych, wolframowych, anilinowych i innych. W składzie polskich atramentów znajdują się najczęściej barwniki triarylometanowe np. fiolet krystaliczny, błękit Wiktorii R, rodamina B, oraz barwniki tiazynowe, np. błękit metylenowy, a także zieleń malachitowa i kompleksy metali np. żelazowo-taninowy.

Pasty długopisowe to zawiesiny barwników w cieczy o dużej lepkości. W skład past długopisowych wchodzi: żywice naturalne lub syntetyczne polimery, kwaśne związki np. kwasy tłuszczowe, substancje zapobiegające wysychaniu, substancje nadające lepkość oraz substancje zapobiegające korozji. Barwniki występujące w pastach długopisowych to między innymi: Solvent Blue 38, fiolet metylowy, kompleksy metaloorganiczne np. ftalocyjan miedzi oraz duża grupa barwników azowych.

Często w analizie chemicznej poddaje się również tusze pochodzące z pieczętek. W ich skład wchodzi barwniki, guma arabska, gliceryna, klej rybi, szelak, środki konserwujące i inne dodatki. W związku ze zwiększającą się liczbą dokumentów powstających przy użyciu komputera badaniom poddawane są także dokumenty, w których materiałem kryjącym jest toner. W skład toneru wchodzi żywice jako składnik wiążący, barwniki lub pigmenty oraz różnego rodzaju domieszki zwiększające masę tonera, poprawiające lub nadające pożądane właściwości (np. amorficzna krzemionka).

III. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

ĆWICZENIE 1

WYKRYWANIE ZWIĄZKÓW PATOLOGICZNYCH W PŁYNACH USTROJOWYCH

1.1. ANALIZA ŚLINY

1.1.1. WYKRYWANIE JONÓW TIOCYJANOWYCH

Odczynniki:

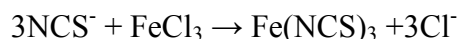
- 0,1 M roztwór CH₃COOH
- 2 N HCl
- 5% roztwór FeCl₃
- ślina

Sprzęt:

- probówki
- pipety Pasteura

Wykonanie:

Do 5 mL śliny dodać 5 kropeł 0,1 M roztworu CH₃COOH, zagotować do wrzenia i przesączyć w celu oddzielenia białka. Jony NCS⁻ wykrywa się w przesączu: do 2 mL przesączu dodać kroplę 2 N HCl i parę kropli 5% roztworu FeCl₃. Powstałe czerwone zabarwienie pochodzi od tworzącego się tiocyjanianu żelaza(III). Zachodząca reakcja w formie jonowej:



Porównanie zawartości rodanków w ślinie osób palących papierosy i osób niepalących:

Należy przygotować trzy probówki. Do jednej z nich nalać 2 mL wody, do drugiej 2 mL roztworu śliny osoby niepalącej, a do trzeciej 2 mL roztworu śliny osoby palącej papierosy. Do wszystkich trzech probówek dodać po 3 krople rozcieńzonego HCl i po 5 kropli 5% roztworu chlorku żelaza(III). Obserwować pojawiające się czerwone zabarwienie, zanotować w którym przypadku było ono najbardziej intensywne.

1.1.2. WYTRĄCANIE MUCYNY

Odczynniki:

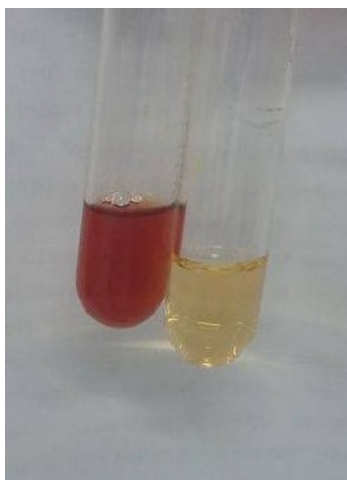
- ślina
- 0,1 M kwas octowy
- etanol
- siarczan(VI) amonu

Sprzęt:

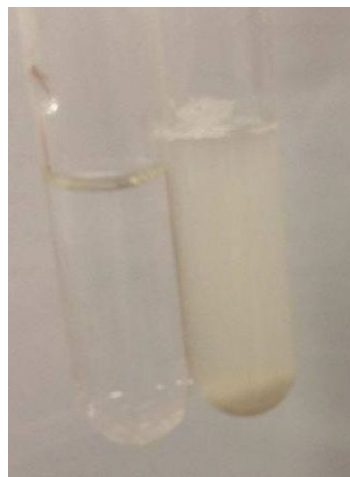
- probówki
- pipety Pasteura

Wykonanie:

Mucynę można wytrącić ze śliny etanolem, rozcieńczonym roztworem kwasu octowego lub przez nasycenie roztworu śliny siarczanem amonowym. Do 5 mL roztworu śliny dodać parę kropli 0,1 M roztworu kwasu octowego. Wytrąca się kłaczkowaty osad mucyny.



WYKRYWANIE JONÓW TIOCYJANOWYCH



WYTRĄCANIE MUCYNY

1.1.3. WYKRYWANIE BIAŁKA W ŚLINIE

Odczynniki:

- ślina
- 10% roztwór NaOH
- 1% CuSO_4

Sprzęt:

- probówki
- pipety Pasteura

Wykonanie:

Białko w ślinie można wykryć za pomocą reakcji biuretowej. Wiązanie peptydowe w środowisku zasadowym w wyniku tautomeryzacji może występować w formie enolowej. Dodatek jonów miedzi Cu^{2+} powoduje ich skompleksowanie przez enolowe formy wiązań peptydowych. Jony miedzi tworzą dwa wiązania koordynujące z atomami tlenu oraz cztery wiązania koordynujące z atomami azotu. Powstały kompleks ma barwę fioletową.

W celu wykrycia białka w ślinie należy umieścić 1 mL roztworu śliny, zmieszać z 1 mL 10% roztworu NaOH i dodać parę kropli 1% roztworu CuSO_4 . W przypadku obecności białka powstaje fioletowe zabarwienie.

Należy unikać nadmiaru siarczanu miedzi gdyż niebieska barwa $\text{Cu}(\text{OH})_2$ maskuje barwny kompleks!!!



WYKRYWANIE BIAŁKA W ŚLINIE

1.2. ANALIZA MOCZU

1.2.1. OZNACZANIE pH MOCZU

Odczynniki:

- mocz

Sprzęt:

- zlewka

- papierki uniwersalne

Wykonanie:

Na pasek wskaźnikowy należy nanieść kilka kropli moczu i porównać uzyskane zabarwienie ze skalą barw. Mocz najczęściej wykazuje odczyn lekko kwaśny, pH 5,5 - 6,5. Odczyn kwaśny ma mocz osób stosujących dietę wysokobiałkową. Odczyn zasadowy może być spowodowany dietą bogatą w jarzyny, owoce i produkty mleczne.

1.2.2. WYKRYWANIE JONÓW NH_4^+

Odczynniki:

- 1% roztwór fenoloftaleiny

- 5% roztwór Na_2CO_3

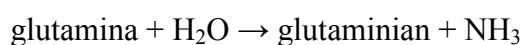
- mocz

Sprzęt:

- probówka

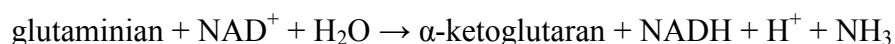
- łaźnia wodna

Powstały w komórkach kanalików nerkowych amoniak tworzy się głównie w reakcji hydrolizy glutaminy. Katalizatorem jest enzym glutaminaza:



CHEMIA SĄDOWA

Amoniak generuje się również w reakcji deaminacji oksydacyjnej glutaminianu katalizowanej przez dehydrogenazę glutaminianową:



Amoniak dyfunduje do płynu kanalikowego i tam łączy się z jonem H^+ tworząc NH_4^+ . Jon wodorowy powstaje w reakcji dysocjacji kwasu węglowego utworzonego w reakcji katalizowanej przez anhidrazę węglanową:



Ilość wydalanych z moczem jonów amonowych jest zmienna, ich tworzenie związane jest z utrzymywaniem przez nerki równowagi kwasowo-zasadowej. W przypadku zakwaszenia ustroju ilość produkowanego jonu amonowego wzrasta. W ten sposób nerki usuwają jony H_3O^+ .

Wykonanie:

W probówce umieścić 2 mL moczu. Dodać kilka kropeł fenoloftaleiny, a następnie 10-15 kropli 5% roztworu Na_2CO_3 , do uzyskania malinowego zabarwienia. Łagodnie ogrzewać. W trakcie zachodzącej reakcji wydziela się amoniak, którego obecność wykryć można umieszczając u wylotu probówki zwilżony papierek wskaźnikowy, lub też za pomocą węchu. Wydzielanie się amoniaku pod wpływem węglanu sodu świadczy o obecności jonów NH_4^+ w moczu. W świeżo zebranych moczu prawidłowym amoniak nie może pochodzić z rozkładu mocznika, gdyż nie ma w nim bakterii, a więc nie ma ureazy - enzymu bakteryjnego hydrolizującego mocznik na amoniak i dwutlenek węgla.

1.2.3. WYKRYWANIE KWASU MOCZOWEGO

Odczynniki:

- nasycony roztw. kwasu fosforowolframowego lub fosforowolframianu sodu
- mocz
- 2 M NaOH

Sprzęt:

- probówka

Kwas moczowy występuje w dwóch formach tautomerycznych: enolowej i ketoiminowej. W formie ketoiminowej wykazuje właściwości redukujące: w środowisku alkalicznym redukuje

CHEMIA SĄDOWA

kwask fosforowolframowy (lub fosforowolframian sodu) do niższych tlenków wolframu, co uwidacznia się niebieskim zabarwieniem.

Wykonanie:

Do 2 mL moczu dodać 0,5 mL roztworu kwasu fosforowolframowego (lub roztworu fosforowolframianu sodu), a następnie 2 M roztwór NaOH do odczynu alkalicznego. Tworzy się niebieskie zabarwienie.

1.2.4. WYKRYWANIE MOCZNIKA

Odczynniki:

- podbromin sodu NaBrO (Br₂ + NaOH)
- mocz

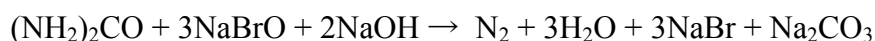
Sprzęt:

- probówka
- zlewka poj 150mL
- kolbka stożkowa z korkiem poj. 150mL

Wykonanie:

Podbromin sodu otrzymujemy *in situ* w reakcji bromu ze stężonym roztworem wodorotlenku sodu. W tym celu należy 0,1g NaOH rozpuścić w niewielkiej ilości wody destylowanej a następnie dodać 1 kroplę Br₂ i tak otrzymaną mieszaninę rozcieńczyć do 100 mL.

Mocznik zawarty w moczu pod wpływem alkalicznego roztworu podbrominu sodu ulega rozkładowi z wydzieleniem azotu cząsteczkowego, dwutlenku węgla i wody według poniższej reakcji:



Do probówki dodać 1 mL moczu oraz 1 mL alkalicznego roztworu podbrominu sodu.

Wydzielające się pęcherzyki gazu (azot) wskazują na obecność mocznika.

1.2.5. WYKRYWANIE KREATYNINY METODĄ JAFFEGO

Odczynniki:

- 1,5% roztwór kwasu pikrynowego
- 2 M roztwór NaOH
- mocz

Sprzęt:

- probówki
- pipety Pasteura

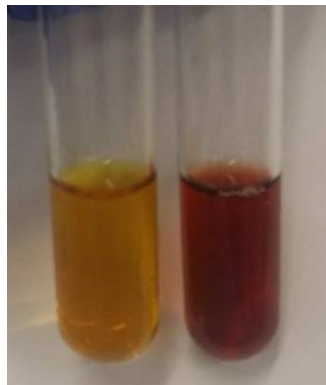
Prawidłowe stężenie kreatyniny w surowicy wynosi u dorosłych kobiet od 0,5 do 1 mg/100 mL, a u mężczyzn 0,6 – 1,2 mg/100 mL. Znacznie niższe stężenie kreatyniny występuje u małych dzieci w wieku do trzech lat (0,2-0,4 mg/100 mL). Podwyższone stężenie kreatyniny

CHEMIA SĄDOWA

we krwi może wystąpić w chorobach nerek, mięśni i zatruciach witaminą D. Kreatynina w środowisku zasadowym tworzy z kwasem pikrynowym kompleks o czerwonym zabarwieniu.

Wykonanie:

Przygotować dwie probówki. Do jednej dodać 0.5 mL moczu i 0.5 mL wody destylowanej. Do obydwu probówek dodać 1 mL 1,5% roztworu kwasu pikrynowego, a następnie zalkalizować kilkoma kroplami 2M roztworu NaOH. Wymieszać. Zanotować obserwowane zmiany i sformułować wnioski.



1.1.1 WYKRYWANIE KREATYNINY METODĄ JAFFEGO

1.2.6. WYKRYWANIE KREATYNINY METODĄ WEYLA

Odczynniki:

- 10 % roztwór nitroprusydku sodu
- 2 M NaOH
- mocz
- 30% kwas octowy
- woda destylowana

Sprzęt:

- probówki

Wykonanie:

Przygotować dwie probówki. Do jednej dodać 2 mL moczu, do drugiej 2 mL wody destylowanej. Do każdej z nich dodać 3-4 krople roztworu nitroprusydku sodu oraz 1 mL 2 M NaOH, wymieszać. Pojawia się czerwone zabarwienie, które po pewnym czasie blednie, a znika natychmiast po zakwaszeniu 30% kwasem octowym.

1.2.7. WYKRYWANIE INDYKANU

Odczynniki:

- mocz
- 20% roztwór $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Pb}$
- 0,4% roztwór FeCl_3 w stęż. HCl
- stężony HCl
- chloroform
- H_2O_2 lub 1% roztwór KMnO_4

Sprzęt:

- probówki
- pipety Pasteura

Wykonanie:

Próba Obermayera: do 8 mL moczu dodać 2 mL 20% roztworu $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Pb}$. Do przesącza dodać równą objętość 0,4% roztworu FeCl_3 w stężonym roztworze HCl i 1 mL chloroformu. Całość bardzo dokładnie wytrząsać. Warstwa chloroformowa barwi się na kolor niebieski.

Próba Denigesa: do 2 mL moczu dodać 2 mL stężonego roztworu HCl , parę kropli H_2O_2 (lub 1 kroplę 1% roztworu KMnO_4) i 1 mL chloroformu. Po dokładnym wytrząsaniu warstwa chloroformu zabarwia się na niebiesko.



1.2.8. WYKRYWANIE ZWIĄKÓW KETONOWYCH

Odczynniki:

- 1% roztwór nitroprusydku sodu
- 10% roztwór NaOH
- kwas octowy lodowaty

Sprzęt:

- probówki
- pipety Pasteura

Wykonanie:

Do 5 mL moczu dodać 0,5 mL 1% roztworu nitroprusydku sodu i 0,5 mL 10% roztworu NaOH . Obserwować zmianę zabarwienia po dodaniu 1 mL CH_3COOH lodowatego. W

CHEMIA SĄDOWA

obecności związków ketonowych (kwas acetoctowy, aceton, kwas β -hydroksymasłowy) czerwone zabarwienie przechodzi w wiśniowe. W pozostałych przypadkach czerwone zabarwienie znika po dodaniu kwasu octowego i przechodzi w żółtozielone.

1.2.9. WYKRYWANIE BARWNIKÓW ŻÓŁCIOWYCH

Odczynniki:

- 1% etanolewy roztwór jodu
- 15% roztwór BaCl_2
- 10 g FeCl_3
- 25 g CCl_3COOH

Sprzęt:

- probówki
- pipety Pasteura

Wykonanie:

Próba Rosina: 1% etanolewy roztwór jodu podwarstwić moczem. Na granicy obu cieczy tworzy się zielony pierścień.

Próba Fouchette'a: do 5 mL moczu dodać 2,5 mL 15% roztworu BaCl_2 , zmieszać i przesączyć. Na sączku zostaje osad z bilirubiną. Sączek z osadem zalać kilkoma kroplami odczynnika Fouchette'a (10 g FeCl_3 i 25 g CCl_3COOH rozpuścić w wodzie i uzupełnić do 25 mL). Pojawia się zielone lub niebieskie zabarwienie.

1.2.10. WYKRYWANIE BIAŁKA KWASEM SULFOSALICYLOWYM

Jest to bardzo czuła próba, pozwalająca wykryć już 15 mg białka w litrze, jednak niektóre alkaloidy stosowane jako leki również dają zmętnienie, a żelazo trójwartościowe powoduje zabarwienie różowe.

Odczynniki:

- 20% roztwór kwasu sulfosalicylowego
- mocz

Sprzęt:

- probówki
- pipety Pasteura

Wykonanie:

Do 2 mL próbki dodajemy kroplami 20% roztwór kwasu sulfosalicylowego, potrząsamy i odstawiamy na chwilę. Stopień zmętnienia i ilość osadu zależą od ilości białka w badanej próbce. Można przygotować roztwory o znanych stężeniach (np. 15 mg-100 mg białka/L) i porównując je z roztworem badanym ocenić przybliżoną zawartość. Tą metodą można wykrywać białka niemal we wszystkich, nawet bardzo rozcieńczonych roztworach. Najprawdopodobniej ta próba da wynik negatywny (i bardzo dobrze!), gdyż zawartość białka

CHEMIA SĄDOWA

w moczu większa niż 10-80 mg na dobę jest objawem gorączki lub procesów chorobowych zachodzących w nerkach. Przyczyną występowania białkomoczu może być także duży wysiłek fizyczny czy też spożycie dużej ilości białka, np. w mleku.

Powtórzyć procedurę na próbce zawierającej albuminę.

1.2.11. WYKRYWANIE BIAŁKA BENCE-JONESA

Odczynniki:

- mocz

Sprzęt:

- zlewka
- probówki
- płytki grzejna
- termometr

W celu wykrycia białka Bence-Jonesa wykorzystuje się zjawisko precypitacji termicznej. W tym badaniu podgrzanie moczu do 60°C powoduje, że w przypadku gammapatii monoklonalnych łańcuchy lekkie immunoglobulin zaczynają zbijać się w grudki. Białko Bence-Jonesa odznacza się szczególną rozpuszczalnością: w temperaturze 50°C zaczyna się strącać i ponownie rozpuszcza się po podgrzaniu do 80°C.

Obecnie znacznie częściej stosowana jest metoda **elektroforezy białek** moczu na żelu agarozowym, pozwalająca na dokładne określenie rodzaju białkomoczu, w tym wykrycie białka Bence-Jonesa. Jeśli natomiast chce się określić ilościowo zawartość tego białka, oznaczenia dokonuje się w dobowej zbiorce moczu.

1.2.12. PÓLILOŚCIOWE OZNACZANIE CUKRU W MOCZU – PRÓBA BENEDICTA

To najbardziej czuła i specyficzna ze wszystkich prób redukcyjnych na cukry. Kreatynina ani kwas moczowy nie redukują odczynnika Benedicta (tak jak np. w przypadku próby Fehlinga). Czynnikiem wiążącym $\text{Cu}(\text{OH})_2$ w rozpuszczalny kompleks jest tu cytrynian sodu.

Odczynniki:

- cytrynian sodu
- bezwodny węgiel sodu
- 17,3% roztwór CuSO_4

Sprzęt:

- probówki
- pipety Pasteura

Wykonanie:

Opracowanie:

Beata Jasiewicz, Iwona Kowalczyk, Joanna Kurek, Arleta Sierakowska, Rafał Wawrzyniak

CHEMIA SĄDOWA

W 0,6 litra wrzącej wody rozpuścić 173 g cytrynianu sodu i 100 g bezwodnego węgla sodu. Po ochłodzeniu dodać powoli, stale mieszając, 0,1 litra 17,3% roztworu CuSO_4 , dopełnić wodą do 1 litra. Oczywiście do naszych celów można przygotować mniej np. 0,1 L odczynnika (100 mL). Przygotowujemy dwa roztwory wzorcowe odważając do probówek 5 i 20 mg glukozy, którą rozpuszczamy w 1 mL wody. W trzech probówkach umieszczamy po 5 mL odczynnika Benedicta. Do pierwszej dodajemy 10 kropli moczu, a do pozostałych dwóch po 10 kropli roztworów wzorcowych. Roztwory mieszamy i wstawiamy do wrzącej wody na 5 minut. Po tym czasie wyjmujemy i oziębiamy probówkę pod bieżącą wodą. W przypadku obecności cukru w moczu (lub innym roztworze) powstaje żółty, pomarańczowy lub czerwony osad. Z jego barwy można w przybliżeniu ocenić stężenie cukru.

Barwa mieszaniny reakcyjnej	Przybliżona zawartość cukru w g/L
niebieska	Brak glukozy w moczu
zielona, brak osadu	1-3
zielona, osad	5
oliwkowozielona	10
pomarańczowa, osad	15
czerwona, osad	20 i powyżej



PRÓBA BENEDICTA

1.2.13. WYKRYWANIE UROBILINY - PRÓBA BOGOMOŁOWA

Odczynniki:

- nadtlenek wodoru (albo rozcieńczony kwas azotowy)
- stężony kwas octowy
- 20% roztwór CuSO_4
- chloroform

Sprzęt:

- probówki
- pipety Pasteura

Wykonanie:

Opracowanie:

Beata Jasiewicz, Iwona Kowalczyk, Joanna Kurek, Arleta Sierakowska, Rafał Wawrzyniak

CHEMIA SĄDOWA

Dodajemy do moczu niewielką ilość nadtlenu wodoru (albo rozcieńczonego kwasu azotowego) i bardzo energicznie wytrząsamy (np. w rozdzielaczu) otwierając co kilka sekund zawór, by powstały gaz uleciał. Utleniony do urobiliny urobilinogen możemy wykryć w następujący sposób: do 10 mL moczu dodajmy 0,5 mL stężonego kwasu octowego i 0,5 mL 20% roztworu siarczanu miedzi. Mieszamy energicznie i wlewamy 1-2mL chloroformu. W razie obecności urobiliny warstwa chloroformowa barwi się na różowo.

ĆWICZENIE 2

IDENTYFIKACJA ALKALOIDÓW ORAZ NIEKTÓRYCH LEKÓW W MOCZU

Zarówno alkaloidy jak i leki stanowią dużą grupę związków, która jest ważnym przedmiotem sądowej analizy toksykologicznej. Substancje te są identyfikowane i oznaczane zarówno w materiale nie biologicznym (proszki, tabletki) jak i biologicznym (płyny ustrojowe: krew, osocze, mocz) oraz w wycinkach narządów wewnętrznych (wątroba, nerki, mózg) i wytworach naskórka (włosy, paznokcie). Ilościowe wyodrębnianie trucizn ma zasadnicze znaczenie w analizie toksykologicznej materiałów biologicznych. Do najczęściej stosowanych sposobów wyodrębniania trucizn należy ekstrakcja rozpuszczalnikami organicznymi w układzie ciecz-ciecz. Metoda ta pozwala na wyodrębnienie z materiału biologicznego zarówno związków chemicznych pochodzenia naturalnego jak i związków syntetycznych.

Na wydajność ekstrakcji istotny wpływ posiadają dwa czynniki:

1. stopień zdysocjowania związku w fazie wodnej
2. współczynnik podziału niezdysocjowanej formy związku pomiędzy fazą organiczną (ropuszczalniki), a fazą wodną (badany materiał: mocz, krew, homogenaty tkankowe).

Ogólnie ekstrakcję związków o charakterze kwasów należy prowadzić ze środowiska kwaśnego, natomiast zasad – ze środowiska alkalicznego. Istotne znaczenie posiada również dobór odpowiedniego rozpuszczalnika organicznego. Najczęściej stosuje się eter naftowy, heksan, benzen, dichlorometan, chloroform, eter etylowy (w kolejności od związków najmniej do najbardziej polarnych). Eter naftowy stosuje się do ekstrakcji związków nie polarnych dobrze rozpuszczalnych w tłuszczach, natomiast eter etylowy do ekstrakcji związków polarnych.

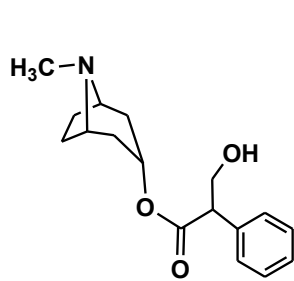
Podstawowym zadaniem w diagnostyce zatruc jest uzyskanie dużej ilości informacji w stosunkowo krótkim czasie. Identyfikację wyodrębnionych związków można przeprowadzić przy użyciu:

- prostych testów i metod kolorometrycznych
- metod spektrofotometrycznych
- metod immunologicznych
- metod chromatograficznych.

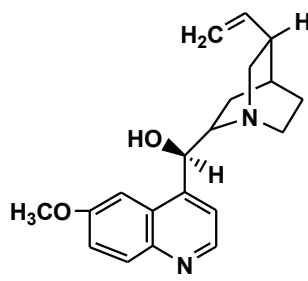
Metody chromatograficzne należą do najczęściej stosowanych technik w analizie toksykologicznej materiału biologicznego. Najbardziej wartościowym osiągnięciem jest połączenie chromatografu gazowego ze spektrometrem masowym. Niemniej jednak do chwili obecnej dużym powodzeniem cieszą się metody chromatografii cienkowarstwowej i bibułowej nie wymagające użycia specjalnej i kosztownej aparatury. Są to metody proste o krótkim czasie trwania analizy. Cechuje je duża specyficzność i wykrywalność. Dodatkową ważną zaletą jest łatwość ujawniania plam chromatograficznych w świetle UV czy też po zanurzeniu w odczynniku Dragendorffa lub spryskaniu roztworem J_2 w KJ.

2.1. WYKRYWANIE ALKALOIDÓW W MOCZU

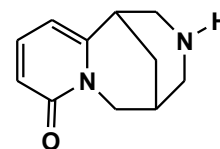
Wykrywane alkaloidy:



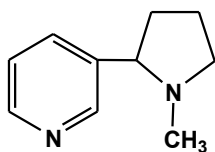
ATROPINA



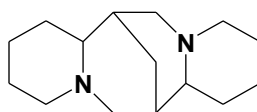
CHININA



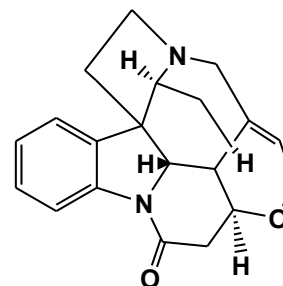
CYTYZYNA



NIKOTYNA



SPARTEINA



STRYCHNINA

Atropina - alkaloid wyizolowany z pokrzyku (wilczej jagody) *Atropa belladonna*, rozkurcza mięśnie gładkie oskrzeli, przewodu pokarmowego, dróg moczowych, rozszerza źrenice. W leczeniu stosowany w postaci siarczanu.

Chinina - środek przeciwmalaryczny, przeciwgorączkowy i przeciwbólowy, stosowany w leczeniu w postaci soli. Wykazuje słabe właściwości antyarytmiczne. Obecnie dodawana do napojów typu toników.

Cytyzyna - alkaloid łubinowy, stosowany w medycynie ludowej jako środek halucynogeny.

Opracowanie:

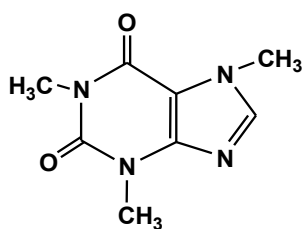
Beata Jasiewicz, Iwona Kowalczyk, Joanna Kurek, Arleta Sierakowska, Rafał Wawrzyniak

CHEMIA SĄDOWA

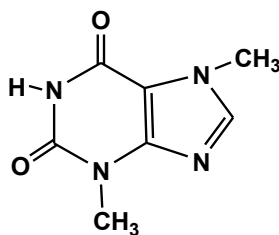
Nikotyna - alkaloid występujący w liściach i korzeniach tytoniu. Ciecz rozpuszczalna w wodzie, bardzo trująca. Składnik środków owadobójczych.

Sparteina - alkaloid łubinowy, dawniej stosowany jako środek rozkurczowy i antyarytmiczny.

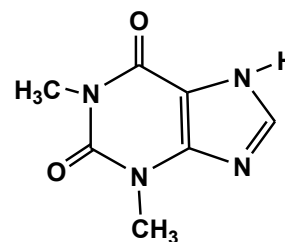
Strychnina - alkaloid wyizolowany z nasion kulczyby. Stosowany w postaci azotanu jako środek tonizujący w zaburzeniach krążenia. Jest składnikiem trutek przeciwko gryzoniom.



KOFEINA



TEOBROMINA



TEOFILINA

Kofeina - występuje w liściach herbaty, nasionach kawy oraz nasionach kakaowca. Pobudza ośrodkowy układ nerwowy, ośrodek oddechowy i naczynioruchowy, a także korę mózgową. Stosowana w niedomaganiach krążenia i oddychania oraz preparatach poprawiających koncentrację czy odchudzających. Kofeina jest metabolizowana w wątrobie do trzech produktów: paraksantyny, teobrominy i teofiliny.

Teofilina - pobudza ośrodek naczynioruchowy i oddechowy, rozszerza naczynia krwionośne. Stosowana w astmie, rozedmie płuc, w nadciśnieniu tętniczym.

Teobromina - występuje w nasionach drzewa kakaowego. Działa rozkurczowo i moczopędnie. Rozszerza naczynia nerkowe oraz naczynia wieńcowe serca. Stosowana w przewlekłej niewydolności krążenia oraz w dusznicy bolesnej.

Odczynniki:

- 850 mg $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3$
- 850 mg $\text{Bi}(\text{NO}_3)_2\text{OH}$
- lodowaty kwas octowy
- woda destylowana
- 8 g jodku potasu
- 1.2 g jodu
- kwaśny węgiel sodu NaHCO_3
- chloroform
- etanol
- wzorce wybranych alkaloidów
- metanol
- mocznik

Sprzęt:

- zlewki
- bagietki
- cylinder miarowy
- kolby stożkowe z korkiem
- szalki Petriego
- płytki TLC, kapilary

Opracowanie:

Beata Jasiewicz, Iwona Kowalczyk, Joanna Kurek, Arleta Sierakowska, Rafał Wawrzyniak

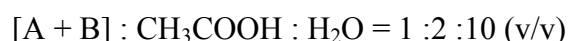
CHEMIA SĄDOWA

Przygotowanie odczynnika Dragendorffa:

Roztwór A: 850 mg $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3$ lub $\text{Bi}(\text{NO}_3)_2\text{OH}$ rozpuszcza się w 10 mL lodowatego kwasu octowego i dodaje 40 mL wody destylowanej.

Roztwór B: 8 g jodku potasu rozpuszcza się w 20 mL wody destylowanej.

Przygotowany roztwór A miesza się z roztworem B, otrzymując w ten sposób stężony odczynnik Dragendorffa. W celu otrzymania rozcieńczonego odczynnika Dragendorffa, używanego do wywoływania chromatogramów, roztwór podstawowy rozcieńcza się lodowatym kwasem octowym i wodą destylowaną w stosunku:



Przygotowanie alkoholowego roztworu J_2 w KJ:

1,2 g jodu i 2 g jodku potasu rozpuszcza się w 100 mL etanolu.

Wykonanie:

20 mL moczu alkalinizuje się kwaśnym węglanem sodu do $\text{pH}=8$ i poddaje ekstrakcji chloroformem. Pozostałość otrzymaną po odparowaniu chloroformu rozpuszcza się w możliwie małej ilości etanolu (0.5 – 1 mL). Etanolowy roztwór ekstraktu umieszcza się na 2-3 pozycjach startowych płytki chromatograficznej, obok nanosi się roztwory wzorcowe.

Analiza TLC – pierwsza grupa alkaloidów

Rozdział w komorze chromatograficznej dokonuje się przy użyciu metanolu, który jest fazą ruchomą. Osuszone płytki zanurza się w odczynniku Dragendorffa, uzyskując plamy o zabarwieniu pomarańczowym.

Analiza TLC - alkaloidy purynowe

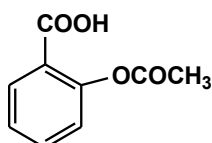
Rozdział chromatograficzny przeprowadza się w układzie chloroform – etanol w stosunku: 9:1. Po osuszeniu płytki zanurza się w alkoholowym roztworze J_2 w KJ, a następnie spryskuje się roztworem składającym się z równych części 95% etanolu i 25% roztworu kwasu solnego.

Alkaloid	obserwowana barwa plamki na płytce TLC
kofeina	brunatno czerwona
teofilina	brunatno czerwona
teobromina	popielata

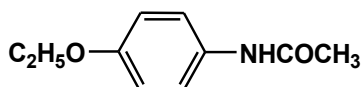
We wnioskach z przeprowadzonej analizy należy przerysować płytki TLC i podać wynik z zaznaczeniem barw poszczególnych plamek oraz nazwy wykrytych alkaloidów.

2.2. WYKRYWANIE LEKÓW PRZECIWBÓLOWYCH, PRZECIWPALNYCH I NASENNYCH W MOCZU

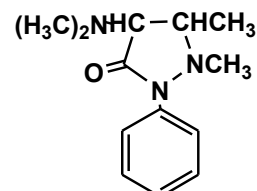
Do powszechnie stosowanych leków zdecydowanie zaliczyć można te o właściwościach przeciwbólowych czy przeciwzapalnych: aspiryna (kwas acetylosalicylowy), salicylamid, fenacetyna, fenazon, aminofenazon (piramidon).



KWAS ACETYLOSALICYLOWY

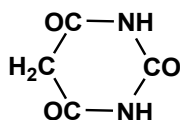


FENACETYNA

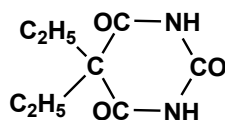


AMINOFENAZON

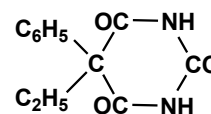
a do nasennych: heksobarbital, metylofenobarbital, cyklobarbital, barbital (weronal), fenobarbital (luminal).



KWAS BARBITUROWY



BARBITAL
(kwas dietylobarbiturowy)



LUMINAL
(kwas fenyletylobarbiturowy)

Przyjmowane leki czy alkaloidy znajdujące się w napojach i żywności, bądź alkaloidowe środki odurzające w organizmie człowieka najczęściej ulegają różnym procesom metabolicznym pod wpływem enzymów, dlatego z płynów ustrojowych takich jak krew, mocz czy osocze, oznaczyć można wprowadzony do organizmu składnik i jego metabolity lub wyłącznie jego metabolity.

Aspiryna - kwas acetylosalicylowy (ASA) jest jednym z najczęściej przyjmowanych środków farmaceutycznych ze względu na swoje działanie przeciwbólowe i przeciwzapalne, a ostatnio, z uwagi na właściwości antykoagulacyjne, aplikowany jest w małych regularnych dawkach. ASA w organizmie człowieka metabolizowany jest do kwasu salicylowego, natomiast salicylamid może być zidentyfikowany w moczu w formie niezmienionej.

CHEMIA SĄDOWA

Odczynniki:

- 50 mg difenylokarbazonu
- 20 mL etanolu
- 1 mL 5% roztworu chlorku rtęci(II)
- 5 kropel 30% roztworu kwasu octowego
- etanol
- 1 g chlorku żelaza(III)
- 50 mg żelazocyjanku potasu
- 10 mL wody destylowanej
- 20 mL moczu
- 1 M kwas siarkowy
- eter dietylowy
- wzorce wybranych leków
- propan-2-ol
- chloroform
- amoniak
- mocz

Sprzęt:

- zlewki
- bagietki
- cylinder miarowy
- kolby stożkowe z korkiem
- szalki Petriego
- płytki TLC
- kapilary
- pipety Pasteura
- szczytce

Przygotowanie odczynnika difenylokarbazonowego:

50 mg difenylokarbazonu rozpuszcza się w 20 mL etanolu, dodaje 1 mL 5% roztworu chlorku rtęci(II) oraz 5 kropel 30% roztworu kwasu octowego i dopełnia do objętości 30 mL. Tak przyrządzony roztwór rozcieńcza się etanolem pięciokrotnie.

Przygotowanie odczynnika wywołującego:

1 g chlorku żelaza(III) i 50 mg żelazocyjanku potasu rozpuszcza się w 10 mL wody destylowanej. Roztwór przygotowuje się na świeżo.

Wykonanie:

Do 20 mL moczu dodaje się roztwór 1 M kwasu siarkowego w celu zakwaszenia do $\text{pH}=1$ i poddaje ekstrakcji ciągłej eterem (lub w rozdzielaczu). Pozostałość otrzymaną po odparowaniu eteru rozpuszcza się w możliwie małej ilości etanolu (0.5 – 1 mL). Etanolowy roztwór ekstraktu umieszcza się na 2-3 pozycjach startowych płytki chromatograficznej, obok nanosi się roztwory wzorcowe.

Analiza TLC – leki przeciwbólowe i przeciwzapalne

Płytki umieszcza się w komorze chromatograficznej, w której znajduje się faza ruchoma o składzie: cykloheksan – chloroform - lodowaty kwas octowy w stosunku 40:50:10. Płytkę po osuszeniu zanurza się w roztworze wywołującym ($\text{FeCl}_3/\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$). Zabarwienie plam koloru ciemnoniebieskiego nie jest trwałe, ponieważ po kilku minutach cała płytka ciemnieje (należy zakreślić kontury sygnałów ołówkiem).

Analiza TLC – leki nasenne

CHEMIA SĄDOWA

Płytki umieszcza się w komorze chromatograficznej, w której znajduje się faza ruchoma o składzie: propan-2-ol - chloroform - 25% NH₄OH w stosunku 45:55:10. Płytkę po osuszeniu spryskuje się odczynnikiem difenylkarbazonowym. Intensywność powstałych barwnych plam jest najwyraźniejsza po upływie 15-20 minut od chwili wywołania.

Lek	obserwowana barwa plamki na płytce TLC
Heksobarbital	fioletowa z ciemną obwódką
Metylofenobarbital	biała z ciemnofioletową obwódką
Cyklobarbital	fioletowa z ciemną obwódką
barbital (weronal)	biała z różową obwódką
fenobarbital (luminal)	fioletowa z ciemną obwódką

We wnioskach z przeprowadzonej analizy należy przerysować płytki TLC i podać wynik z zaznaczeniem barw poszczególnych plamek oraz nazwy wykrytych leków.

2.3. WYKRYWANIE OPIOIDÓW W MOCZU

Odczynniki:

- mocz
- kwas solny stężony
- 40% roztwór wodorosiarczanu(VI) sodu
- 50% roztwór kwasu trichlorooctowego
- amoniak
- wodorowęglan sodu
- chloroform
- butanol

Sprzęt:

- kolba stożkowa 50 mL
- łaźnia wodna
- mały zestaw do sączenia
- kolba okrągłodenna
- fiolka

Wykonanie:

W kolbie stożkowej o pojemności 50 mL umieścić 5 mL moczu, który należy zmieszać z 8 mL 40% wodnego roztworu wodorosiarczan(VI) sodu, a następnie dodać 1 mL stężonego kwasu solnego. Mieszaninę ogrzewać w łaźni wodnej w temperaturze wrzenia przez 30 minut, a następnie ochłodzić do temperatury pokojowej. Do tak przygotowanego roztworu należy dodać 3–5 mL 50% roztworu kwasu trichlorooctowego w celu wytrącenia ewentualnych substancji białkowych. W czasie 5-10 minut powinno nastąpić wytrącenie osadu, który trzeba oddzielić od roztworu. Do klarownego roztworu dodaje się amoniak do uzyskania odczynu bliskiego neutralnemu pH 6.0–7.0, a następnie wysyca się roztworem wodorowęglanu sodu (0.5 g na 30 mL roztworu). Tak przygotowany roztwór ekstrahuje się mieszaniną butanol-chloroform (1:9, v/v) 3 porcjami po 20 mL, przez 5 minut na porcję.

40

Opracowanie:

Beata Jasiewicz, Iwona Kowalczyk, Joanna Kurek, Arleta Sierakowska, Rafał Wawrzyniak

CHEMIA SĄDOWA

Otrzymane ekstrakty połączyć i suszyć nad węglanem sodu, przesączyć i zagęścić pod zmniejszonym ciśnieniem w temperaturze 40°C. Pozostałość rozpuścić w bardzo małej ilości (0,5 mL) wcześniej stosowanej mieszaniny butanol-chloroform i przenieść do fiolki. Za pomocą tego sposobu ekstrakcji można wydzielić nawet 72% opiatów z moczu.

W związku z faktem, iż opioidy zawierają jeden czwartorzędowy atom azotu do ich detekcji korzystnie jest zastosować spektrometrię mas, która umożliwi oznaczenie tych substancji w śladowych ilościach.

Celem ćwiczenia jest identyfikacja opioidów w badanej próbce moczu na podstawie analizy widm MS

W przypadku obecności opioidów w moczu w widmie MS obecne są sygnały przy: $m/z = 340$ (acetylokodeina), $m/z = 298$ (kodeina), $m/z = 284$ (morfina), $m/z = 326, 324$ i 322 (6-MAM). Intensywność tych ostatnich jest niewielka, wynosi 0.1-5%. Ponadto wspólną cechą charakterystyczną dla poszczególnych morfinopodobnych opioidów jest sygnał przy $m/z = 144$.

W otrzymanym po analizie widmie MS należy stwierdzić lub wykluczyć obecność substancji opioidowych w badanej próbce moczu.

2.4. OZNACZANIE METABOLITÓW ASPIRYNY (KWASU ACETYLO-SALICYLOWGO) W MOCZU

Odczynnik:

- mocz
- 1M H₂SO₄
- eter dietylowy
- NaHCO₃
- Na₂CO₃
- 25% amoniak
- metanol
- octan etylu

Sprzęt:

- zlewki
- kolby okrągłodenne
- fiolki

Wykonanie:

W celu oznaczenia metabolitów aspiryny w moczu należy prowadzić badanie na moczu oryginalnym i zakwaszonym z zastosowaniem różnych środków alkalinizujących. Salicylamid będący metabolitem aspiryny (powstający w wyniku hydrolitycznego aminowania) można wykryć w próbce moczu zakwaszonego, a następnie zalkalizowanego amoniakiem.

CHEMIA SĄDOWA

A. oznaczanie metabolitów w moczu oryginalnym

5 mL moczu (pH 5-6) pobranego od osoby przyjmującej aspirynę należy przenieść do rozdzielacza i ekstrahować trzema porcjami po 15 mL eteru dietylowego.

B. oznaczanie metabolitów w moczu zakwaszonym

15 mL moczu pobranego od osoby przyjmującej aspirynę należy zakwasić roztworem 1M H₂SO₄ do pH=1, następnie przenieść do rozdzielacza i ekstrahować trzema porcjami po 15 mL eteru dietylowego. Ekstrakty eterowe zagęścić i zachować do analizy. Warstwę wodną podzielić na trzy porcje po 5 mL każda i zalkalizować. Pierwszą porcję alkalizować NaHCO₃, drugą Na₂CO₃, a trzecią 25% roztworem amoniaku, wszystkie do pH 11-12. Ponownie przeprowadzić ekstrakcję eterem dietylowym wszystkich trzech mieszanin (OSOBNO!!!) 3 x 15 mL. Ekstrakty eterowe zagęścić, a następnie pozostałości z kolb wymyć 0,5 mL metanolu lub octanu etylu, przenieść do fiolek i przekazać do analizy GC/MS.

Metabolity w próbce moczu z części A (1 fiołka) i części B (4 fiołki) będą analizowane za pomocą metody GC/MS.

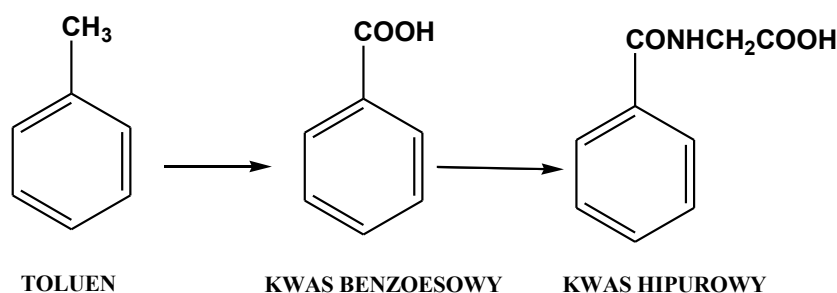
Wartości m/z dla aspiryny i jej metabolitów w moczu

Substancja	m/z
kwasy acetylosalicylowy	43, 64, 92, 120, 138
kwasy salicylowy	53, 64, 92, 120, 138
kwasy metoksybenzoesowy	53, 63, 152
metoksysalicylamid	52, 63, 92, 122, 151, (44, 77, 105, 134)
salicylamid	53, 65, 92, 120, 137

ĆWICZENIE 3

OCENA NARAŻENIA NA TOLUEN - OZNACZANIE KWASU HIPUROWEGO W MOCZU

Wykrycie w materiale biologicznym niektórych związków organicznych jest niekiedy bardzo trudne lub niemożliwe. W tych wypadkach rozpoznanie przyczyny zatrucia może być dokonane drogą wykrywania metabolitów tych związków. Dotyczy to przede wszystkim związków metabolizujących się do połączeń nie występujących w moczu fizjologicznym lub występujących w nim w bardzo małych ilościach. Przykładem może być toluen, który wchłania się do ustroju przez drogi oddechowe, przewód pokarmowy i przez skórę. W organizmie następuje przemiana toluenu w kierunku utleniania grupy metylowej do kwasu benzoowego, który z kolei ulega przemianie w kwas hipurowy (70%).

**Odczynnik:**

- 6 M roztwór HCl
- 1.5% roztwór aldehydu p-dimetyloaminobenzoowego w bezwodniku octowym
- 0.16% roztwór FeCl₃ w bezwodniku octowym (przygotowany bezpośrednio przed oznaczeniem)
- alkohol etylowy 96%

Sprzęt:

- kolby miarowe
- rozdzielacze
- fiołki
- kolby okrągłodenne
- pipety Pasteura

Wykonanie:

5 mL moczu zakwasza się kwasem solnym do pH=2 i rozcieńcza wodą destylowaną do objętości 100 mL. Pobiera się 1 mL i poddaje ekstrakcji 5 mL octanu etylu, wytrząsając próbę w rozdzielaczu przez 1 minutę. Następnie pobiera się 1 mL ekstraktu i odparowuje do sucha. Do suchej pozostałości dodaje się 0.5 mL 1,5% aldehydu p-dimetyloaminobenzoowego w bezwodniku octowym oraz 0.5 mL 0,16% roztworu FeCl₃. Próbę ogrzewa się na wrzącej łaźni

CHEMIA SĄDOWA

wodnej przez 10 minut. Po oziębieniu dodaje się 4 mL etanolu i po dokładnym wymieszaniu oraz odczekaniu 10 minut oznacza się absorbancję przy długości fali 470 nm.

Wykres wzorcowy:

Do probówek dodaje się wzrastające ilości kwasu hipurowego: 10, 20, 30, 40, 50 i 60 mg i uzupełnia wodą destylowaną do 100 mL. Pobrać 1 mL każdego z roztworów. Po dodaniu 5 mL octanu etylu dalej postępuje się jak przy wykonywaniu oznaczenia. Zawartość kwasu hipurowego w badanej próbce odczytuje się z wykresu wzorcowego.

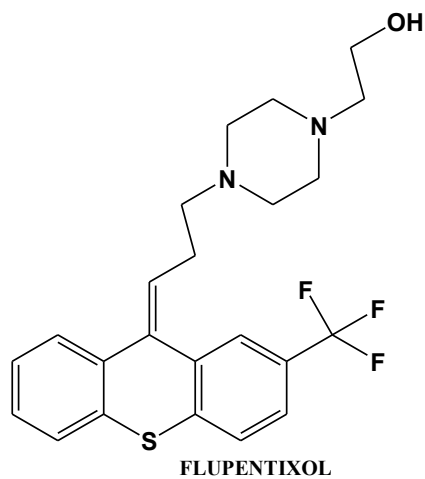
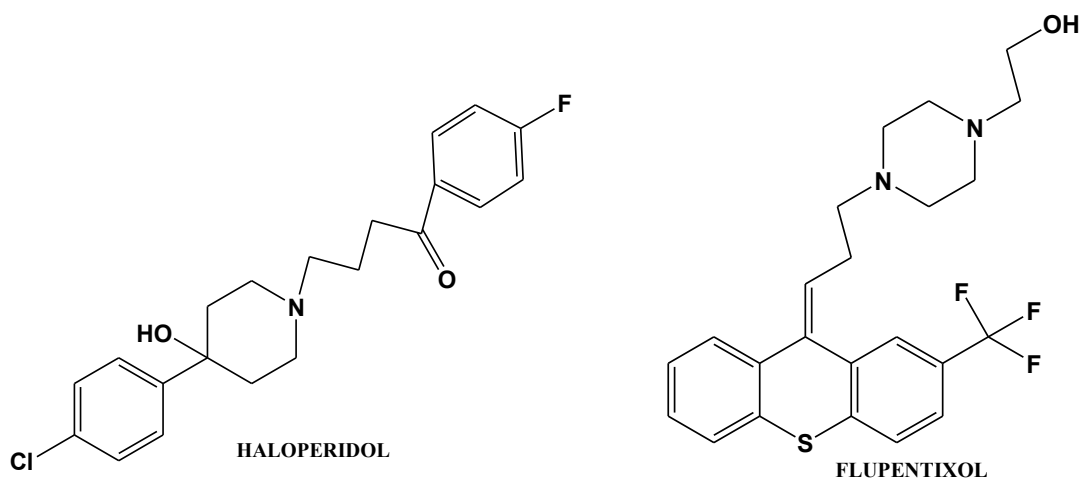
ĆWICZENIE 4

OZNACZANIE LEKÓW PRZECIWDOPRESYJNYCH W
PAZNOKCIACH I WŁOSACH

Analizowane leki przeciwdepresyjne, których obecność można oznaczyć w paznokciach: haloperidol, flupentixol, citalopram i jego metabolit desmetylocitalopram oraz acetolol i atenolol.

Haloperidol 4-[4-(p-chlorofenyl)-4-hydroksypiperidyno]-4-fluorobutyrofenon, pomimo wielu silnych działań ubocznych jest wciąż najczęściej stosowanym lekiem przeciwpsychotycznym i uspokajającym z grupy pochodnych butyrofenonu. Mechanizm działania leku opiera się przede wszystkim na hamowaniu receptorów dopaminowych w ośrodkowym układzie nerwowym. Pomimo tego, że haloperidol wykazuje pozytywne efekty lecznicze odznacza się też licznymi i silnymi działaniami niepożądanymi. Lek ten szybko wchłania się z przewodu pokarmowego osiągając max. stężenie we krwi po 3-6 h, w 90 % wiąże się z białkami osocza, a jego dawka toksyczna wynosi około 300 mg. Z danych literaturowych wynika, że haloperidol bywa przyczyną zatruc i jest stosowany jako substytut narkotyków. Część przyjmowanego leku gromadzi się też we włosach i paznokciach.

Z wykonanych badań wynika, że wyższe stężenie leku zaobserwowano w paznokciach nóg $98,9 \pm 9,14$ (średnia $98,9$ pg/mg) niż w paznokciach rąk $67,3 \pm 6,49$ (średnia $67,3$ pg/mg).



Flupentixol występuje między innymi w postaci leków o nazwie **Fluanxol** (0,5 mg, tabletki drażowane). Fluanxol należy do grupy leków, które znoszą objawy obniżenia nastroju, stosuje się go w zaburzeniach psychotycznych bez zaburzeń depresyjnych oraz także doraźnie w zaburzeniach depresyjnych innych, niż w przebiegu psychozy. Związkiem aktywnym farmakologicznie jest izomer *cis*-(z)-flupentixol. Działanie przeciwpsychotyczne flupentixolu spowodowane jest blokowaniem receptorów dopaminergicznych i wyzwalającym wtórne zmiany w innych układach neuroprzekaźnikowych. Biodostępność flupentixolu po podaniu doustnym wynosi około 40%, a maksymalne stężenie w surowicy występuje po około 4 godzinach, a jego metabolity nie wykazują aktywności neuroleptycznej. Lek wydalany jest głównie z kałem, w małych ilościach z moczem. Biologiczny okres półtrwania flupentixolu wynosi około 35 godzin.

Citalopram (1-[3-(dimetylamino)propylo]-1-(4-fluorofenylo)-1,3-dihydro-5-izobenzofuran-karbonitryl) należący do grupy selektywnych inhibitorów wychwytu zwrotnego serotoniny (SSRI) stosowany jest w zapobieganiu nawrotów zaburzeń depresyjnych oraz w niektórych zaburzeniach lękowych. Citalopram wchłania się szybko po podaniu doustnym, osiągając największe stężenie w osoczu średnio po 4 h. Jego biodostępność wynosi 80%, a okres półtrwania 33 h. Stężenie citalopramu we krwi osiąga stan równowagi po upływie 1-2 tygodni od podania leku i mieści się w granicach 20-200 ng/ml. Wydalanie z organizmu zachodzi przez wątrobę oraz nerki, a tylko do 23% leku jest wydalone w postaci nie zmienionej. Jego głównym metabolitem jest desmetylocitalopram.

Acebutolol jest β -blokerem i w profilaktyce stosowany jest równocześnie z kwasem acetylosalicylowym (ACA). ACA ma działanie przeciwbólowe, przeciwgorączkowe, przeciwzapalne i także przeciwzakrzepowe.

4.1. OZNACZANIE ŚRODKÓW PRZECIWDEPRESYJNYCH W PAZNOKCIACH

4.1.1. OZNACZANIE HALOPERIDOLU

Odczynniki

- paznokcie rąk i nóg
- woda destylowana
- aceton
- 1M NaOH
- chloroform
- n-heksan

Sprzęt

- zlewki
- nożyczki
- chłodnica zwrotna
- czasza grzejna
- kolba 100mL
- fiolka

Wykonanie:

Materiał biologiczny będący przedmiotem analizy stanowią paznokcie rąk i nóg. Celem badania jest wykonanie analizy na obecność haloperidolu w materiale biologicznym. Pobrane próby paznokci przechowywane były w temperaturze pokojowej.

W celu wyizolowania składnika z materiału dowodowego należy przeprowadzić ekstrakcję. Przed wykonaniem ekstrakcji otrzymany materiał należy zważyć (próbka powinna mieć masę około 100 mg), przemyć wodą destylowaną porcjami po 20 mL, odsączyć i przemyć jedną porcją acetonu (20 mL) w łaźni ultradźwiękowej (temperatura pokojowa). Tak przygotowany materiał należy wysuszyć i pociąć na drobne kawałki około 1 mm. Kolejnym etapem analizy jest hydroliza, którą przeprowadzamy w kolbie okrągłodennej zaopatrzonej w chłodnicę zwrotną stosując 30 mL 1M NaOH w temperaturze 95°C przez 10-15 minut. Ekstrakcję haloperidolu przeprowadza się 200 mL (4 porcje po 50 mL) mieszaniny n-heksanu i chloroformu (7:3 v/v). Otrzymane ekstrakty osuszyć nad bezwodnym MgSO₄, przesączyć zagęścić pod zmniejszonym ciśnieniem, zważyć, przenieść ilościowo do fiolki i oddać do analizy.

Analiza jakościowa i ilościowa na obecność haloperidolu w paznokciach przeprowadzona będzie z wykorzystaniem chromatografii LC-ESI-MS.

W celu potwierdzenia bądź wykluczenia obecności haloperidolu w analizowanym materiale otrzymane widmo należy porównać z widmem wzorcowym.

4.1.2. OZNACZANIE FLUPENTIXOLU

Odczynniki

- paznokcie rąk i nóg
- woda destylowana
- aceton
- 1M NaOH
- n-heksan

Sprzęt

- zlewki
- nożyczki
- chłodnica zwrotna
- czasza grzejna
- kolba 100mL
- fiolka

Materiał biologiczny będący przedmiotem analizy stanowią paznokcie rąk i nóg. Celem badania jest wykonanie analizy na obecność flupentixolu w materiale biologicznym. Pobrane próby paznokci przechowywane były w temperaturze pokojowej. Do badania trzeba pobrać co najmniej 50 mg materiału biologicznego.

W celu wyizolowania składnika z materiału dowodowego należy przeprowadzić ekstrakcję. Przed wykonaniem ekstrakcji otrzymany materiał należy zważyć (próbka powinna mieć masę

CHEMIA SĄDOWA

około 50 mg), przemyć wodą destylowaną - porcje po 20 mL, odsączyć i przemyć jedną porcją acetonu (20 mL) w łaźni ultradźwiękowej (temperatura pokojowa). Tak przygotowany materiał należy wysuszyć i pociąć na drobne kawałki około 1 mm. Kolejnym etapem analizy jest hydroliza, którą przeprowadzamy w kolbie okrągłodennej zaopatrzonej w chłodnicę zwrotną stosując 30 mL 1M NaOH w temperaturze 95°C przez 10-15 minut. Ekstrakcję flupentixolu przeprowadza się 200 mL (4 porcje po 50 mL) n-heksanu. Otrzymane ekstrakty należy osuszyć nad bezwodnym MgSO₄, przesączyć zagęścić pod zmniejszonym ciśnieniem, zważyć, przenieść ilościowo do fiolki i oddać do analizy.

Analiza jakościowa i ilościowa na obecność flupentixolu w paznokciach przeprowadzona będzie z wykorzystaniem chromatografii LC-ESI-MS.

W celu potwierdzenia bądź wykluczenia obecności flupentixolu w analizowanym materiale otrzymane widmo należy porównać z widmem wzorcowym.

4.1.3. OZNACZANIE CITALOPRAMU I DESMETYLOCITALOPRAMU

Odczynniki

- paznokcie rąk i nóg
- woda destylowana
- n-heksan
- chlorek metylenu

Sprzęt

- zlewki
- nożyczki
- chłodnica zwrotna
- czasza grzejna
- kolba 100mL

Wykonanie:

W celu wyizolowania składnika z materiału dowodowego należy przeprowadzić ekstrakcję. Przed wykonaniem ekstrakcji otrzymany materiał należy zważyć (próbka powinna mieć masę około 50 mg), a następnie poddać dekontaminacji przemywając wodą destylowaną (porcje po 20 mL), odsączyć i przemyć jedną porcją n-heksanu (20 mL) w łaźni ultradźwiękowej w temperaturze pokojowej. Tak przygotowany materiał należy wysuszyć i pociąć na drobne kawałki około 1 mm. Kolejnym etapem analizy jest hydroliza, którą przeprowadzamy w kolbie okrągłodennej zaopatrzonej w chłodnicę zwrotną stosując 30 mL 1M NaOH w temperaturze 95°C przez 10-15 minut. Ekstrakcję citalopramu i desmetylocitalopramu przeprowadza się 200 mL (4 porcje po 50 mL) chlorku metylenu. Otrzymane ekstrakty osuszyć nad bezwodnym MgSO₄, przesączyć zagęścić pod zmniejszonym ciśnieniem, zważyć, przenieść ilościowo do fiolki i oddać do analizy.

Analiza jakościowa i ilościowa na obecność citalopramu i desmetylocitalopramu w paznokciach przeprowadzona będzie z wykorzystaniem chromatografii LC-ESI-MS.

W celu potwierdzenia bądź wykluczenia obecności obu szukanych związków w analizowanym materiale otrzymane widmo należy porównać z widmem wzorcowym.

4.1.4. OZNACZANIE ACEBUTOLOLU I KWASU SALICYLOWEGO

Odczynniki

- około 100 mg paznokcie rąk i nóg
- woda destylowana
- aceton
- 0.1 M HCl
- eter dietylowy
- 0.1 M NaOH
- chlorek metylenu

Sprzęt

- zlewki
- nożyczki
- łaźnia
- fiołki
- rozdzielacz na 50 mL

Wykonanie:

Materiał biologiczny będący przedmiotem analizy stanowią paznokcie rąk i nóg. Celem badania jest wykonanie analizy na obecność acebutololu i kwasu salicylowego w materiale biologicznym. Pobrane próby paznokci przechowywane były w temperaturze pokojowej. Do badania trzeba pobrać co najmniej 100 mg materiału biologicznego.

W celu wyizolowania składnika z materiału dowodowego należy przeprowadzić ekstrakcję. Przed wykonaniem ekstrakcji otrzymany materiał należy zważyć (próbka powinna mieć masę około 100 mg), poddać dekontaminacji przemywając wodą destylowaną (porcje po 5 mL), a następnie 5 mL acetonu w łaźni ultradźwiękowej (temperatura pokojowa). Tak przygotowany materiał należy wysuszyć, pociąć na drobne kawałki około 1 mm i przeprowadzić hydrolizę. Następnie do tak przygotowanej próbki dodać 1 mL 0.1 M HCl i umieścić w łaźni ultradźwiękowej na 16 godzin w temperaturze 50 °C, po czym ekstrahować 4 porcjami po 5 mL eteru dietylowego. Obie warstwy dokładnie rozdzielić i na każdej prowadzić osobne badanie: warstwa eterowa (na obecność kwasu salicylowego) i warstwa wodna (na obecność acebutololu).

Warstwę eterową zagęścić pod zmniejszonym ciśnieniem, dodać 0,5 mL metanolu, przenieść do fiołki i oddać do analizy.

Warstwę wodną przenieść do rozdzielacza, zadać 1 mL 0,1 M NaOH i ekstrahować 4 porcjami po 5 mL chlorku metylenu. Następnie zagęścić pod zmniejszonym ciśnieniem, dodać 0,5 mL metanolu, przenieść do fiołki i oddać do analizy.

Analiza jakościowa i ilościowa na obecność acebutololu i kwasu salicylowego w paznokciach przeprowadzona będzie z wykorzystaniem chromatografii LC-ESI-MS.

W celu potwierdzenia bądź wykluczenia obecności szukanych związków w analizowanym materiale otrzymane widmo należy porównać z widmem wzorcowym.

4.2. OZNACZANIE ŚRODKÓW PRZECIWDEPRESYJNYCH WE WŁOSACH

4.2.1. OZNACZANIE HALOPERIDOLU I FLUPENTIXOLU

Odczynniki

- włosy
- aceton
- metanol
- kwas octowy
- chlorek metylenu
- aceton
- 2-propanol
- amoniak 25%

Sprzęt

- zlewki
- nożyczki
- rozdzielacz 50 mL
- fiolka

Wykonanie:

W celu wyizolowania składnika z materiału dowodowego należy przeprowadzić ekstrakcję. Przed wykonaniem ekstrakcji otrzymany materiał należy zważyć (próbka powinna mieć masę około 50 mg), przemyć kolejno małymi porcjami acetonu, eteru dietylowego i metanolu. Po wysuszeniu możliwie rozdrobnić (najlepiej w młynku kulowym), dodać 4 mL metanolu i mieszać w łaźni ultradźwiękowej przez 2 godziny. Po tym czasie metanol usunąć pod zmniejszonym ciśnieniem, a do pozostałości dodać buforu fosforanowego o pH = 6. Całość przemywać kolejno: 2 mL wody destylowanej, 1 mL 0.1M kwasu octowego, 2 mL metanolu i wysuszyć. Następnie dodać 1.5 mL roztworu składającego się z: chlorku metylenu/ 2-propanolu/ 25% NH₄OH (80:20:2,v/v). Tak przygotowaną próbkę przenieść do fiolki i przekazać do analizy LC-MS-MS.

Analiza na obecność haloperidolu i flupentixolu w badanym ekstrakcie z włosów przeprowadzona będzie z wykorzystaniem chromatografii LC-MS-MS. W celu potwierdzenia bądź wykluczenia obecności obu związków w analizowanym materiale otrzymane widmo należy porównać z widmem wzorcowym.

4.2.2. OZNACZANIE CITALOPRAMU I DESMETYLOCITALOPRAMU

Odczynniki

- włosy
- woda destylowana
- n-heksan
- chlorek metylenu

Sprzęt

- zlewki
- nożyczki
- chłodnica zwrotna
- czasza grzejna
- kolba okrągłodenna 100mL

Wykonanie:

W celu wyizolowania składnika z materiału dowodowego należy przeprowadzić ekstrakcję. Przed wykonaniem ekstrakcji otrzymany materiał należy zważyć (próbka powinna mieć masę około 50 mg), poddać dekontaminacji przemywając włosy wodą destylowaną (porcje po 20 mL), odsączyć i przemyć jedną porcją n-heksanu (20 mL) w łaźni ultradźwiękowej (temperatura pokojowa). Tak przygotowany materiał należy wysuszyć, pociąć na drobne kawałki około 1 milimetra i przeprowadzić hydrolizę (kolba okrągłodenna zaopatrzona w chłodnicę zwrotną; 30 mL 1M NaOH; temperatura 95°C; czas 10-15 minut). Ekstrakcję citalopramu i desmetylocitalopramu prowadzić porcjami chlorku metylenu (4 x 50 mL), (pH 8-10). Otrzymane ekstrakty osuszyć nad bezwodnym MgSO₄, przesączyć zageścić pod zmniejszonym ciśnieniem, zważyć, przenieść ilościowo do fiolki i oddać do analizy.

Analiza jakościowa i ilościowa na obecność citalopramu i desmetylocitalopramu we włosach przeprowadzona będzie z wykorzystaniem chromatografii LC-ESI-MS.

W celu potwierdzenia bądź wykluczenia obecności obu związków w analizowanym materiale otrzymane widmo należy porównać z widmem wzorcowym.

4.2.3. OZNACZANIE ACEBUTOLOLU I KWASU SALICYLOWEGO

Odczynniki

- włosy około 100 mg
- woda destylowana
- aceton
- 0.1 M HCl
- eter dietylowy
- 0.1 M NaOH
- chlorek metylenu

Sprzęt

- zlewki
- nożyczki
- łaźnia
- fiolki
- rozdzielacz na 50 mL

Wykonanie:

Materiał biologiczny będący przedmiotem analizy stanowią włosy. Celem badania jest wykonanie analizy na obecność acebutololu i kwasu salicylowego w materiale biologicznym. Pobrane próby włosów przechowywane były w temperaturze pokojowej. Do badania trzeba pobrać co najmniej 100 mg materiału biologicznego.

Izolację szukanego składnika z materiału dowodowego przeprowadza się na drodze ekstrakcji. Przed wykonaniem ekstrakcji otrzymany materiał należy zważyć (próbka powinna mieć masę około 100 mg), poddać dekontaminacji przemywając wodą destylowaną (porcje po 5 mL), a następnie acetonem (5 mL) w łaźni ultradźwiękowej (temperatura pokojowa). Tak przygotowany materiał należy wysuszyć, pociąć na drobne kawałki około 1 mm i przeprowadzić hydrolizę (opis powyżej). W dalszej kolejności dodać 1 mL 0.1 M HCl i umieścić w łaźni ultradźwiękowej na 16 godzin w temperaturze 50 °C. Następnie całość ekstrahować 4 porcjami po 5 mL eteru dietylowego. Obie warstwy dokładnie rozdzielić i na każdej prowadzić osobne badanie: warstwa eterowa (na obecność kwasu salicylowego) i warstwa wodna (na obecność acebutololu).

Warstwę eterową zagęścić pod zmniejszonym ciśnieniem, dodać w celu rozpuszczenia 0,5 mL metanolu, przenieść do fiolki i oddać do analizy.

Warstwę wodną przenieść do rozdzielacza, dodać 1 mL 0,1 M NaOH i ekstrahować 4 porcjami po 5 mL chlorku metylenu. Następnie zagęścić pod zmniejszonym ciśnieniem, dodać 0,5 mL metanolu, przenieść do fiolki i oddać do analizy.

Analiza jakościowa i ilościowa na obecność acebutololu i kwasu salicylowego we włosach przeprowadzona będzie z wykorzystaniem chromatografii LC-ESI-MS.

W celu potwierdzenia bądź wykluczenia obecności szukanых związków w analizowanym materiale otrzymane widmo należy porównać z widmem wzorcowym.

ĆWICZENIE 5

ANALIZA WŁOSÓW NA OBECNOŚĆ METALI CIĘŻKICH

Czułe metody i przyrządy pozwoliły na detekcję we włosie ludzkim więcej niż 60 pierwiastków. Takie pierwiastki jak Na, K, Cl, S, Zn, P, Cu i Fe są obecne w wyższych stężeniach we włosach i krwi. W mniejszych ilościach występują: Cr, Mn, Co, Pb, natomiast pierwiastki takie jak: Hg, As, Au, Tl nie powinny znajdować się w organizmie. Zawartość pierwiastków we włosach jest charakterystyczna dla specyficznych podgrup ogółu populacji i zależy od wielu czynników takich jak: długość włosów, wiek, rasa, płeć dawcy, kolor włosów, środowisko geograficzne, pożywienie i lekarstwa.

Zawartość śladowych pierwiastków we włosach

Pierwiastek	Wartości (µg/g)	
	Dane medyczne	Dane laboratoryjne
Wapń	204-712	200-600
Magnez	29-137	25-75
Fosfor	108-203	100-170
Sód	346-1080	150-350
Potas	42-430	75-180
Żelazo	21-50	20-50
Miedź	17-67	12-35
Molibden	0.59-2.55	0.1-1
Mangan	0.62-1.97	1-10
Cynk	104-288	160-240
Chrom	1.03-3.23	0.5-1.5
Selen	0.08-0.64	3-6
Lit	Nieokreślona	0.1-0.8
Nikiel	1.8	1-2
Kobalt	Nieokreślona	0.2-1
Wanad	-	0.5-1
Ołów	15	20-30
Rtęć	3	2.5-5
Kadm	1.6	1-2
Glin	2.9-5	20-40
Arsen	0.4	2-3

CHEMIA SĄDOWA

Odczynniki

- włosy około 500 mg
- woda destylowana
- aceton
- 65% HNO₃
- 30% H₂O₂

Sprzęt plastikowy

- nożyczki
- zlewki
- fiolki
- cylinder miarowy

Wykonanie:

Pobór próbek:

- z głowy jednego dawcy pobrać kilkadziesiąt włosów z 6 - 8 różnych miejsc głowy
- każdy włos powinien być odcięty blisko skalpu
- długość włosów pobranych do analizy 2-4 cm
- do analizy nie nadają się włosy po trwałej ondulacji lub farbowane
- próbka powinna mieć wagę około 0.5 g
- do pobierania próbek należy używać narzędzi plastikowych lub ze stali nierdzewnej
- próbki mogą być przechowywane w plastikowych fiolkach lub torebkach

Oczyszczanie próbek:

Próbkę włosów należy umieścić w gilzie i myć acetonem przy użyciu aparatu Soxhleta przez 1 godzinę, po czym przenieść włosy do plastikowej zlewki i płukać trzykrotnie w wodzie redestylowanej. Na koniec próbkę ponownie umyć acetonem (zlewka). Za każdym razem należy dodać taką ilość powyższych rozpuszczalników, aby całkowicie przykryć próbkę. Po każdorazowym myciu zdekantować ciecz i dodać świeżego rozpuszczalnika. W ten sposób umyte włosy suszyć ~ 45 minut w suszarce w temp. 60 °C (zlewkę przykryć bibułą), po czym przenieść do plastikowych fiolek. Wszystkie operacje przekładania włosów należy dokonywać przy pomocy plastikowych narzędzi.

Mineralizacja próbki:

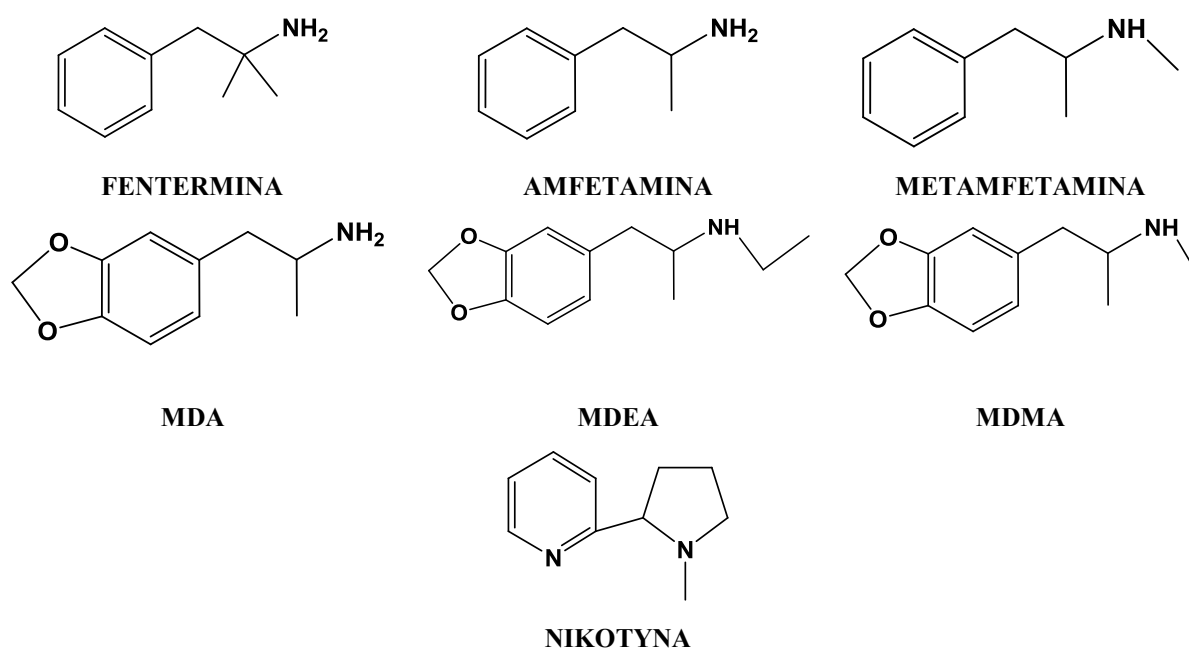
Mineralizację próbki należy przeprowadzić przy użyciu pieca mikrofalowego. Do mineralizacji użyć próbkę o masie 0.2 g. Do roztwarzania włosów należy stosować mieszaninę mineralizującą: 65% HNO₃ + 30% H₂O₂ w stosunku 2 : 1. (4 mL kwasu + 2 mL wody utlenionej).

Roztworzone próbki przenieść ilościowo do naczyń miarowych. Oznaczyć zawartość metali metodą AAS.

ĆWICZENIE 6

OZNACZANIE NIKOTYNY ORAZ AMFETAMINY I JEJ POCHODNYCH WE WŁOSACH ZA POMOCĄ METODY MIKROEKSTRAKCYJ Z FAZY NADPOWIERZCHNIOWEJ (HS-SPME)

Ciągle duży odsetek osób jest uzależniony od nikotyny oraz amfetaminy i jej pochodnych, dlatego tak ważne jest posiadanie narzędzi pozwalających na ocenę ich narażenia. Dzięki rozwojowi zaawansowanych metod i technik analitycznych możliwe jest oznaczanie wielu substancji w bardzo niskim zakresie stężeń. Oznaczenia biomarkerów umożliwiających ocenę narażenia na składniki dymu tytoniowego oraz środków odurzających z grupy amfetaminy wykonuje się w osoczu krwi, moczu, ślinie i wydychanym powietrzu. Interesującą metodą ze względu na bezproblemowe przechowywanie zebranego materiału jest analiza wyżej wymienionych związków w próbkach włosów.



Aby poprawnie przeprowadzić oznaczenie oraz interpretować otrzymane wyniki niezbędna jest znajomość budowy włosa, jego fizjologii, a także sposobu przenikania i wbudowywania oznaczanych związków do jego wnętrza. Podczas wzrostu włosa substancje które dostały się do krwiobiegu są wylapywane przez cebulkę włosa i w wyniku procesu keratynizacji oraz

okluzji są zatrzymywane w łodydze. Skład chemiczny łodygi włosa po wydostaniu się ponad powierzchnię skóry już praktycznie nie ulega zmianie. Dzięki temu włosy zawierają cenną informację na temat narażenia organizmu na różnego rodzaju substancje - w tym na składniki dymu tytoniowego czy środków odurzających.

Aby wyniki oznaczania wyżej wymienionych związków we włosach nie były zawyżone przez związki znajdującą się na powierzchni włosa, próbki oczyszcza się poprzez przemycie rozpuszczalnikiem organicznym (np. acetonem). Związki związane we wnętrzu włosa uwalnia się poprzez rozpuszczenie próbki w roztworze silnie zasadowym (np. w roztworze wodorotlenku sodu). Następnie stosuje się techniki ekstrakcyjne w celu zagęszczenia analitu. Sam proces oznaczania przeprowadza się w oparciu o technikę chromatografii gazowej z detektorem mas (MS) lub detektorem termojonizacyjnym (NPD). Znane są również metodyki bazujące na chromatografii cieczowej z detekcją mas lub detekcją UV.

Interesującą metodykę oznaczania wymienionych związków we włosach jest chromatografia gazowa w połączeniu z mikroekstrakcją z fazy nadpowierzchniowej (HS-SPME).

Odczynniki:

- wzorzec nikotyny 1mg/mL w metanolu
- wzorzec: amfetamina, metamfetamina, MDA, MDEA, MDMA, MBDB, fentermina 250 µg/mL w metanolu
- 3 mL 30% roztworu NaOH
- woda destylowana
- aceton cz.d.a.

Sprzęt:

- chromatograf gazowy Trace 1300 sprzężony ze spektrometrem mas ISQ QD
- strzykawka SPME z włóknem pokrytym fazą polidimetylosiloksanową o grubości filmu 100 µm
- fiołki o pojemności 10 mL zamykane z membranami PTFE/silikon
- pipeta automatyczna o pojemności 200 µL
- pipeta automatyczna o pojemności 1000 µL
- łaźnia olejowa
- myjka ultradźwiękowa

Przygotowanie roztworu wzorcowego nikotyny o zawartości 50 µg/mL

10 µL metanolowego roztworu nikotyny o zawartości 1mg/mL rozpuszcza się w 190 µL metanolu.

Przygotowanie roztworu wzorcowego: amfetamina, metamfetamina, MDA, MDMA, MDEA, fentermina o zawartości 50 µg/mL

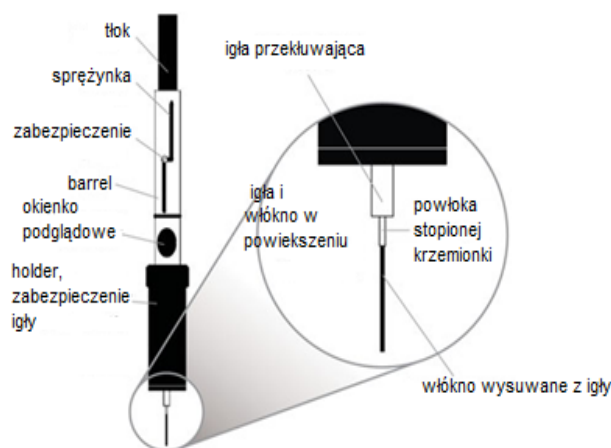
40 µL metanolowego roztworu amin: amfetamina, met amfetamina, MDA, MDMA, MDEA, fentermina o zawartości 250 µg/mL rozpuszcza się w 160 µL metanolu.

Przygotowanie próbek włosów do analizy

Każdą próbkę włosów pociąć na małe kawałki i przepłukać wstępnie wodą dejonizowaną (przez 15 minut) i następnie acetonem w myjce ultradźwiękowej (przez 5 minut). Przemyte próbki wysuszyć w strumieniu azotu w temperaturze pokojowej.

Wykonanie oznaczenia

Przemytą próbkę włosów (50 mg) umieścić w szklanej zamykanej fiolce o objętości 10 mL. Następnie do próbki dodać 1 mL 30% roztworu wodorotlenku sodu. Fiolkę szczelnie zamknąć i ogrzewać w temperaturze 70°C przez 20 minut. Po tym czasie przez membranę silikonowo/teflonową wprowadzić do naczynia igłę SPME i przeprowadzić proces ekstrakcji na wysuniętym włóknie przez 5 minut w temperaturze 70°C. Należy wykonać również analizę dla próbki włosów z dodatkiem wzorca – w tym celu do nowej próbki włosów (50 mg) należy dodać 10 µL roztworu wzorcowego nikotyny (o stężeniu 50 µg/mL) i 10 µL roztworu wzorcowego: amfetaminy, metamfetaminy, MDA, MDMA, MDEA, fenterminy (o stężeniu 50 µg/mL) oraz 1 mL 30% roztworu wodorotlenku sodu a proces ekstrakcji prowadzić w identycznych warunkach jak dla próbki bez dodatku wzorca.



Budowa uchwyty SPME z zamontowanym włókniem

Proces oznaczania zaadsorbowanej nikotyny na włóknie SPME wykonać się na chromatografii gazowej ThermoScientific Trace 1300 sprzężonej z spektrometrem mas ISQ QD. W tym celu przeprowadzić desorpcję związków w temperaturze 250°C, wprowadzając włókno SPME do dozownika chromatografu na 5 minut. Separację uwolnionych związków

CHEMIA SĄDOWA

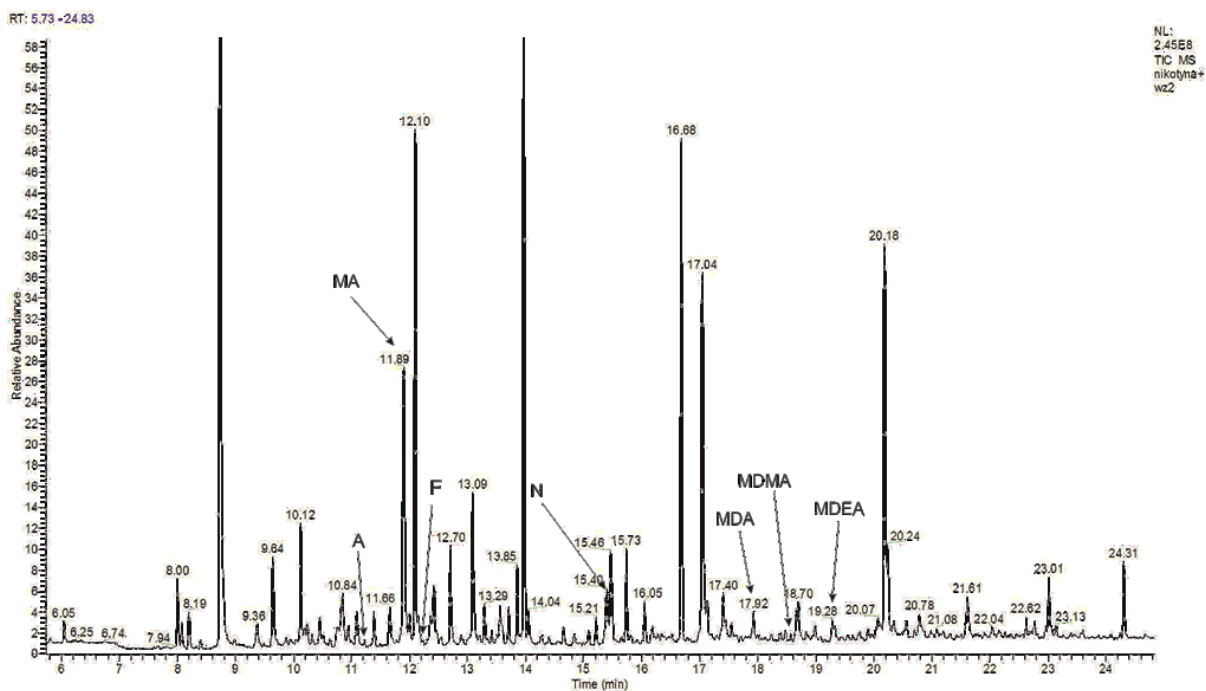
przeprowadzić na kolumnie kapilarnej CP-Sil 5ms (30m x 0,25mm x 0,25 μ m) przy następującym programie temperaturowym: 60°C przez 2 minuty, przyrost 20°C/min do 250°C (przez 15 minut). Jako gaz nośny zastosować hel, przy szybkości przepływu 1 mL/min. Dozownik ustawić w trybie pracy - splitless.

Opracowanie wyników

Dla wykonanych analiz chromatograficznych próbki analizowanych włosów oraz próbki analizowanych włosów z dodatkiem roztworów wzorcowych identyfikację pików przeprowadzić w oparciu o dane zamieszczone w poniższej tabeli – czas retencji i charakterystyczne jony fragmentacyjne.

Identyfikacja oznaczanych związków		
Oznaczany związek	Czas retencji (min)	Jony fragmentacyjne (intensywność)
Amfetamina	11,25	44 (100), 91 (15), 65 (10)
Metamfetamina	11,89	58 (100), 91 (10), 65 (8)
Fentermina	12,24	58 (100), 91 (20), 134 (10)
Nikotyna	15,40	84 (100), 133 (35), 162 (20)
MDA	17,92	44 (100), 136 (44), 135 (44)
MDMA	18,59	58 (100), 77 (27), 135 (29)
MDEA	19,28	72 (100), 44 (27), 135 (10)

Obliczyć zawartość poszczególnych związków w analizowanych próbkach - wiedząc, że 10 μ L roztworu wzorcowego nikotyny o stężeniu 50 μ g/mL i 10 μ L wzorcowego roztworu amin (amfetamina, met amfetamina, MDA, MDMA, MDEA, fentermina) o stężeniu 50 μ g/mL dodanego do analizowanej próbki odpowiada 10 ng oznaczanych związków w 1 mg próbki włosów. Poniżej przedstawiono przykładowy chromatogram analizy włosów ciemnych z zaznaczeniem sygnałów pochodzących od oznaczanych związków.



Przykładowy chromatogram pokazujący kolejność elucji oznaczanych związków.

ĆWICZENIE 7

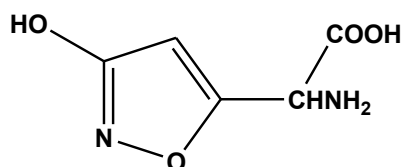
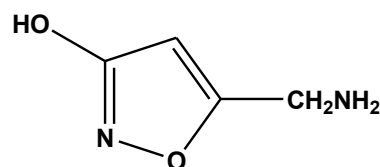
IDENTYFIKACJA MUSCIMOLU W PRÓBKACH GRZYBÓW

Z WYKORZYSTANIEM TECHNIKI GC-MS

Z pośród znanych ponad 5000 odmian grzybów 80 posiada związki o właściwościach psychoaktywnych. Część z nich jest dostępna na terenie Polski i jest wykorzystywana do narkotyzowania. Głównymi substancjami o właściwościach halucynogennych występującymi w grzybach są psylocybina oraz towarzysząca jej psylocyna. Podobne działanie posiada również baeocystyna będąca pochodną psylocybiny, a różniąca się jedynie brakiem podstawnika metylowego przy azocie w łańcuchu bocznym, oraz występująca w ilościach śladowych norbaeocystyna.

Właściwości psychotropowe posiadają również muscimol i kwas ibotenowy – związki obecne między innymi w muchomorze czerwonym (*Amanitamuscaria*) i muchomorze plamistym (*Amanitapantherina*). Muchomor czerwony jest gatunkiem kosmopolitycznym, natomiast muchomor plamisty rośnie w Europie, Azji, Ameryce Północnej, a także w południowej Afryce. Muchomor czerwony w celach psychotropowych stosowany był od bardzo dawna, można znaleźć doniesienia sięgające czasów starożytnych. Rytualne stosowanie *Amanitamuscaria* oprócz Europy odnotowano również na terenie Syberii oraz Azji. Obecnie zatrucia *Amanitamuscaria* wynikają przede wszystkim ze świadomego wykorzystywania tego gatunku grzyba w celu odurzenia. Zatrucia w przypadku *Amanitapantherina* są przypadkowe i wynikają z powodu pomylenia tego grzyba z gatunkami jadalnymi takimi jak: *Amanitarubescens*, *Amanitaspissa* czy *Macrolepiotaprocera*.

Psychotropowe właściwości kwasu ibotenowego oraz muscimolu są interpretowane przez ich strukturalne podobieństwo do endogennego neuroprzekaźnika kwasu glutaminowego i kwasu gama-aminomasłowego. Psychoaktywna dawka kwasu ibotenowego wynosi 30-90 mg, a muscimolu około 6-10 mg. Należy pamiętać, że powyższe ilości znajdują się już w jednym kapeluszu *Amanitamuscaria* czy *Amanitapantherina*. Oprócz wymienionych związków grzyby te zawierają również inne substancje czynne (np. muskazon) - jednak ilość ich nie ma znaczenia farmakologicznego.

**KWAS IBOTEINOWY****MUSCYMOL****Odczynniki:**

- muscimol
- *n*-pentadekan (standard wewnętrzny)
- BSTFA
(*N,O*-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide,
Trimethylchlorosilane)

Sprzęt:

- chromatograf gazowy Trace 1300
sprzężony ze spektrometrem mas ISQ QD
- fiołki o pojemności 1,7mL i 10mL
zamykane z membranami PTFE/silikon
- pipeta automatyczna o pojemności 200μL
- pipeta automatyczna o pojemności 1000μL
- łaźnia olejowa
- myjka ultradźwiękowa
- butla ze sprężonym azotem

Przygotowanie próbek grzybów do analizy

Części grzybów (kapelusz oraz trzon) należy poddać liofilizacji i pociąć na drobne kawałki oraz zmielić w mójdzierzu agatowym na drobny proszek. Następnie odważyć 25 mg próbki przenieść do fiołki i ekstrahować 1 mL 70% alkoholu metylowego wytrząsając przez 5 minut. Próbkę odwirować przy 3000 obrotów/minutę przez 3 minuty. 100 μL przesącza przenieść do oddzielnej fiołki na 1,7 mL i odparować do sucha w strumieniu azotu. Do pozostałości po odparowaniu dodać 25 μL BSTFA, fiołkę zamknąć i prowadzić reakcję derywatywacji w temperaturze 80°C przez okres 30 minut. Następnie dodać 25 μL roztworu octanu etylu zawierającego 20ug/mL *n*-pentadekanu jako wzorca wewnętrznego (próbkę dokładnie wymieszać najlepiej na wytrząsarce).

Przygotowanie roztworu standardu wewnętrznego

typ roztworu	ilość wzorca	ilość rozpuszczalnika (octanu etylu)
roztwór wyjściowy	13 μL <i>n</i> -pentadekanu	10 mL
roztwór roboczy	20 μL roztworu wyjściowego <i>n</i> -pentadekanu	980 μL

Przygotowanie krzywej kalibracyjnej

Krzywą kalibracyjną dla muscimolu o zawartości 25, 50, 150, 400, 1000, 2000 ppm należy przygotować względem standardu wewnętrznego - *n*-pentadekanu. W tym celu należy przygotować 6 próbek po 25 mg sproszkowanego grzyba niezawierającego muscimolu i dodać 50 μL roztworu zawierającego muscimol – poszczególne punkty do krzywej należy

CHEMIA SĄDOWA

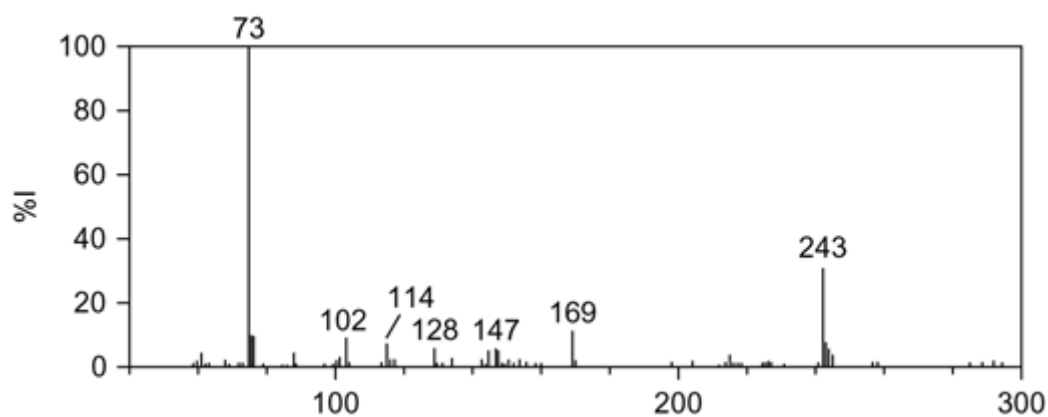
przygotować z według tabeli zamieszczonej poniżej. Dalszy tok postępowania jest identyczny jak w przypadku analizowania próbek grzybów, tj. po ekstrakcji metanolem i odparowaniu do sucha należy dodać BSTFA i 50 μ L standardu wewnętrznego i przeprowadzić reakcję derywatywacji.

Przygotowanie roztworu muscymolu do krzywej kalibracyjnej		
typ roztworu	ilość wzorca	ilość rozpuszczalnika (octanu etylu)
roztwór wyjściowy	10 mg muscymolu	1000 μ L
roztwór roboczy 2000 ppm	200 μ L roztworu wyjściowego	800 μ L
roztwór roboczy 1000 ppm	100 μ L roztworu wyjściowego	900 μ L
roztwór roboczy 400 ppm	400 μ L roztworu wyjściowego 1000ppm	600 μ L
roztwór roboczy 150 ppm	150 μ L roztworu wyjściowego 1000ppm	850 μ L
roztwór roboczy 50 ppm	50 μ L roztworu wyjściowego 1000ppm	950 μ L
roztwór roboczy 25 ppm	25 μ L roztworu wyjściowego 1000ppm	975 μ L

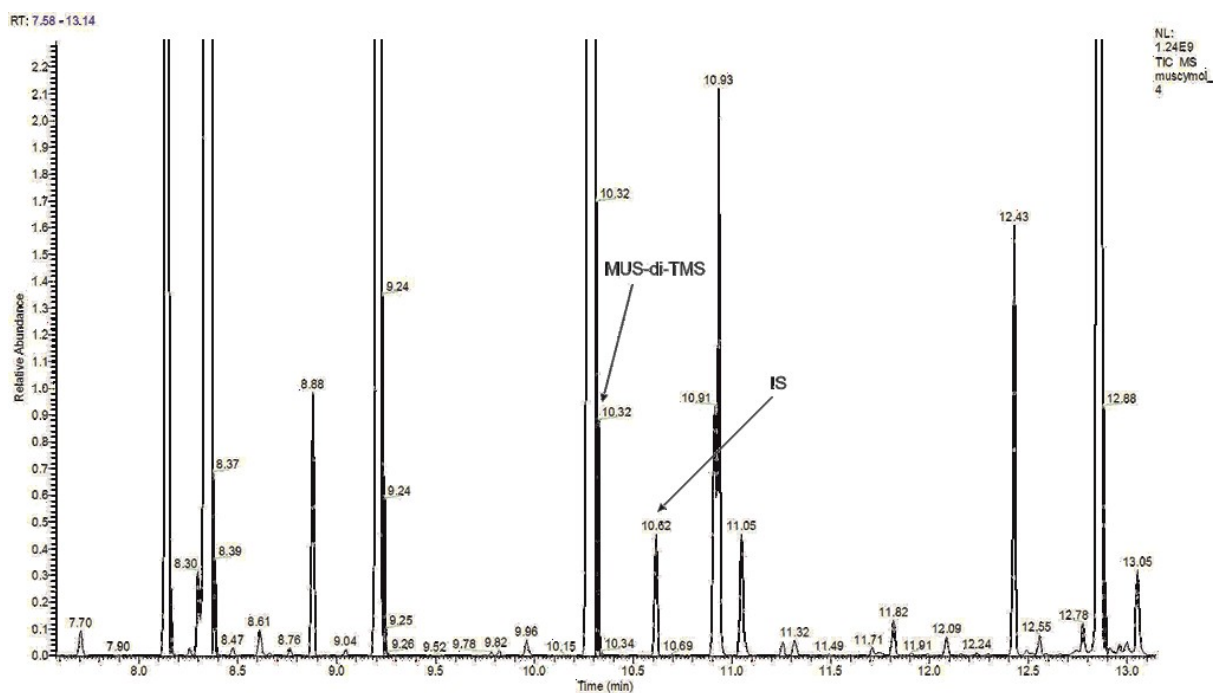
Wykreślić krzywą kalibracyjną zaznaczając na osi X zawartości muscymolu a na osi Y stosunek powierzchni piku pochodzącego od muscymolu do powierzchni piku pochodzącego od standardu wewnętrznego. Za pomocą regresji liniowej wyznaczyć współczynnik korelacji, który powinien wynosić minimum 0,99.

Wykonanie oznaczenia

Analizę GC-MS należy wykonać na chromatografie ThermoTrace 1300 sprzężonym z detektorem mas ISQ QD. Detektor należy ustawić na pełne skanowanie (tryb TIC) w zakresie m/z 40-450. Analizę ilościową należy wykonać dla wybranych jonów: m/z 243 dla muscymolu i m/z 57 dla standardu wewnętrznego. Próbkę w ilości 1 μ L należy dozować w trybie split/splitless 1:30 przy wyłączonym podziale strumienia przez 30 sekund i temperaturze 220°C. Temperatura linii transferowej powinna wynosić 250°C a źródła jonów 200°C. Separację związków należy wykonać na kolumnie kapilarnej pokrytej fazą 007-05MS (30m x 0,25 mm x 0,25 μ m) przy programie temperaturowym: 70°C (1min) przyrost 15°C/min do 300°C (5 min). Przy tak dobranych parametrach rozdziału chromatograficznego muscymol-di-TMS powinien eluować po około 10, 30 minutach a standard wewnętrzny (IS) po 10, 60 minutach. Poniżej zamieszczono widmo mas dla muscymolu-di-TMS oraz przykładowy chromatogram pokazujący kolejność elucji oznaczanych związków.



Widmo mas dla muscimolu-di-TMS.



Przykładowy chromatogram pokazujący kolejność elucji związków.

ĆWICZENIE 8

OZNACZANIE ZAWARTOŚCI ALKOHOLU ETYLOWEGO W PŁYNACH USTROJOWYCH CZŁOWIEKA METODĄ CHROMATOGRAFII GAZOWEJ HEAD-SPACE

Oznaczanie zawartości alkoholu etylowego w płynach ustrojowych człowieka na terenie Polski wykonywane jest od 1957 roku. Obecnie na kraju tego typu badania wykonywane są w 13 ośrodkach policyjnych, a liczba wykonywanych analiz jest na poziomie 7500 rocznie. Zgodnie z zaleceniami Zarządu Głównego Polskiego Towarzystwa Medycyny Sądowej i Kryminologii (z 2004) oraz Instytutu Ekspertyz Sądowych w Krakowie (z 2005) stężenie alkoholu etylowego w płynach ustrojowych wyznacza się metodą enzymatyczną oraz metodą chromatografii gazowej. W przypadku tej drugiej techniki wskazane jest aby była ona sprzężona z techniką analizy fazy nadpowierzchniowej head-space.

Centralne Laboratorium Kryminalistyczne KGP wykonuje ten typ oznaczeń zgodnie z procedurą badawczą nr HJ-60/Pb-IV/3/08 „Oznaczanie zawartości alkoholu etylowego we krwi człowieka metodą chromatografii gazowej head-space”, w myśl której badanie laboratoryjne zabezpieczonego materiału wykonywane jest na dwóch oddzielnie pobranych próbkach przy wykorzystaniu kolumn o odmiennej polarności. Sama metoda charakteryzuje się krótkim czasem analizy, wysoką czułością pomiaru oraz dużą selektywnością w stosunku do etanolu. Próbkę umieszcza się w szczelnie zamykanym naczyniu z membraną silikonową. W podwyższonej temperaturze dochodzi do częściowego odparowania alkoholu etylowego z oznaczanej matrycy i ustalenie równowagi między fazą ciekłą a gazową zgodnie z prawem Henr`ego-Daltona. Oznaczenie prowadzi się względem wzorca wewnętrznego – *tert*-butanolu (2-metylo-2-propanolu).

Odczynniki:

- wzorzec: *tert*-butanol 0,05‰ w H₂O
- wzorzec: roztwór wodny alkoholu o stężeniach w granicach od 0,1‰ do 5,0‰
- liofilizowana surowica krwi
- próbki surowicy zawierające alkohol etylowy

Sprzęt:

- chromatograf gazowy Trace 1300 sprzężony ze spektrometrem mas ISQ QD
- kapilarna kolumna chromatograficzna o długości 30 m i średnicy 0,25mm, pokryta fazą stacjonarną 007-05MS o grubości 0,25µm
- strzykawka gazoszczelna o pojemności 1000 µL

Opracowanie:

Beata Jasiewicz, Iwona Kowalczyk, Joanna Kurek, Arleta Sierakowska, Rafał Wawrzyniak

- fiołki head-space o pojemności 10mL zamykane z membranami PTFE/silikon
- fiołki o pojemności 1,7mL zamykane z membranami PTFE/silikon
- fiołki o pojemności 4mL zamykane z membranami PTFE/silikon
- pipeta automatyczna o pojemności 200 μ L
- pipeta automatyczna o pojemności 1000 μ L
- blok grzejny

Przygotowanie roztworów wzorcowych alkoholu etylowego w wodzie

Na wstępie należy przygotować 2% (v/v) roztwór wyjściowy alkoholu etylowego w wodzie poprzez rozpuszczenie 40 μ L etanolu w 1960 μ L wody. Następnie przygotować z roztworu wyjściowego według poniższej tabelki wodne roztwory alkoholu etylowego, które po dodaniu do surowicy krwi będą odpowiadały 0,1‰; 0,2‰; 0,5‰; 2,0‰; 5,0‰ etanolu.

Przygotowanie roztworów etanolu do krzywej kalibracyjnej		
typ roztworu	ilość roztworu roboczego	ilość rozpuszczalnika (wody)
roztwór 0,1‰	10 μ L	990 μ L
roztwór 0,2‰	20 μ L	980 μ L
roztwór 0,5‰	50 μ L	950 μ L
roztwór 2,0‰	200 μ L	800 μ L
roztwór 5,0‰	500 μ L	500 μ L

Przygotowanie roztworu wzorcowego standardu wewnętrznego w wodzie

Przygotować wyjściowy 2% v/v roztwór *tert*-butanolu w wodzie poprzez rozpuszczenie 20 μ L *tert*-butanolu w 980 μ L wody. Następnie przygotować roztwór roboczy *tert*-butanolu, który będzie dodawany jako standard wewnętrzny do roztworów krzywej wzorcowej i próbek. Otrzymujemy go przez zmieszanie 50 μ L roztworu wyjściowego z 950 μ L wody.

Przygotowanie krzywej wzorcowej

Do 5 fiołek o pojemności 10mL należy odmierzyć 100 μ L surowicy oraz po 100 μ L roztworów zawierających poszczególne stężenia alkoholu etylowego oraz 100 μ L standardu wewnętrznego (*tert*-butanolu). Fiołki szczelnie zamknąć i inkubować w bloku grzejnym w temperaturze 60°C przez 15 minut.

Przygotowanie próbek surowicy do analizy

Do fiolki z próbką surowicy do badań (100uL) należy dodać 100uL wody oraz 100uL roztworu standardu wewnętrznego. Fiolkę szczelnie zamknąć i inkubować w bloku grzejnym w temperaturze 60°C przez 15 minut.

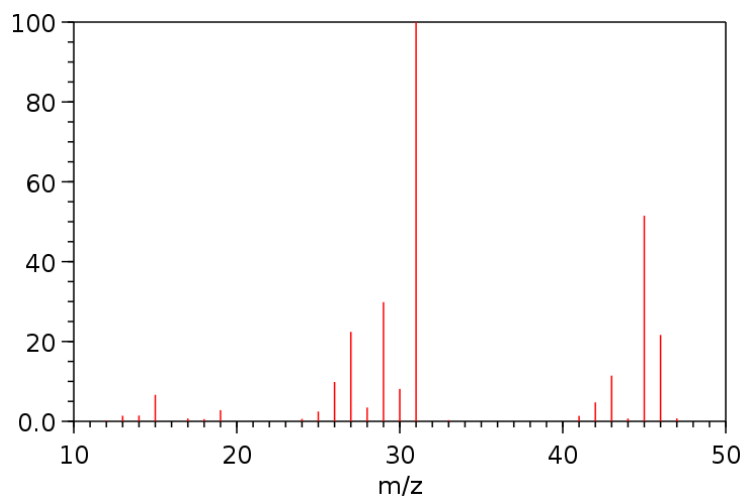
Wykonanie oznaczenia

Proces oznaczania alkoholu etylowego wykonać się na chromatografie gazowym ThermoScientificTrace 1300 sprzężonym z spektrometrem mas ISQ QD. Spektrometr mas należy ustawić w trybie skanowania jonów od 15 do 60 m/z. Temperatura linii transferowej powinna wynosić 250°C a źródła jonów 200°C. Rejestrację jonów należy rozpocząć po 1,20minuty od momentu wprowadzenia próbki. W tym celu należy pobrać z inkubowanej fiolki head-space (10mL) strzykawką gazoszczelną objętość 200uL fazy nadpowierzchniowej. Separację analizowanych związków przeprowadzić na kolumnie kapilarnej 007-05MS (30m x 0,25mm x 0,25µm) przy izotermicznym programie temperaturowym: 40°C przez 2,5 minuty. Jako gaz nośny zastosować hel, przy szybkości przepływu 1,5mL/min. Temperatura dozownika powinna wynosić 250°C, tryb pracy split a podział strumienia powinien wynosić 1:20.

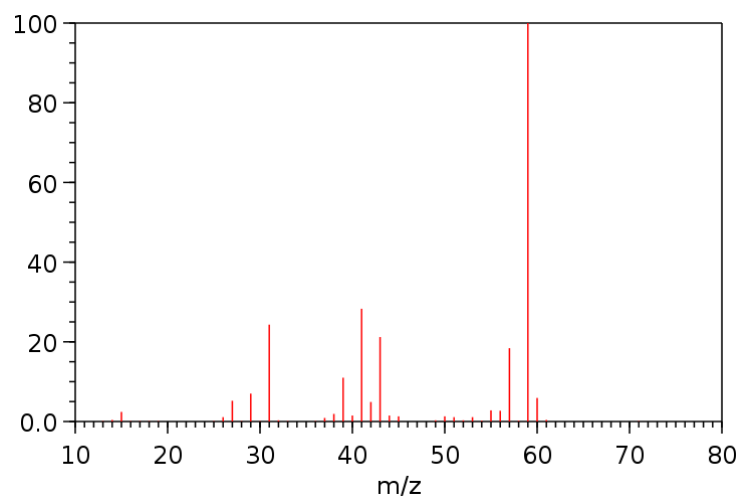
Opracowanie wyników

Na podstawie stosunku powierzchni pików etanolu dla poszczególnych stężeń do powierzchni pików wzorca wewnętrznego (*tert*-butanolu) wykreślić krzywą wzorcową (rysunek 4), która posłuży do odczytania zawartości etanolu w badanych próbkach surowicy. W celu sporządzenia krzywej piki należy integrować względem najintensywniejszych jonów to jest dla alkoholu etylowego dla jonu $m/z=31$ a dla alkoholu *tert*-butylowego względem jonu $m/z=59$.

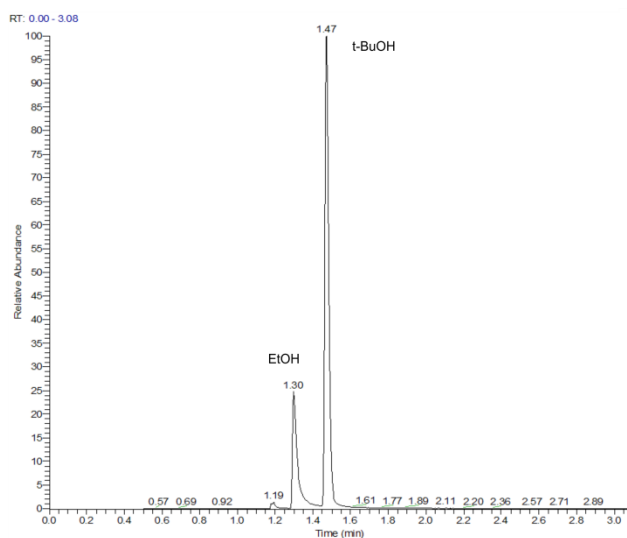
Wszystkie pomiary, tj. dla próbek oraz roztworów do sporządzenia krzywej należy wykonać podwójnie. Krzywą oraz sam pomiar należy odczytać na podstawie wartości średnich.



Widmo fragmentacji jonów alkoholu etylowego



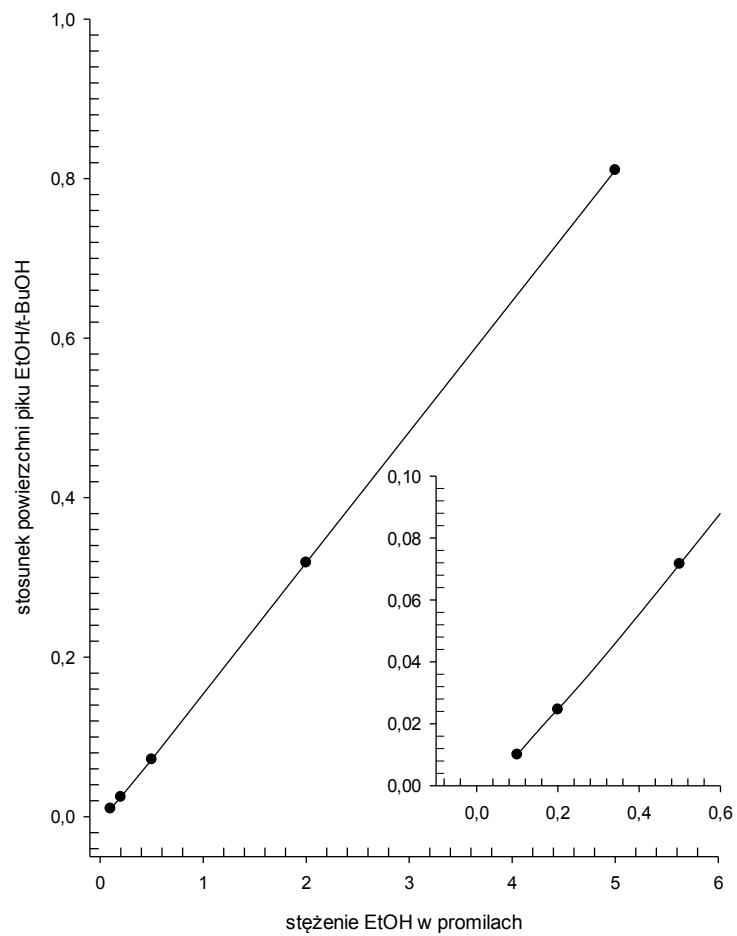
Widmo fragmentacji jonów alkoholu *tert*-butylowego



Przykładowy chromatogram pokazujący kolejność elucji oznaczanych składników

Opracowanie:

Beata Jasiewicz, Iwona Kowalczyk, Joanna Kurek, Arleta Sierakowska, Rafał Wawrzyniak



Przykładowa krzywa wzorcowa oznaczania alkoholu etylowego w osoczu

ĆWICZENIE 9

METODY IDENTYFIKACYJNE W CHEMII SĄDOWEJ

9.1. ANALIZA ODCISKÓW PALCÓW

9.1.1. UJAWNIANIE ODCISKÓW PALCÓW ZA POMOCĄ PROSZKÓW DAKTYLOSKOPIJNYCH I BIAŁEGO CEMENTU I KURKUMY

Odczynniki:

- proszek grafitowy
- węgiel drzewny (utarty na proszek)
- brąz aluminiowy „BRĄZAL”
- sproszkowany tlenek żelaza(III)
- sproszkowane żelazo
- etanol
- biały cement
- kurkuma

Sprzęt:

- delikatne pędzle
- szalki Petriego
- moździerz porcelanowy
- szklane talerze, szklanki, butelki
gładkie kafelki/glazura/płytki
- szeroka taśma przyklepna
- biały papier
- płyta CD
- folia aluminiowa
- folia plastikowa

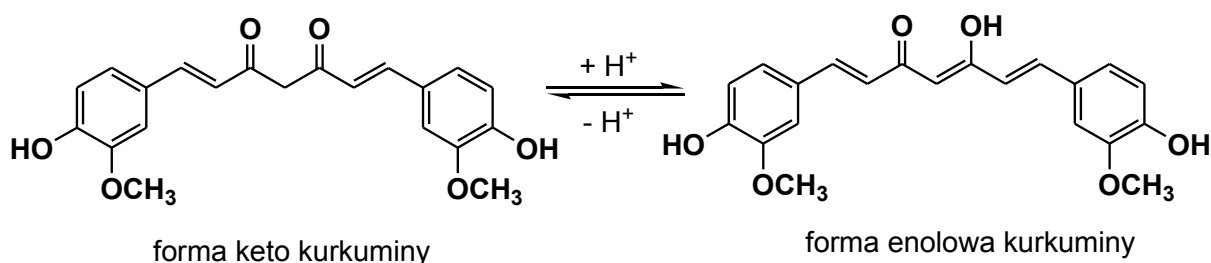
Wykonanie:

Pozostawić odciski palców (im bardziej spocone dłonie, tym lepszy efekt) na dostępnych przedmiotach podanych w opisie ćwiczenia (szklane talerze, szklanki, butelki, gładkie kafelki/glazura/płytki). W zależności od rodzaju powierzchni stosuje się różnego rodzaju proszki, najczęściej na jasną powierzchnię stosuje się ciemny proszek. Niewielką ilość wybranego proszku umieścić w szalce Petriego i delikatnie zanurzyć w nim pędzelek.

UWAGA!!! Należy nabierać nieznaczne ilości proszku na pędzelek, gdyż można zamazać ślady. W przypadku zamazania śladów pędzelkiem z proszkiem, miejsce na przedmiocie przetrzeć dokładnie wacikiem nasączonym etanolem i nanieść ślad ponownie. Pędzelek zanurzony w proszku delikatnie przesuwamy po całej powierzchni przedmiotu w celu ujawnienia śladów odcisków palców. Następnie na ujawniony ślad przyklejamy taśmę klejącą i po chwili delikatnie odklejamy starając się nie przesuwać jej powierzchni, aby nie zamazać śladów, po czym naklejamy na kawałek białego papieru w celu utrwalenia odcisku. Proszek przylega tylko do śladów pozostawionych przez palce. Odcisk palca zostaje ujawniony w kolorze używanego proszku w postaci linii papilarnych.



Sproszkowana kurkuma zawierająca barwnik kurkuminę może być stosowana z dobrym skutkiem do wielu różnych powierzchni: plastikowa folia, powierzchnie drewniane, folii aluminiowej, na obu stronach płyt CD,



9.1.2. UJAWNIANIE ODCISKÓW PALCÓW ZA POMOCĄ PAR JODU

Odczynniki:

- jod elementarny
- piasek
- 1% roztwór skrobi (zawiesina)

Sprzęt:

- słoik z nakrętką
- łaźnia piaskowa lub płyta grzejna
- papier (najlepiej do drukarki)
- szczypce (pinceta)
- taśma klejąca
- rozpylacz

Wykonanie:

Jod zostaje zaadsorbowany na powierzchni śladu poprzez oddziaływanie z substancjami pozostawionymi przez palce na danej powierzchni (np. pot, woda, tłuszcz). Odciski po ujawnieniu będą widoczne w postaci brązowych linii papilarnych. Po wyjęciu ze słoika należy w pierwszej kolejności usunąć ewentualny nadmiar jodu poprzez umieszczenie kartki z ujawnionymi śladami pod dygestorium (Uwaga! Pary jodu są szkodliwe) na statywie na powietrzu.

Utrwalanie odcisków:

- spryskać kartkę 1% roztworem skrobi (przed użyciem pojemnik z roztworem wstrząsnąć)
- ponieważ pary jodu są dość lotne dlatego po wyjęciu z komory (słoika) paska papieru z ujawnionymi odciskami palców i usunięciu nadmiaru jodu, należy przykleić jak najszybciej obustronnie taśmę klejącą, w przeciwnym razie będą one widoczne tylko przez krótki okres czasu.



9.1.3. UJAWNIANIE ODCISKÓW PALCÓW ZA POMOCĄ ROZTWORU NINHYDRYNY

Odczynniki:

- 0,1 g ninhydryny
- 50 mL metanolu
- 1,5 mL lodowatego kwasu octowego

Sprzęt:

- 2 zlewki po 100 mL
- cylinder miarowy
- pipeta
- rozpylacz
- papier (najlepiej do drukarek)
- listwy drewniane

Uwaga! Wszystkie czynności w ćwiczeniu należy wykonywać pod dygestorium i sprawnie działającym wyciągiem!

Metoda stosowana do ujawniania odcisków palców na papierze i drewnie.

Wykonanie:

Przygotowanie roztworu ninhydryny: odważyć 0,1 g ninhydryny, wsypać do zlewki, w której znajduje się 50 mL metanolu i dokładnie wymieszać. Następnie dodać 1,5 mL lodowatego kwasu octowego.

Metoda 1

Opracowanie:

Beata Jasiewicz, Iwona Kowalczyk, Joanna Kurek, Arleta Sierakowska, Rafał Wawrzyniak

CHEMIA SĄDOWA

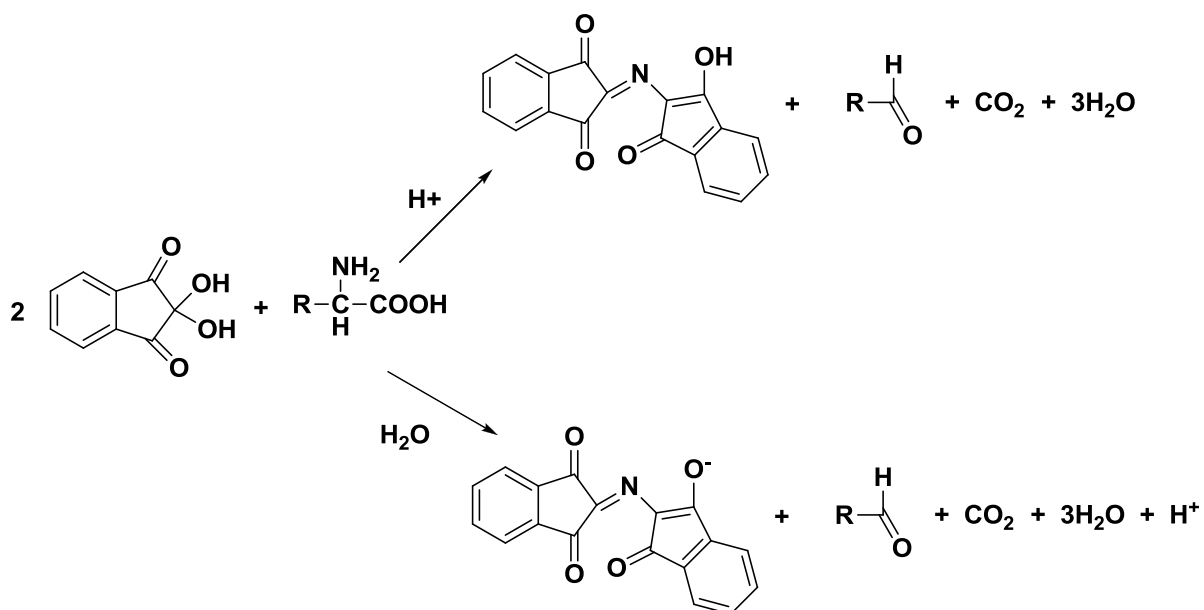
Kartkę papieru z ujawnionymi odciskami palców należy spryskać roztworem ninhydryny (w postaci mgiełki) i suszyć przez kilka minut na powietrzu. Następnie kartkę papieru ogrzewać nad płytą grzejną. Jeżeli jakość ujawnionych odcisków nie jest dostatecznie dobra, to należy powtórzyć całą procedurę.

Metoda 2

Kartkę papieru z ujawnionymi odciskami palców należy spryskać roztworem ninhydryny (w postaci mgiełki) i suszyć przez kilka minut na powietrzu. Następnie kartkę papieru ogrzewa się w piecu wysokotemperaturowym przez 30 minut umieszczając obok naczynie z wodą (w temperaturze 90-100°C).

Ujawnione odciski palców przyjmują barwę fioletowo-niebieską (jeżeli do roztworu ninhydryny nie został dodany lodowaty kwas octowy) lub jasnofioletowo-różową (roztwór ninhydryny z dodatkiem lodowatego kwasu octowego).

Poniższy schemat prezentuje produkty reakcji ninhydryny z aminokwasami w środowisku kwaśnym i obojętnym.



Ninhydrina (2,2-dihydroksiindano-1,3 dion) jest reagentem odznaczającym się dużym powinowactwem do aminokwasów, polipeptydów i białek, które są pozostawiane na papierze. Ninhydrina pozostaje w równowadze z indano-1,2,3-trionem, który tworzy zasadę Shiffa z aminokwasami. W reakcji tworzy się ketoimina, która rozkłada się z utworzeniem aldehydu i

przejdzie do aminy, reagującej na zasadzie kondensacji z innymi cząsteczkami ninhydryny tworząc purpurę Ruhemanna.

9.1.4. UJAWNIANIE ODCISKÓW PALCÓW ZA POMOCĄ METODY CYJANOAKRYLOWEJ I BARWNIKA *BASIC YELLOW 40*

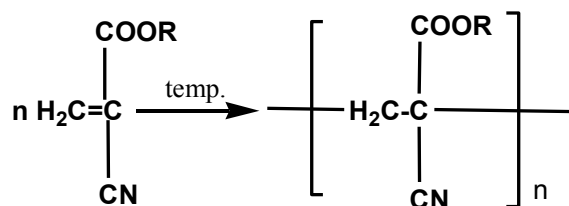
Odczynniki:

- cyjanoakryl
- etanol
- 0.2 g barwnika Basic Yellow 40

Sprzęt:

- krystalizator
- metalowy przedmiot o gładkiej powierzchni
- płyta grzejna

Podstawą metody jest fakt, iż estry kwasu cyjanoakrylowego polimeryzują na śladach linii papilarnych w postaci trwałego białoszarego osadu. Proces polimeryzacji katalizowany przez wodę i składniki wydzielin łożowych przebiega następująco:



Uwaga! Wszystkie czynności należy wykonywać pod wyciągiem! Cyjanoakryl momentalnie skleja skórę!

Wykonanie:

Powierzchnię (np. metalową) przemyć etanolem w celu odtłuszczenia i pozostawić na niej kilka odcisków palców. W parownicze umieścić metalowy przedmiot z odciskami palców i włożyć do krystalizatora wypełnionego wodą do 1/3 objętości. Następnie niewielką ilość kleju cyjanoakrylowego umieścić w małej zlewce lub fiolce i postawić w krystalizatorze. Całość przykryć folią aluminiową i podgrzać do temperatury 40-60 °C za pomocą płytki grzejnej. Odciski palców zostają uwidocznione w postaci białoszarych linii papilarnych. Cyjanoakryl polimeryzuje w obecności wody, a jej duża zawartość w śladach daktyloskopijnych sprzyja reakcji polimeryzacji.

Przygotowanie roztworu barwnika Basic Yellow 40: rozpuścić 0,2 g barwnika w 100 mL metanolu i przelać do spryskiwacza. W celu lepszego uwidocznienia uzyskanego wizerunku linii papilarnych należy rozpylić metanolowy roztwór barwnika Basic Yellow 40 na metalowej powierzchni z odciskiem, umieścić pod lampą UV i zaobserwować żółte ślady.

Opracowanie:

Beata Jasiewicz, Iwona Kowalczyk, Joanna Kurek, Arleta Sierakowska, Rafał Wawrzyniak

9.1.5. UJAWNIANIE ŚLADÓW LINII PAPILARNYCH ROZTWOREM BAZUJĄCYM NA REAKCJI RED-OX

Odczynniki:

- 25 g kwasu maleinowego/L roztworu
- 10g AgNO₃
- 80g (NH₄)₂Fe(SO₄)₂·6H₂O (sól Mosha)
- 30g Fe(NO₃)₃
- 20g kwas cytrynowy
- 0.23 g octan *n*-dodecyloaminy (detergent kationowy)
- podchloryn sodu NaClO

Sprzęt:

- butelki/ duże zlewki
- szklane/ plastikowe pojemniki do wywoływania
- butla z ciemnego szkła poj. 0,5 L lub 1 L
- plastikowe szczypce
- papierowy dokument z niewidocznymi śladami linii papilarnych
- wytrząsarka

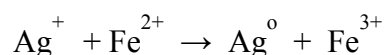
Prezentowana technika ujawniania śladów linii papilarnych polega na oddziaływaniu pomiędzy tłuszczami i wyższymi kwasami karboksylowymi zawartymi w substancji potowłuszczowej ze srebrem koloidalnym wydzielanym *in situ* w reakcji bazującej na reakcji redox. W wyniku tego oddziaływania następuje wizualizacja/zobrazowanie pozostawionych na danej powierzchni śladów linii papilarnych w postaci charakterystycznych odcisków o ciemnoszarej lub czarnej barwie.

Aby uzyskać zadowalające wyniki za pomocą tej techniki na podłożach papierowych warto zastosować ich przemycie wstępne z użyciem roztworu kwasu maleinowego. 25g kwasu maleinowego rozpuścić w 1 L wody destylowanej i umieścić w szklanym lub plastikowym naczyniu na 5-10 minut, na tak długo, aż przestaną się wytwarzać pęcherzyki powietrza. Po tym czasie wyjąć z pomocą plastikowych szczypiec i umieścić w roztworze wywołującym, wcześniej przygotowanym według podanego opisu.

Mieszanina do ujawniania śladów linii papilarnych za pomocą reakcji redox składa się z następujących roztworów:

- A.** Wodny roztwór azotanu(V) srebra
- B.** Roztwór jonów żelaza(II) i żelaza(III) tworzący sprzężoną parę jonów wywołujących proces redukcji
- C.** Bufor kwasowy, kwas cytrynowy
- D.** Detergent kationowy, octan *n*-dodecyloaminy

Jony żelaza(II) redukują jony srebra(I), a jednocześnie same utleniają się do jonów żelaza(III)



CHEMIA SĄDOWA

Reakcja ta jest odwracalna, gdyż jony żelaza(III) ponownie utlenią metaliczne srebro do jonów srebra(I). Aby temu zapobiec do mieszaniny ujawniającej ślady linii papilarnych dodaje się kwasu cytrynowego $\text{HOOC-CH}_2\text{-C(OH)(COOH)-CH}_2\text{-COOH}$. Kwas cytrynowy kompleksuje jony żelaza(III), przez co jakby usuwa je z mieszaniny, co dalej powoduje prawidłowe zajście reakcji redox. Poza tym kwas cytrynowy obniża pH całego roztworu, co jest istotne, gdyż najlepsze efekty uzyskuje w roztworze o delikatnie kwaśnym odczynie.

Wydzielone w reakcji redox srebro ma formę koloidalną i w takiej formie dobrze oddziałuje z wyższymi kwasami karboksylowymi i tłuszczami, które są składnikami (pozostawionych na przedmiotach) śladów linii papilarnych, powodując ich ujawnienie. Aby zapobiec ewentualnemu wydzieleniu się srebra w postaci osadu dodaje się kationowego detergentu: octanu *n*-dodecyloaminy $[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_2\text{NH}_3]^+ [\text{CH}_3\text{COO}]^-$. To działanie powoduje wytworzenie oddziaływania srebro-detergent, co w uproszczeniu można zapisać jako: $\{\text{Ag}[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_2\text{NH}_3]^+\} \sim \{\text{Ag} [\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_2\text{NH}_3]^+\}$, to zjawisko określono mianem peptyzacji.

W celu ujawnienia śladów linii papilarnych należy sporządzić **3 roztwory: A, B i C**, a następnie przygotowuje się z nich roztwór wywołujący. Aby roztwór wywołujący był odpowiednio aktywny, nie należy go zbyt długo przechowywać, wobec czego do danego ćwiczenia zastosować ilości pięciokrotnie pomniejszone względem podanych niżej wynikających z oryginalnej receptury.

Do wykonania analizy należy użyć pięciokrotnie mniej poszczególnych odczynników.

Roztwór A: 0.23 g octan *n*-dodecyloaminy należy rozpuścić w 40mL wody destylowanej.

Roztwór B: Do 900 mL wody destylowanej należy dodawać kolejno porcjami odważone odczynniki: 30g azotanu(V) żelaza(III), 80g soli Mosha (siarczan(VI) amonu- żelaza(II)) oraz 20g kwasu cytrynowego.

Roztwór C: 10g azotanu srebra należy rozpuścić w 50 mL wody destylowanej. Taki roztwór należy przechowywać w butelce z ciemnego szkła i najlepiej w ciemnym miejscu (w szafie).

Wszystkie te roztwory zachowują swoje właściwości przez pół roku, potem ich działanie ulega osłabieniu.

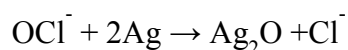
Roztwór wywołujący

Poprzez odpowiednie zmieszanie **roztworów A, B i C** otrzymuje się roztwór wywołujący. Do dużego naczynia/butli z ciemnego szkła o poj. 0,5L lub 1L przelać **roztwór B** i dodać do

nego **roztwór A** i mieszać przez 2 minuty. Następnie dodaje się **roztwór C** ciągle mieszając przez kolejne 2 minuty.

Tak uszykowany roztwór wywołujący należy umieścić w szklanym lub plastikowym pojemniku i ustawić na wytrząsarce lub też wytrząsać ręcznie poprzez delikatne przesuwanie pojemnika prawo-lewo, co powoduje przemieszczanie się przedmiotu znajdującego się w roztworze wywołującym. W celu dobrego uwidocznienia element papierowy można pozostawić w tym roztworze pół godziny nawet do 1 tygodnia.

Potem należy element papierowy wyjąć za pomocą plastikowych szczyptic i przemyć w końcowym roztworze 3% podchlorynu sodu. Przemycie to ma na celu utrwalenie uwidocznionych śladów linii papilarnych, gdyż zachodzi reakcja utlenienia elementarnego srebra według schematu:



Ponadto podchloryn sodu ma właściwości wybielające przez co kartka papieru ulega rozjaśnieniu, a to daje lepszy kontrast pomiędzy śladem a tłem. Na koniec element papierowy można jeszcze przemyć w wodzie destylowanej. Następnie element papierowy wyjąć i wysuszyć.

9.1.6. UJAWNIANIE ŚLADÓW KRWAWYCH ZA POMOCĄ LUMINOLU I BARWNIKA AMIDO BLACK

Odczynniki:

- 5 g węglanu sodu
- 0,5 g luminolu
- 15 mL perhydrołu
- krew np. drobiowa
- przecier pomidorowy, ketchup,
- soki owocowe (np. czarna porzeczka, wiśnia)
- soki warzywne (np. z buraków)
- 0.2 g barwnika Amido Black
- 10 mL lodowatego kwasu octowego
- 90 mL metanolu

Sprzęt:

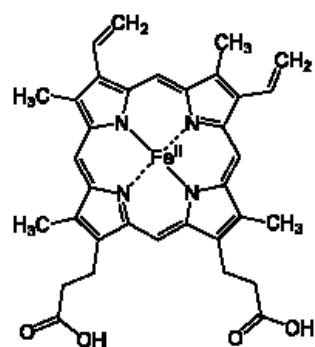
- zlewki 100 mL, 250 mL
- cylinder miarowy
- kawałki tkaniny bawełnianej
- spryskiwacz

Za pomocą tej metody można wykryć nawet małe plamki krwi niewidoczne gołym okiem. Metoda ta może być stosowana zarówno do starych jak i świeżych śladów krwawych. W wyniku reakcji 30% nadtlenku wodoru z luminolem w środowisku zasadowym dochodzi do utlenienia luminolu, co zostało przedstawione na schemacie obrazującym reakcję luminolu z

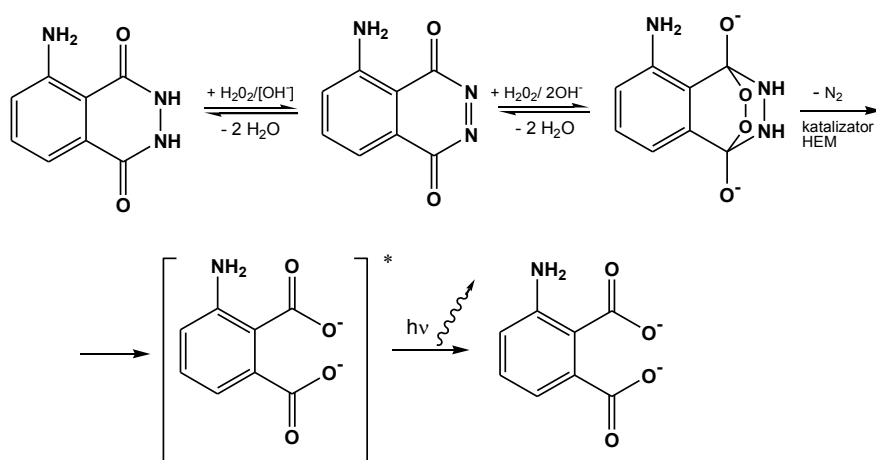
plamami krwawymi. W tej reakcji katalizatorem jest hem pochodzący z krwi. W wyniku reakcji powstaje sól kwasu aminoftalowego, która emituje energię w postaci światła.

Amido Black to barwnik proteinowy, czuły na składniki krwi. Stosować go można do ujawnienia lub wzmacniania śladów naniesionych krwią na powierzchniach porowatych i gładkich. Niewidoczne ślady linii papilarnych można ujawniać na tworzywach sztucznych, drewnie lakierowanym oraz powierzchniach papierowych.

Roztwór odczynnika Amido Black (AB) przygotować przez zmieszanie 2 g (AB) z 100 mL lodowatego kwasu octowego i 900 mL metanolu. Jednorazowo przygotować 100 mL roztworu odczynnika.



hem



Schemat reakcji luminolu z nadtlenkiem wodoru w środowisku zasadowym w obecności hemu

Wykonanie:

Przygotowanie roztworu luminolu (zlewka o pojemności 250 mL): rozpuścić 5 g węgla sodu i 0.5 g luminolu w 100 mL wody destylowanej; do całości dodać 15 mL perhydrolu.

Kilka dni wcześniej należy nanieść na tkaninę bawełnianą (! ważne, aby tkanina nie była wcześniej prana z zastosowaniem wybielaczy optycznych, gdyż ich składniki powodują

świecenie w świetle lampy UV całej jej powierzchni) krople krwi oraz przecier pomidorowy, ketchup, sok owocowy. Zbadać można także świeżo naniesione na bawełnianą tkaninę plamy krwi oraz przecieru pomidorowego czy ciemnego soku owocowego lub warzywnego (np. z buraków). Wcześniej przygotowane kawałki tkaniny z plamami umieścić w ciemnym miejscu i spryskać przygotowanym roztworem, w razie potrzeby spryskać powtórnie. Plamy obejrzyć w świetle lampy UV. Krwawe plamy (stare) pod wpływem odczynnika przez pewien czas świecą, co jest jeszcze lepiej widoczne w świetle lampy UV. W przypadku świeżych plam krwawych pod wpływem odczynnika obserwujemy pienienie się na powierzchni tkaniny (kataliza rozkładu nadtlenu wodoru).

9.1.7. UJAWNIANIE ŚLADÓW KRWAWYCH ZA POMOCĄ LEUKOFLUORESCEINY I H_2O_2

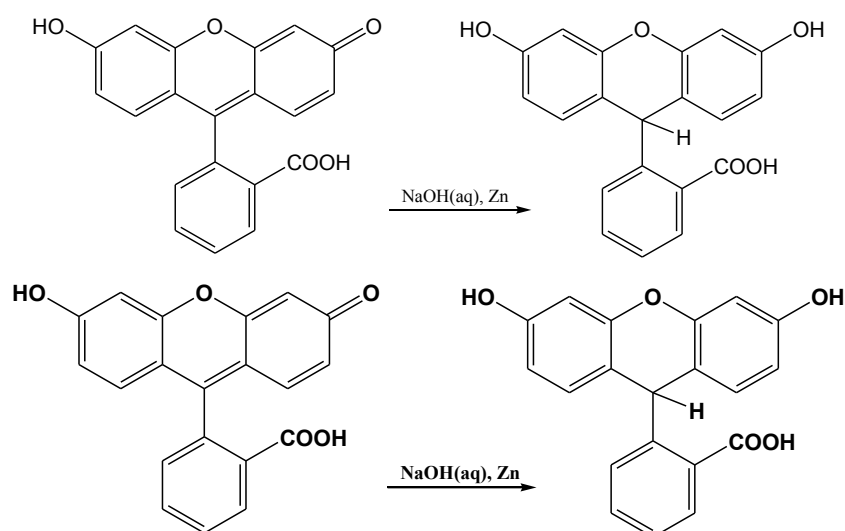
Odczynniki:

- 0,1 g fluoresceiny
- 2 g pyłu cynkowego
- 1 g wodorotlenku sodu
- woda destylowana
- 3% nadtlenek wodoru
- wyschnięte ślady krwawe pozostawione na tkaninie lub bibule

Sprzęt:

- zlewka 200 mL
- mieszadło magnetyczne
- bagietka
- dwa spryskiwacze

Fluoresceina w silnie zasadowym środowisku bardzo silnie fluoryzuje pod wpływem światła UV.



Reakcja redukcji fluoresceiny do leukofluoresceiny

CHEMIA SĄDOWA

W doświadczeniu należy sprawdzić działanie roztworu leukofluoresceiny i nadtlenu wodoru na ślad krwawy. Najpierw należy przygotować roztwór leukofluoresceiny działając na fluoresceinę roztworem wodorotlenku sodu i pyłem cynkowym.

Wykonanie:

Przygotowanie roztworu leukofluoresceiny:

0.1g Fluoresceiny i 1g wodorotlenku sodu należy rozpuścić w 25 mL wody destylowanej i następnie dodać 2 g pyłu cynkowego. Tak powstała mieszanina odznacza się bardzo ciemnoczerwoną, wręcz czarną barwą. W celu zupełnego przereagowania mieszaninę należy mieszać ok. 1 godzinę na mieszadle magnetycznym. Po przereagowaniu roztwór staje się klarowny i barwy żółtej. Jeśli zmiana nie nastąpi, to należy mieszaninę ogrzać do 60°C. Fluoresceina redukuje się pod wpływem cynku do leukofluoresceiny (fluorescyny), a zmiana ta połączona jest ze zmianą zabarwienia tych związków. Tak przygotowany roztwór można długo przechowywać jednak szczelnie zamknięty korkiem lub w butelce z gwintem, aby nie było dostępu tlenu z powietrza.

Przygotowanie roztworu A (rozcieńczona leukofluoresceina): Należy pobrać 1 mL wcześniej przygotowanego roztworu leukofluoresceiny i dodać do 24 mL wody destylowanej i następnie przelać do rozpylacza.

Roztwór B, to 3% wodny roztwór H₂O₂, który należy też przelać do drugiego rozpylacza.

Wyschnięty ślad krwawy w świetle dziennym ma barwę brązową, umieszczony pod lampą UV nie wykazuje żadnych zmian, natomiast po obfitym spryskaniu **roztworem A** oraz nieco **roztworem B** naświetlając lampą UV można zaobserwować wokół plamy intensywne żółtozielone świecenie. Zjawisko to wynika z faktu, że sama leukofluoresceina nie wykazuje świecenia w tych warunkach, jednak pod wpływem nadtlenu wodoru i w obecności hemu ulega utlenieniu do fluoresceiny. Jednak należy pamiętać, że najlepsze efekty uzyskuje się dla plam krwawych cieńszych, te zbyt grube nie dają tak efektownego świecenia, wtedy jest ono widoczne jedynie na brzegach plamy krwawej.

9.2. ANALIZA ODCISKÓW USZU

9.2.1. UJAWNIANIE ODCISKÓW USZU ZA POMOCĄ PROSZKÓW DAKTYLOSKOPIJNYCH

Odczynniki:

- metanol
- aceton
- proszek grafitowy
- sproszkowany tlenek żelaza(III)
- węgiel drzewny

Sprzęt:

- delikatne pędzle
- szalki Petriego
- płytki szklane 15 x 15 cm
- szeroka taśma przyklepna
- biały papier

Wykonanie:

Płytkę szklaną należy dokładnie przetrzeć acetonem i metanolem w celu usunięcia wszelkich zabrudzeń. Następnie położyć na dłoni i dokładnie docisnąć do ucha osoby, od której pobierany jest odcisk do analizy. Odciski można pobierać od osób z biżuterią na uszach lub bez niej. Optymalny ciągły docisk szklanej płytki należy prowadzić od góry do dołu małżowiny usznej. Odciski można pobierać z prawego i lewego ucha. Następnie szklaną powierzchnię należy delikatnie opylić proszkiem (jednym z podanych) i równie delikatnie pobrać odcisk za pomocą taśmy. Tak uzyskany odcisk przykleić do gładkiej kartki papieru. Na podstawie uzyskanego odcisku określić kształt małżowiny usznej i podać możliwie dużo informacji o jej budowie.

9.2.2. UJAWNIANIE ODCISKÓW USZU ZA POMOCĄ NINHYDRYNY

Odczynniki:

- 1 mg ninhydryny
- 100 mL acetonu
- 1 mL kwasu octowego
- 3 mL odczynnik Photo Flo
- 0.3 g czarny proszek SPR

Sprzęt:

- płytki szklane 15 x 15 cm
- papier (80GSM lub o gramaturze 100)
- zraszacz
- szeroka taśma przyklepna
- zlewki

Wykonanie:

W celu ujawnienia odcisku małżowiny usznej z zastosowaniem roztworu ninhydryny, na płytce szklanej należy umieścić kartkę papieru (80GSM lub o gramaturze 100). Płytkę położyć na dłoni i dokładnie docisnąć do ucha osoby, od której pobierany jest odcisk do

analizy. Optymalny ciągły docisk szklanej płytki należy prowadzić od góry do dołu małżowiny usznej.

Przygotowywanie roztworu ninhydryny: 1mg ninhydryny rozpuścić w 100 mL acetonu, dodać 1 mL kwasu octowego mieszając do uzyskania klarownego roztworu. Przenieść do rozpylacza. Tak przygotowanym roztworem spryskać ślady pozostawione na kartce papieru. Po minucie kartkę włożyć do suszarki o temperaturze 60-80°C na 5-10 minut.

Analizowaną kartkę papieru po ujawnieniu odcisku można zabezpieczyć taśmą i przykleić do arkusza papieru.

W celu polepszenia obrazu uzyskanego odcisku należy zastosować proszek SPR z dodatkiem odczynnika Photo Flo i obserwować w świetle lampy UV. Ujawnione ślady potowotłuszczowe barwią się na grafitowy kolor. Gdy ślad jest jeszcze mokry należy go najpierw sfotografować.

Roztwór roboczy **Proszku SPR** przygotować przez wymieszanie proszku w wodzie z dodatkiem odczynnika Photo-Flo. Roztwór roboczy wlać do pustej butelki ze spryskiwaczem i rozpylić na badanej powierzchni. 30 g proszku SPR wystarcza na 1 litr wody. Jednorazowo przygotować 10 mL roztworu roboczego (0,3 g SPR, 3 mL odczynnika Phot Flo).

Na podstawie uzyskanego odcisku określić kształt małżowiny usznej i podać możliwie dużo informacji o jej budowie.

9.2.3. UJAWNIANIE ODCISKÓW USZU ZA POMOCĄ PAR JODU

Odczynniki:

- jod elementarny
- aceton
- metanol

Sprzęt:

- słoik z nakrętką
- szczypce (pinceta)
- płytki szklana 15 x 15 cm
- papier (80GSM lub o gramaturze 100)
- szeroka taśma przylepna
- biały papier

Wykonanie:

W celu ujawnienia odcisku małżowiny usznej z zastosowaniem par jodu, na płytce szklanej należy umieścić kartkę papieru (80GSM lub o gramaturze 100). Następnie płytkę położyć na dłoni i dokładnie docisnąć do ucha osoby, od której pobierany jest odcisk do analizy. Optymalny ciągły docisk szklanej płytki należy prowadzić od góry do dołu małżowiny usznej.

Kartkę papieru z pobranym odciskiem należy umieścić w komorze z jodem i odczekać kilka minut. Wyjąć szczypcami kartkę papieru i po ujawnieniu odcisku można zabezpieczyć taśmą i przykleić do arkusza papieru. Na podstawie uzyskanego odcisku określić kształt maźłowiny usznej i podać możliwie dużo informacji o jej budowie.



9.3. UJAWNIANIE ŚLADÓW STÓP, BUTÓW ORAZ OPON SAMOCHODOWYCH ZA POMOCĄ ODLEWÓW GIPSOWYCH

Odczynniki:

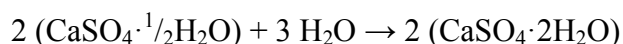
- $\text{CaSO}_4 \cdot \frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}$ gips budowlany (nie szpachlowy)
- ziemia np. podłoże kwiatowe
- lakier do włosów

Sprzęt:

- miska lub pojemnik do przygotowania masy gipsowej
- pojemnik np. blacha do pieczenia ciasta do wykonania odcisku
- szczotka

Często na miejscu zdarzenia znajduje się nie tylko odciski palców, ale także odciski butów, stóp czy ślady opon samochodowych. Tego rodzaju ślady ujawnianie są na podłożu piaszczystym bądź ziemistym. W celu porównania odcisku znalezionej na miejscu zdarzenia z obuwem zarekwirowanym od podejrzanych należy wykonać odlew ujawnionego śladu. Znaleziony ślad należy oczyścić z kamieni, liści bądź innych przedmiotów przed wylaniem masy gipsowej. W przypadku, gdy w zagłębieniach śladu znajduje się woda powinna ona zostać usunięta za pomocą pipetki lub bibuły. Masa gipsowa po zastygnięciu odwzorowuje dokładnie kształt stopy, ślad podeszwy buta lub opony samochodowej.

Zastyganie (twardnienie) masy gipsowej zachodzi według równania:



Wykonanie:

Pojemnik wypełnić wilgotną ziemią i wyrównać jej powierzchnię. Wykonać odcisk stopy lub buta i następnie w celu utrwalenia spryskać lakierem. W drugim pojemniku rozrobić masę gipsową dodając wodę w sposób zalecany przez producenta gipsu, szybko i dobrze wymieszać. W miejscu gdzie ślad jest najgłębszy rozpocząć wlewanie przygotowanej masy gipsowej. Należy wlać w zagłębienie śladu odpowiednio grubą warstwę masy gipsowej, aby zapobiec jej pękaniu przy podnoszeniu. Następnie odczekać do całkowitego stwardnienia masy. Uwaga!!! Zestalony odcisk gipsowy bardzo delikatnie wyjąć z ziemi i usunąć jej nadmiar za pomocą szczoteczki, spłukać wodą i pozostawić do wyschnięcia.

9.4. UJAWNIANIE USUNIĘTYCH NUMERÓW I OZNACZEŃ Z KLUCZA

Odczynniki:

- 10 mL stężonego kwasu solnego
- 1 g bezwodnego chlorku żelaza(III)

Sprzęt:

- klucz lub przedmiot metalowy
- szalka Petriego
- zlewka 100 mL
- pilnik metalowy np. mosiężny
- papier ścierny gruboziarnisty
- łopatka
- szczypce
- cylinder miarowy 50 mL

W celu ujawnienia usuniętych przez sprawców (najczęściej nożem lub pilnikiem) numerów, oznaczeń czy kodów z przedmiotów metalowych (klucze, części samochodowe, broń palna oraz inne) użytych podczas przestępstwa bądź skradzionych stosuje się metodę metalograficznego wytrawiania (kontrastowania). Za pomocą odpowiednio dobranych odczynników możliwe jest ujawnienie na przedmiotach metalowych wcześniej wygrawerowanych oznaczeń. W miejscu, w którym grawerowano oznaczenie, jednolita struktura metalu zostaje zaburzona. Dzięki temu proces utlenienia zachodzi szybciej niż w pozostałych nieuszkodzonych fragmentach.

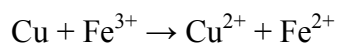
Wykonanie:

Za pomocą papieru ściernego wygładzić powierzchnię klucza lub innego metalowego przedmiotu (niemagnetycznego), z którego usunięto wygrawerowane oznaczenie.

Następnie przygotować roztwór 1 g chlorku żelaza(III) w 10 mL stężonego kwasu solnego.

Uwaga! Wszystkie czynności w ćwiczeniu należy wykonywać pod dygestorium i sprawnie działającym wyciągiem!

Przygotowany klucz (lub inny płaski metalowy element) umieścić w szalce Petriego i wlać przygotowany roztwór. Pozostawić na 10-15 minut. Wyjąć analizowany przedmiot z roztworu, spłukać wodą i osuszyć bibułą. W przypadku, gdy oznaczenie się nie pojawiło, należy procedurę powtórzyć nawet kilkakrotnie. Po właściwie przeprowadzonym procesie usunięte symbole, które nie były widoczne gołym okiem, pojawiają się w postaci szarobrunatnego kontrastu w porównaniu z barwą klucza bądź metalowego przedmiotu. Zabarwienie związane jest z naruszeniem jednolitej struktury metalu w wyniku grawerowania oraz faktem, iż klucze najczęściej wykonane są ze stopu metali zawierających w swoim składzie miedź. W trakcie kontaktu metalowego klucza z roztworem chlorku żelaza(III) w kwasie solnym zachodzi reakcja pomiędzy miedzią i jonami żelaza(III) według schematu:



ĆWICZENIE 10

ANALIZA MATERIAŁÓW DOWODOWYCH NA OBECNOŚĆ NARKOTYKÓW

Najczęściej występujące substancje zawarte w zabezpieczonych materiałach dowodowych to: siarczan amfetaminy, chlorowodorek amfetaminy, 3,4-metylenodioksymetamfetamina (MDMA, Ecstasy) oraz Δ^9 -tetrahydrokanabinol (Δ^9 -THC). Do wstępnego sprawdzenia czy dana próbka zawiera substancje odurzające stosuje się zestawy komercyjnie dostępnych testów - odczynników do wykrywania narkotyków NARKO-1 (w warunkach laboratoryjnych), NARKO-2 (w warunkach polowych, na miejscu zdarzenia) czy testy NIK. Poza wymienionymi testami w pracy laboratoryjnej stosuje się analizę TLC oznaczanych składników. W celu analizy aktywnego związku chemicznego w postaci "handlowej" pochodzącego z nielegalnej dystrybucji w pierwszym etapie należy go wyizolować. Odpowiednio poprowadzona izolacja związku psychoaktywnego (w formie proszku czy tabletki) pozwala na otrzymane go w postaci krystalicznej, a w tym stanie możliwa jest identyfikacja za pomocą typowych metod fizykochemicznych. Najczęściej z dowodowych substancji sporządza się ekstrakty alkoholowe, które następnie sączy się, zagęszcza i poddaje badaniom. Wyniki badań właściwości fizyko-chemicznych materiału dowodowego są bardzo istotne przy wydawaniu opinii i stanowią przedmiot interpretacji toksykologiczno-sądowej. Poniżej przedstawiono najpopularniejsze fazy rozwijające stosowane w analizie TLC związków psychoaktywnych:

Ekstrakty z amfetaminy i jej pochodnych:

metanol : octan etylu : amoniak 25% (10 : 85 : 5) - chromatogram po wysuszeniu wywołuje się odczynnikiem Fast Black K Salt

toluen : aceton : etanol : 25 % roztwór amoniaku (54.5 : 45.5 : 6.5 : 2.5) lub

aceton : metanol (4 : 6) - chromatogram widoczny:

- w świetle lampy kwarcowej z filtrem 366 nm
- pod wpływem roztworu 0.05% fluorescaminy w acetonie w świetle lampy kwarcowej z filtrem 254 nm
- pod wpływem 10% ninhydryny w EtOH, ogrzewany przez 10 minut w temp. 100 C.

Opiaty, kanabinoły oraz pochodne amfetaminy:

układy rozwijające stosowane kolejno:

I - eter naftowy : eter dietylowy (9:1)

II - aceton : eter naftowy : eter dietylowy (1 : 8 :1)

III - dichlorometan : izopropanol : 25% roztwór amoniaku (98 : 2 : 1.5)

IV - dichlorometan : izopropanol : 25 % roztwór amoniaku (88 : 12 : 1.5)

chromatogram widoczny w świetle UV.

**10.1. ANALIZA MATERIAŁÓW DOWODOWYCH NA OBECNOŚĆ
AMFETAMINY I JEJ POCHODNYCH**

10.1.1. ANALIZA PROSZKU NA OBECNOŚĆ AMFETAMINY

Odczynniki:

- 6 M wodny roztwór NaOH
- papierki wskaźnikowe
- chlorek metylenu
- bezwodny siarczan(VI) magnezu
- metanol
- odczynnik Marquisa
- BaCl₂

Sprzęt:

- zlewki
- rozdzielacz
- kolbka okrągło denna
- pipeta Pasteura

Wykonanie:

Zważyć otrzymaną porcję materiału, zbadać temperaturę topnienia. Proszek należy rozpuścić w wodzie i następnie za pomocą 6 M wodnego roztworu wodorotlenku sodu zalkalizować do pH=13. Tak otrzymany roztwór ekstrahować za pomocą chlorku metylenu (4 x 50mL). Ekstrakty połączyć i suszyć nad bezwodnym MgSO₄. Przesączyć i zagęścić pod zmniejszonym ciśnieniem, zważyć. Pozostałość należy rozpuścić w możliwie małej ilości metanolu. Następnie, aby wydzielić w postaci krystalicznej, dodaje się porcjami (kroplami) do wcześniej otrzymanej pozostałości stężony 96% kwas siarkowy(VI). Otrzymuje się biały osad, który należy zdekantować, przemyć i wysuszyć (podać analizie elementarnej). Oznaczyć temperaturę topnienia. Porównać z temperaturą topnienia siarczanu amfetaminy (lit. 238 °C z rozkładem).

Możliwe jest także dokonanie ilościowego oznaczenia zawartości siarczanu amfetaminy w materiale dowodowym. Jedną ze stosowanych metod jest metoda spektrofotometryczna.

Reakcja charakterystyczna dla pochodnych amfetaminy

Badany materiał w postaci proszków umieszcza się w porcelanowych płytkach. Nanosi się po 3 krople odczynnika Marquisa (odczynnik, który daje charakterystyczne zabarwienie w obecności amin drugorzędowych). Po kilku sekundach, jeśli obecne są pochodne amfetaminy, można zaobserwować charakterystyczne ciemnobrunatne zabarwienie. Odczynnik Marquisa jest komercyjnie dostępnym odczynnikiem chemicznym składającą się z 96% kwasu siarkowego i formaliny albo 96% kwasu siarkowego i etanolu. Może również zawierać metanol, jednak wtedy reakcja przebiega wolniej.

Reakcja na obecność siarczanu amfetaminy

Rozpuszczamy substancje badaną w ok. 4 ml wody destylowanej (próbówki). Połowę objętości wlewamy do drugiej próbówki. Do jednej z nich dodajemy kilka kropli BaCl_2 i obserwujemy (najlepiej pod światło) czy pojawiło się zmętnienie. Jeśli zaobserwowaliśmy zmętnienie, wytrącił się siarczan baru, a badana substancja to siarczan amfetaminy.

10.1.2. ANALIZA JAKOŚCIOWA PROSZKU NA OBECNOŚĆ AMFETAMINY (TLC)

Wykonanie:

Na płytkę nanieść punktowo etanolowe roztwory badanych związków. Rozdział przeprowadzić na płytkach Kiesselgel 60F 254 firmy Merck stosując jako fazę ruchomą mieszaninę rozpuszczalników: octan etylu : metanol : amoniak (v/v 8.5 : 1 : 0.5).

Po wyjęciu i osuszeniu chromatogramu dokonać identyfikacji badanych związków w świetle lampy UV przy długości fali 254 nm.

Wartości R_f:

siarczan amfetaminy - 64

chlorowodorek metamfetaminy - 58

chlorowodorek 3,4-dimetylenodioksymetamfetaminy - 60

efedryna - 43

paracetamol – 74 kofeina – 77

10.1.3. ANALIZA TABLETEK NA OBECNOŚĆ POCHODNYCH AMFETAMINY

Otrzymane do analizy tabletki należy rozkruszyć i zalać mieszaniną eteru dietylowego i propan-2-olu. Następnie tak uzyskany roztwór ogrzewać na łaźni wodnej. Masę tabletkowa przesącza się, pozostawia do krystalizacji. Oznacza się temperaturę topnienia. Porównać z temperaturą topnienia chlorowodoru 3,4-metylenodioksymetamfetaminy (lit. 150-151 °C).

10.2. ANALIZA MATERIAŁÓW DOWODOWYCH NA OBECNOŚĆ Δ^9 -TETRAHYDROKANABINOLU (Δ^9 -THC) - TLC

Wykonanie:

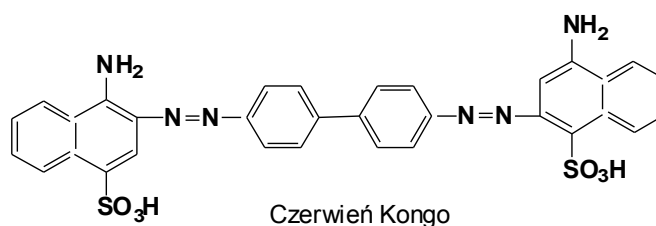
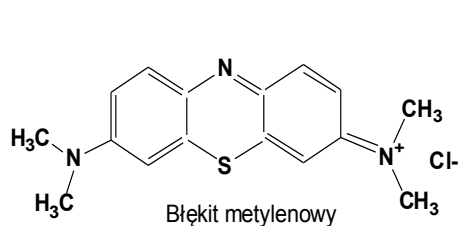
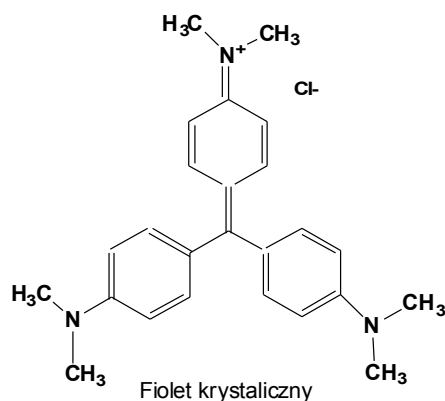
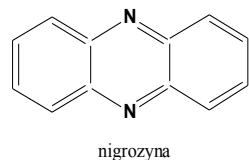
Na płytkę nanieść punktowo n-heksanowe roztwory badanych związków. Rozdział przeprowadzić na płytkach Kiesselgel 60F 254 firmy Merck stosując jako fazę ruchomą mieszaninę rozpuszczalników: n-heksan : eter dietylowy. Po wyjęciu i osuszeniu chromatogramu dokonać identyfikacji badanych związków w świetle lampy UV przy długości fali 254 nm.

ĆWICZENIE 11

BADANIA IDENTYFIKACYJNO-PORÓWNAWCZE MATERIAŁÓW KRYJĄCYCH NA DOKUMENCIE (ANALIZA ŻELI DŁUGOPISOWYCH)

Podczas ekspertyzy dokumentów w celu ustalenia ich autentyczności, poprzez badania fizykochemiczne identyfikuje się zarówno materiał kryjący (materiał, którym wykonano dokument) jak i podłoże dokumentu. Obecnie materiałami kryjącymi są atramenty, pasty długopisowe i tonery. Tego typu badania są badaniami porównawczymi. Aby określić przynależność grupową materiału kryjącego analizuje się jego barwę, rozpuszczalność, obraz chromatograficzny i spektralny (widma IR, UV oraz luminescencja). Szczególnie szeroko stosowane są metody chromatografii cienkowarstwowej i wysokosprawnej chromatografii cieczowej. Techniki te wymagają wstępnego przygotowania badanej próbki, tj. najczęściej ekstrakcji badanego materiału kryjącego z podłoża (papieru). Porównanie zestawu barwników w dwóch atramentach czy pastach można również przeprowadzić stosunkowo szybko metodą chromatografii cienkowarstwowej, biorąc pod uwagę liczbę, barwę i położenie plamek otrzymanych na płytce chromatograficznej. Metoda ta wymaga niewielkiej ilości materiału do badań. Innym bardzo często stosowanym sposobem identyfikacji jest porównywanie obrazów spektroskopowych badanych próbek z wzorcami w celu określenia ich składu i ewentualnych różnic, które mogłyby wskazywać na fałszerstwo. Do identyfikacji podstawowych składników materiałów kryjących, tj. żywic, barwników lub rozpuszczalników stosuje się zwykle metodę spektrometrii w podczerwieni i Ramana, porównując uzyskane dla próbek widma z widmami substancji wzorcowych.

Poniżej przedstawiono wzory kilku barwników: **Nigrozyna** – pierwszy czarny syntetyczny barwnik; **Fiolet krystaliczny** - barwnik triarylometanowy; **Błękit metylenowy** - barwnik tiazynowy; **Czerwień Kongo** - barwnik azowy.



Odczynniki:

- dwumetyloformamid
- chloroform
- octan etylu
- izopropanol
- kwas octowy

Sprzęt:

- zlewki
- nożyczki
- płytki TLC
- chłodnica zwrotna
- kolba okrągłodenna

Roztwór do ekstrakcji: dwumetyloformamid : chloroform (9 :1)

Układ rozwijający: octan etylu : izopropanol : woda : kwas octowy (30 : 25 : 10 : 1)

Wykonanie:

Przed przystąpieniem do analizy należy dokonać wstępnych oględzin dokumentu w świetle zwykłym padającym prostopadle i skośnie. Oględziny mają na celu stwierdzenie, czy występują różnice pomiędzy poszczególnymi fragmentami tekstu.

Następnie z zakreślonych wcześniej miejsc wyciąć fragmenty linii pisma o prostoliniowym przebiegu i długości ok. 2 cm. Wycięty fragment pisma należy zalać roztworem do ekstrakcji i termostatować w temperaturze 100 °C przez 10 minut. Po ostudzeniu część roztworu (przy użyciu strzykawki) nanieść na linię startową na płytce chromatograficznej, a pozostałą część na szalkę Petriego. Na płytkę TLC należy nanieść również wzorce, tj. materiał kryjący pochodzący z narzędzi pisarskich. W tym celu na płytkę chromatograficzną nanieść roztwór pasty pobranej z narzędzi pisarskich rozpuszczony w roztworze do ekstrakcji. Po naniesieniu

CHEMIA SĄDOWA

wszystkich próbek na linię startową wysuszyć płytkę TLC i umieścić ją w komorze chromatograficznej. Po wyjęciu i wysuszeniu na powietrzu, uzyskany obraz poddać analizie w świetle zwykłym i przy użyciu lampy UV.

Po odparowaniu eluentu z naniesionych na szalkę Petriego ekstraktów, ich suche pozostałości zważyć i poddać analizie IR (w KBr).

Analiza wyników:

- Porównać otrzymane obrazy chromatograficzne (liczba i barwa plamek oraz wartości R_f) w grupie materiałów wzorcowych i w grupie ekstraktów oraz porównać obraz uzyskany dla materiału wzorcowego i dla ekstraktu.
- Wyszukać obrazy podobne i różne
- Porównać otrzymane widma IR
- Wyciągnąć wnioski odnośnie do podobieństw (lub różnic) w składzie chemicznym badanych próbek i na tej podstawie wysunąć tezę o możliwości fałszerstwa dokumentu.

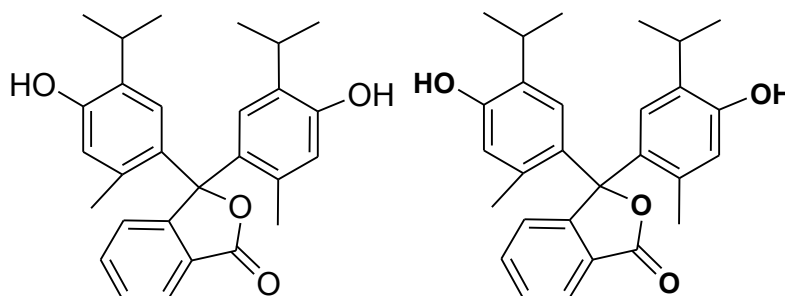
\

ĆWICZENIE 12

UJAWNIENIE TEKSTU NAKREŚLONEGO ATRAMENTEM
SYMPATYCZNYM

Jedną z metod oszustwa jest fałszowanie druków bankowych, podpisów z wykorzystaniem atramentu sympatycznego. Oszustwo to można wykryć przeprowadzając odpowiednią analizę dokumentu zgodnie z powszechnie obowiązującą procedurą wykorzystującą różnorodne techniki np. różne typy oświetlania dokumentu. Dobre efekty uzyskuje się badając dokumenty w świetle padającym ukośnie w zakresie światła ultrafioletowego przechodzącego do podczerwieni np. stosując światło komparatora.

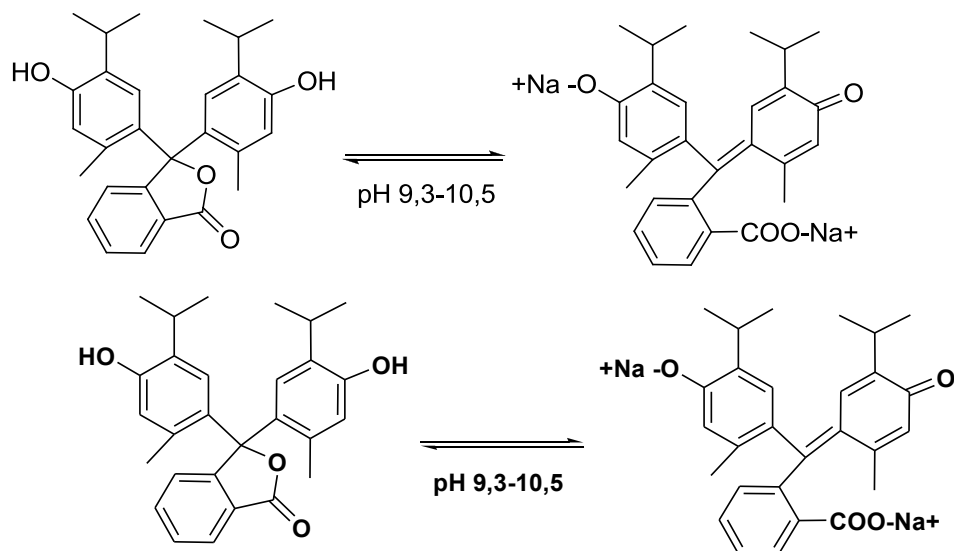
Obecnie dostępne znikające atramenty w swoim składzie zawierają wodę lub odpowiedni kwas zmieszany ze wskaźnikiem, a jego barwa zanika pod wpływem zmiany odczynu w wyniku reakcji z dwutlenkiem węgla z powietrza. Do najpopularniejszych wskaźników pH odznaczających się działaniem jak atrament sympatyczny należy tymoloftaleina - $C_{28}H_{30}O_4$ – białe ciało stałe (zmiana pH od 9,3 do 10,5) powyżej pH 10,5 roztwór przybiera intensywną niebieską barwę.



W celu przygotowania odpowiedniego roztworu należy rozpuścić tymoloftaleinę (2',2''-dimetylo-5,5,-di-isopropylofenoloftaleinę) w etanolu, dodać wodę, a następnie doprowadzić otrzymany roztwór do odpowiedniego odczynu przez wprowadzanie wodorotlenku sodu do momentu pojawienia się ciemnoniebieskiego koloru (barwa charakterystyczna dla formy zasadowej wskaźnika). Otrzymany znikający atrament jest w stanie przereagować z CO_2 (zobojętnić wodorotlenek sodu) zmieniając swoje pH staje się niewidoczny. Efekt może następować już nawet po 5 minutach albo po kilku dniach, uzależnione jest to od zawartości dwutlenku węgla w powietrzu, stężenia wskaźnika, temperatury i wilgotność otoczenia jak też sposób obchodzenia się z dokumentem.

CHEMIA SĄDOWA

Zachodzą dwie reakcje chemiczne : $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{H}_2\text{CO}_3$ i $2\text{NaOH} + \text{H}_2\text{CO}_3 \rightarrow \text{Na}_2\text{CO}_3 + 2\text{H}_2\text{O}$, których konsekwencją jest wyblaknięcie zapisu, a także wskaźnik z formy cząsteczkowej przechodzi w formę jonową.



Odczynniki:

- tymoloftaleina
- woda
- etanol
- wodorotlenek sodu roztwór 0.2M

Sprzęt:

- lampa UV
- długopis/pióro z tymoloftaleiną
- druki włpat
- zwykły długopis
- kartki papieru
- wypełnione druki włpat bankowych

Wykonanie:

Przygotowanie atramentu sympatycznego: Odważyć 0.1g tymoflaleiny, przenieść do zlewki i rozpuścić stosując odpowiednią ilość etanolu, następnie dodać wody i wodnego roztworu wodorotlenku sodu, aż do uzyskania ciemnoniebieskiej barwy roztworu. Tak otrzymany barwnik przelać do fiolki z ciemnego szkła oraz napełnić nim odpowiedni długopis/pióro.

Otrzymane druki włpat należy starannie obejrzeć w świetle lampy UV prostopadle i skośnie względem kartki papieru. Należy stwierdzić bądź wykluczyć zafałszowanie dokumentu. W przypadku stwierdzenia, że dokonano zafałszowania odczytać i zapisać we wnioskach zaobserwowane pismo.

Wziąć czystą kartkę papieru i za pomocą długopisu ze znikającym atramentem umieścić na niej kilka dowolnych słów i obserwować po jakim czasie nastąpi zanikanie tekstu.

CHEMIA SĄDOWA

Eksperyment wykonywać ostrożnie, tak by nie pozostawić zbyt dużo odcisków palców. Następnie dokonać oględzin w świetle lampy UV ustawiając kartkę prostopadle i skośnie. Odczytać i zanotować zaobserwowany zapis oraz sprawdzić, czy widoczne są na kartce odciski palców piszącego.

Innymi wykorzystywanymi związkami chemicznymi mogą być: fenoloftaleina, kwas salicylowy, octan ołowiu(II), siarczan(VI) miedzi(II), azotan (V) srebra, chlorek kobaltu czy też sok z cytryny. Poniżej przedstawiono opisy ćwiczeń z wykorzystaniem wymienionych „atramentów sympatycznych”.

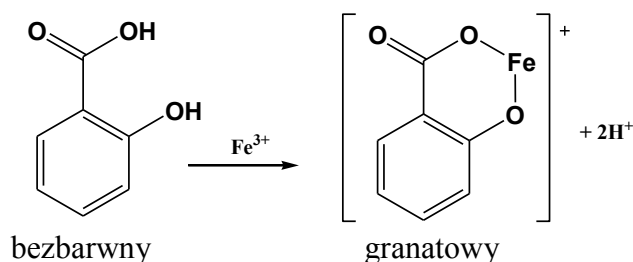
Ujawnianie zapisu atramentem w kolorze granatowym

Odczynniki:

- 2% roztwór kwasu salicylowego
- 5% roztwór chlorku żelaza(III)

Sprzęt:

- kartka papieru
- rozpylacz
- pióro



Wykonanie:

Przygotować 2% roztwór kwasu salicylowego następnie napelnić nim pióro, a resztę roztworu przelać do zakorkowanej buteleczki. Uszykować 5% roztwór chlorku żelaza(III) i przelać do rozpylacza. Na czystej kartce papieru należy wykonać napis za pomocą pióra wcześniej napelnionego uszykowanym atramentem (2% roztworem kwasu salicylowego). Lub na kartce otrzymanej od prowadzącego z nieznanym zapisem i wykonać swój napis za pomocą pióra wcześniej napelnionego uszykowanym atramentem (2% roztworem kwasu salicylowego). Dokładnie wysuszyć napis po czym kartkę spryskać roztworem z rozpylacza. Odczytać napis. W trakcie analizy zachodzi reakcja opisana powyższym równaniem reakcji.

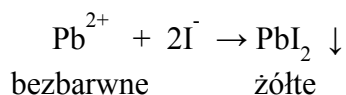
Ujawnianie zapisu atramentem w kolorze żółtym

Odczynniki:

- 5% roztwór octanu ołowiu(II)
- lub 5% roztwór azotanu ołowiu(II)
- 5% roztwór jodku potasu

Sprzęt:

- kartka papieru
- rozpylacz
- pióro



Wykonanie:

Przygotować 5% roztwór octanu ołowiu(II) lub 5% roztwór azotanu ołowiu(II) (sól łatwiej rozpuszczalna) następnie napełnić nim pióro, a resztę roztworu przelać do zakorkowanej buteleczki. Uszykować 5% roztwór jodku potasu i przelać do rozpylacza. Na czystej kartce papieru należy wykonać napis za pomocą pióra wcześniej napełnionego uszykowanym atramentem (5% roztworem octanu ołowiu(II)). Lub na kartce otrzymanej od prowadzącego z nieznanym zapisem i wykonać swój napis za pomocą pióra wcześniej napełnionego uszykowanym atramentem (5% roztworem octanu ołowiu(II)). Dokładnie wysuszyć napis po czym kartkę spryskać roztworem z rozpylacza. Odczytać napis. W trakcie analizy zachodzi reakcja opisana powyższym równaniem reakcji.

Ujawnianie zapisu atramentem w kolorze malinowym

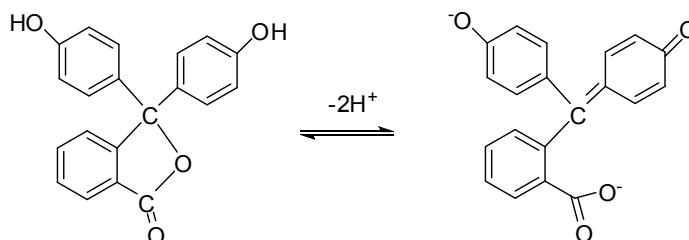
Odczynniki:

- 5% roztwór wodorotlenku sodu
- 1% metanolowy roztwór fenoloftaleiny

Sprzęt:

- kartka papieru
- rozpylacz
- pióro

Fenoloftaleina w roztworze obojętnym i kwaśnym jest bezbarwna, natomiast a w roztworze zasadowym - malinowa (zakres zmiany barwy pH = 8,3 – 10,0), co następuje przez otwarcie pierścienia laktonowego z jednoczesnym wytworzeniem chromoforu chinoidowego.



Forma cząsteczkowa i jonowa (niezdysocjowana i zdysocjowana) fenoloftaleiny

CHEMIA SĄDOWA

Wykonanie:

Przygotować 5% roztwór wodorotlenku sodu następnie napełnić nim pióro, a resztę roztworu przelać do zakręcanej buteleczki. Uszykować 1% metanolowy roztwór fenoloftaleiny i przelać do rozpylacza. Na czystej kartce papieru należy wykonać napis za pomocą pióra wcześniej napełnionego uszykowanym atramentem (5% roztworem wodorotlenku sodu). Lub na kartce otrzymanej od prowadzącego z nieznanym zapisem i wykonać swój napis za pomocą pióra wcześniej napełnionego uszykowanym atramentem (5% roztworem wodorotlenku sodu). Dokładnie wysuszyć napis po czym kartkę spryskać roztworem z rozpylacza. Odczytać napis. W trakcie analizy zachodzi reakcja opisana powyższym równaniem reakcji.

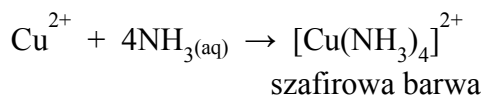
Ujawnianie szafirowego napisu za pomocą oparów wywoływacza

Odczynniki:

- 5% roztwór siarczanu(VI) miedzi(II)
- 25% roztwór amoniaku

Sprzęt:

- kartka papieru (niebieska)
- duży słoje z nakrętką
- pióro
- niska zlewka na 25 mL



Wykonanie:

Przygotować 5% roztwór siarczanu(VI) miedzi(II) następnie napełnić nim pióro, a resztę roztworu przelać do zakorkowanej buteleczki. Na czystej małej (np. 10x10cm) niebieskiej kartce papieru należy wykonać napis za pomocą pióra wcześniej napełnionego uszykowanym atramentem (5% roztworem siarczanu(VI) miedzi(II)). Lub na kartce otrzymanej od prowadzącego z nieznanym zapisem i wykonać swój napis za pomocą pióra wcześniej napełnionego uszykowanym atramentem (siarczanu(VI) miedzi(II)). **Prace z amoniakiem wykonywać pod sprawnie działającym dygestorium!!! Amoniak wydziela drażniące pary!!!** Do niskiej zlewki wlać ok. 5-10mL 25% amoniaku. W dużym słoju umieścić niską zlewkę z 25% amoniakiem. Dokładnie wysuszyć napis po czym kartkę umieścić w słoju, tak by nie miała bezpośredniego kontaktu z roztworem a jedynie z oparami, zakręcić i odczekać do czasu ujawnienia napisu. Odczytać napis. W trakcie analizy zachodzi reakcja opisana powyższym równaniem reakcji.

CHEMIA SĄDOWA

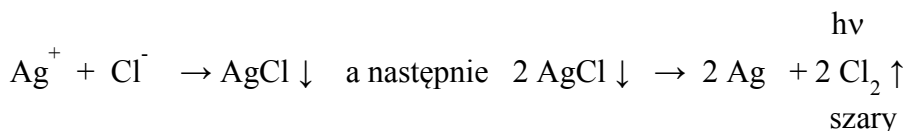
Ujawnianie pisma za pomocą naświetlania

Odczynniki:

- 5% roztwór azotanu(V) srebra
- 5% chlorku sodu

Sprzęt:

- kartka papieru
- pióro

**Wykonanie:**

Przygotować 5% roztwór chlorku sodu następnie napełnić nim pióro, a resztę roztworu przelać do zakręcanej buteleczki. Uszykować 5% roztwór azotanu(V) srebra i przelać do rozpylacza. Na czystej kartce papieru należy wykonać napis za pomocą pióra wcześniej napełnionego uszykowanym atramentem (5% roztworem chlorku sodu). Lub na kartce otrzymanej od prowadzącego z nieznanym zapisem i wykonać swój napis za pomocą pióra wcześniej napełnionego uszykowanym atramentem (5% roztworem chlorku sodu). Dokładnie wysuszyć napis po czym kartkę spryskać roztworem z rozpylacza (5% roztworem azotanu(V) srebra). Następnie wystawić kartkę na działanie światła słonecznego, w efekcie następuje ciemnienie kartki, jednak ciemniejący napis jest również zauważalny. Odczytać napis. W trakcie analizy zachodzi reakcja opisana powyższym równaniem reakcji.

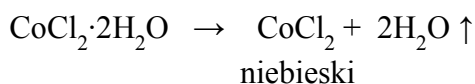
Ujawnianie pisma za pomocą ogrzewania

Atrament sympatyczny wielokrotnego użytku**Odczynniki:**

- 1% roztwór chlorku kobaltu
- woda

Sprzęt:

- kartka papieru
- pióro
- duży krystalizator
- płytką grzejną

**Wykonanie:**

Przygotować 1% roztwór chlorku kobaltu następnie napełnić nim pióro, a resztę roztworu przelać do zakręcanej buteleczki. Na czystej kartce papieru należy wykonać napis za pomocą pióra wcześniej napełnionego uszykowanym atramentem (1% roztworem chlorku kobaltu). Lub na kartce otrzymanej od prowadzącego z nieznanym zapisem i wykonać swój napis za

CHEMIA SĄDOWA

pomocą pióra wcześniej napełnionego uszykowanym atramentem (1% roztworem chlorku kobaltu). Dokładnie wysuszyć napis. Rozgrzać płytkę grzejną i kilka centymetrów ponad umieścić analizowaną kartkę papieru. Odczytać napis. W wyniku ogrzewania następuje ujawnienie niebieskiego napisu, jednak po umieszczeniu tej kartki nad krystalizatorem z parująca wodą napis zanika (chlorek kobaltu staje się ponownie uwodniony). W trakcie analizy zachodzi reakcja opisana powyższym równaniem reakcji.

Cytrynowy atrament sympatyczny

Odczynniki:

- sok z cytryny

Sprzęt:

- kartka papieru

- pióro

- płytka grzejna

Wykonanie:

Pióro napełnić sokiem z cytryny. Na czystej kartce papieru należy wykonać napis za pomocą pióra wcześniej napełnionego uszykowanym atramentem (sokiem z cytryny). Lub na kartce otrzymanej od prowadzącego z nieznanym zapisem i wykonać swój napis za pomocą pióra wcześniej napełnionego uszykowanym atramentem (sokiem z cytryny). Dokładnie wysuszyć napis. Rozgrzać płytkę grzejną i kilka centymetrów ponad umieścić analizowaną kartkę papieru. Odczytać napis. W wyniku ogrzewania następuje ujawnienie ciemnego napisu. Do eksperymentu można też zastosować roztwór glukozy czy sacharozy, mleka (zawiera laktozę) czy np. jabłkowego soku (fruktoza). Ujawnienie napisu zachodzi w wyniku reakcji rozkładu związku organicznego czy też karmelizacji w przypadku cukrów.

IV. PIŚMIENNICTWO

- Aspevall, O.; Hallander, H.; Gant, V.; Kouri, T. *European Guidelines for Urinalysis*, Clinical Microbiology and Infection, 2001, 7, 173.
- Bell, S. *Drugs, Poisons and Chemistry*, Facts On File, Inc., New York, 2009
- Bridges, J.W.; French, M.R.; Smith, R.L.; Williams, R.T. *The fate of benzoic acid in various species*, Biochem. J., 1970, 118, 47.
- Canon, F.; Paté, F.; Meudec, E.; Marlin, T.; Cheynier, V.; Giuliani, A.; Sarni-Manchado, P. *Characterization, stoichiometry, and stability of salivary protein-tannin complexes by ESI-MS and ESI-MS/MS*. Anal. Bioanal. Chem., 2009, 395, 2535
- Caplan, Y.H.; Goldberger, B.A. *Alternative specimens for workplace drug testing*, J. Anal. Toxicol. 2001, 25, 396.
- Cingolani, M.; Scavella, S.; Mencarelli, R.; Mirtella, D.; Froldi, R.; Rodriguez, D. *Simultaneous detection and quantitation of morphine, 6-acetylmorphine, and cocaine in toenails: comparison with hair analysis*, J. Anal. Toxicol. 2004, 28, 128.
- Cyprysiak, G.; Tadeusiak, W. *Zastosowanie śliny w diagnostyce medycznej*, Nowa Stom., 2001, 16, 33.
- Ćwiczenia praktyczne z biochemii: skrypt dla studentów II roku Wydziału Lekarskiego pod red. E. Birkner, Śląska Akademia Medyczna, Katowice, 2006
- Dimich-Ward, H.; Gee, H.; Brauner, M. et al. *Analysis of nicotine and cotinine in the hair of hospitality workers exposed to environmental tobacco smoke*, J. Occup. Environ. Med. 1997, 39, 946.
- Fujii, T.; Hatanaka, K.; Sato, G.; Yasui, Y.; Arimoto, H.; Mitsutsuka, Y. *Selective determination of haloperidol in human serum: surface ionization mass spectrometry and gas chromatography with surface ionization detection*. J. Chrom. B, 1996, 687, 395.
- Garg, R.K.; Pal, H.; Kaur, R. *Application of new commonly available substance for the visualization of latent finger marks: white cement*, Problems on Forensic Sciences, 2014, 97, 5.
- Gentili, S.; Torresi, A.; Marsili, R. et al. *Simultaneous detection of amphetamine-like drugs with headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry*, J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 2002, 780, 183.
- Gruga, E.; Goc, M.; Moszczyński, J. *Kryminalistyka czyli rzecz o metodach śledczych*, Wydawnictwo WAIP, 2009
- Hattori, A.T.; Iwai, H. *Liquid chromatographic - mass spectrometric determination of haloperidol and its metabolite in human plasma and urine*, J. Chrom. B, 2002, 776, 107.

- Hołyst, B. *Kryminalistyka*, Wyd. VIII, Wydawnictwa prawnicze PWN, Warszawa, 1996
- Ishiyama, I.; Nagai, T.; Toshida, S. *Detection of Basic Drugs (Methamphetamine, Antidepressants, and Nicotine) from Human Hair*, *Forensic Sci.* 1983, 28, 380.
- Kintz, P. *Gas chromatographic analysis of nicotine and cotinine in hair*, *J Chromatogr.* 1992, 580, 347.
- Kłys, M.; Rojek, S.; Moskała, A. *Wykorzystanie materiałów alternatywnych w ekspertyzie toksykologicznej z zastosowaniem metody LC/APCI/MS do oceny przypadku kompleksowego zatrucia śmiertelnego kломipraminą, tianeptyną i hydroksyzyną*, *Z Zagadnień Nauk Sądowych*, 2003, LV, 76.
- Kozłowska, K.; Polkowska, Ż.; Przyjazny, A.; Namieśnik, J. *Analytical procedures used in examining human urine samples*, *Pol. J. Environ. Stud.*, 2003, 12, 503.
- Kronstrand, R.; Nyström, I.; Strandberg, J. et al. *Screening for drugs of abuse in hair with ion spray LC-MS-MS*, *Forensic Sci Int.* 2004, 145, 183.
- Lis, A.W.; McLaughlin, D.I.; McLaughlin, R.K.; Lis, E.W.; Stubbs, E.G. *Profiles of Ultraviolet-absorbing Components of Urine from Autistic Children, as Obtained by High-Resolution Ion-Exchange Chromatography*, *Clin. Chem.*, 1976, 22, 1528.
- Marsh, P. *Mikrobiologia jamy ustnej*, Wydawnictwo PWN, 1994.
- Newton, D.E. *Forensic chemistry*, Facts On File, Inc., New York, 2007
- Nilsen, T.; Zahlsen, K.; Nilsen, O. *Uptake of nicotine in hair during controlled environmental air exposure to nicotine vapor: evidence for a major contribution of environmental nicotine to the overall nicotine found in hair from smokers and non-smokers*, *Pharmacol Toxicol.* 1994, 75, 136.
- Paszyńska, E. *Wybrane czynniki wpływające na wydzielanie i skład śliny – omówienie aktualnego piśmiennictwa*, *Dental Forum*, 2005, XXXII, 86.
- Pawliszyn, J. *Solid Phase Microextraction: Theory and Practice*, Wiley-VCH, 1997.
- Pichini, S.; Altieri, I.; Pellegrini, M. et al. *Hair analysis for nicotine and cotinine: evaluation of extraction procedures, hair treatments, and development of reference material*, *Forensic Sci Int.* 1997, 84, 243.
- Praktikum z biochemii*. Praca zbiorowa pod red. A. Dubina i B. Turyny. Instytut Biologii Molekularnej Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków 1999.
- Pufal, E. *Determination of medicines in epidermis products and their usefulness in forensic toxicology*, *Problems of Forensic Science*, 2002, LII, 7

- Pufal, E.; Piotrowski, P. *Oznaczanie haloperidolu w paznokciach metodą LC-ESI-MS*, Arch. Med. Sąd. Krym. 2006, LVI, 187
- Pufal, E.; Sykutera, M.; Piotrowski, P. *Opracowanie metody oznaczania leków przeciwdepresyjnych w paznokciach i jej wykorzystanie w toksykologii sądowej*, Arch. Med. Sąd. Krym., 2008, LVIII, 167.
- Pufal, E.; Sykutera, M.; Nowacka, T.; Stefanowicz, A.; Śliwka, K. *Opracowanie metody oznaczania citalopramu i desmetylocitalopramu w paznokciach i włosach i jej wykorzystanie w toksykologii sądowej*, Arch. Med. Sąd. Krym., 2010, LX, 216
- Rasulev, U.K.; Khasanov, U.; Islamov, T.K.; Shakhitov, M.M.; Usmanov, D.T. *Surface ionization mass spectrometry. Selective determination of trace amounts of opioids in urine*, Problems of Forensic Sciences, 2000, XLIII, 237.
- Scutaru, B.; Ghițescu, M.; Hăvârneanu, D.; Maftai, A.; Romanic, M. *Metabolic aspect in rates exposed individually and simultaneously to organic solvents*, J. Prev. Med., 2003, 11, 53.
- Sodhi, G.S.; Kaur, J. *Physical developer method for detection of latent fingerprints: A review*, Egyptian Journal of Forensic Sciences, 2016, 6, 44.
- Sorensen, M.; Bisgaard, H.; Stage, M. et al. *Biomarkers of exposure to environmental tobacco smoke in infants*, Biomarkers 2007, 12, 38.
- Trabelsi, H.; Bouadballah, S.; Bouzouita, K.; Safta, F. *Determination and degradation study of haloperidol by high performance liquid chromatography*, J. Pharm. Biomed. Anal. 2002, 29, 649.
- Tsujikawa, K.; Mohri, H.; Kuwayama, K. et al. *Analysis of hallucinogenic constituents in Amanita mushroom scirculated in Japan*, Forensic Sci. Inter. 2006, 164, 172.
- Tsunoda, K.; Inoue, N.; Aoyagi, Y.; Sugahara, T. *Simultaneous analysis of ibotenic acid and muscimol in toxic mushroom, Amanita muscaria, and analytical survey on edible mushrooms*, J. Food Hyg. Soc. Jpn. 1993, 34, 12.
- Vaid, B.A.; Kumar, S.; Rana, R.S.; Kumar, N. *Visualisation of disappearing ink writings*, Problems of Forensic Sciences 2012, 92, 311.
- Verdoorn, T. A.; Dingle, R. *Excitatory amino acid receptors expressed in Xenopus oocytes: agonist pharmacology*, Mol. Pharmacol. 1988, 34, 298.
- Walter, S.; Bauer, S.; Roots, I.; Brockmüller, J. *Quantification of the antipsychotics flupentixol and haloperidol in human serum by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection*, J. Chrom. B 1998, 720, 231.

- Wong, D.T.; Zhang, L.; Farrell, J.; Zhou, H.; Elashoff, D.; Gao, K.; Paster, B. *Salivary biomarkers for pancreatic cancer detection*. J. Clin. Oncol. (Meeting Abstracts), 2009, 27, 4630.
- Yasui-Furukori, N.; Inoue, Y.; Chiba, M.; Tateishi, T. *Simultaneous determination of haloperidol and bromperidol and their reduced metabolites by liquid-liquid extraction and automatic column-switching high-performance liquid chromatography*, J. Chrom. B, 2004, 805, 175.
- Yoshida, M.; Akane, A.; Mitani, T.; Watabiki, T. *Simple colorimetric semiquantitation method of hippuric acid in urine for demonstration of toluene abuse*, Legal Medicine, 2005, 7, 198.
- Zahlsen, K.; Nilsen, O. *Gas chromatographic analysis of nicotine in hair*, Environ Technol. 1990, 11, 353.
- Zasady przeprowadzania pomiarów stężenia alkoholu oraz opiniowania w sprawach trzeźwości. Zalecenia opracowane przez Instytut Ekspertyz Sądowych zatwierdzone przez Zarząd Główny Polskiego Towarzystwa Medycyny Sądowej i Kryminologii w dniu 26 listopada 2004 roku, „Prokuratura i Prawo” 2005, nr 4.*
- Zuba D. *Niepewność pomiarowa wyznaczania stężenia alkoholu we krwi*, Z Zagadnień Nauk Sądowych, 2003, nr LIV.