



Σχολή Θετικών Επιστημών
Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα Σπουδών
Χημική και Βιομοριακή Ανάλυση

Διπλωματική Εργασία
Σύγχρονες εργαστηριακές μέθοδοι στην Εγκληματολογία

Αφροδίτη Κοκκόση

Επιβλέπων καθηγητής: Ανδρέας Σκορίλας

Πάτρα, Ιανουάριος 2024

Η παρούσα εργασία αποτελεί πνευματική ιδιοκτησία της φοιτήτριας («συγγραφέας/δημιουργός») που την εκπόνησε. Στο πλαίσιο της πολιτικής ανοικτής πρόσβασης η συγγραφέας/δημιουργός εκχωρεί στο ΕΑΠ, μη αποκλειστική άδεια χρήσης του δικαιώματος αναπαραγωγής, προσαρμογής, δημόσιου δανεισμού, παρουσίασης στο κοινό και ψηφιακής διάχυσής τους διεθνώς, σε ηλεκτρονική μορφή και σε οποιοδήποτε μέσο, για διδακτικούς και ερευνητικούς σκοπούς, άνευ ανταλλάγματος και για όλο το χρόνο διάρκειας των δικαιωμάτων πνευματικής ιδιοκτησίας. Η ανοικτή πρόσβαση στο πλήρες κείμενο για μελέτη και ανάγνωση δεν σημαίνει καθ' οιονδήποτε τρόπο παραχώρηση δικαιωμάτων διανοητικής ιδιοκτησίας του συγγραφέα/δημιουργού ούτε επιτρέπει την αναπαραγωγή, αναδημοσίευση, αντιγραφή, αποθήκευση, πώληση, εμπορική χρήση, μετάδοση, διανομή, έκδοση, εκτέλεση, «μεταφόρτωση» (downloading), «ανάρτηση» (uploading), μετάφραση, τροποποίηση με οποιονδήποτε τρόπο, τμηματικά ή περιληπτικά της εργασίας, χωρίς τη ρητή προηγούμενη έγγραφη συναίνεση του συγγραφέα/δημιουργού. Η συγγραφέας/δημιουργός διατηρεί το σύνολο των ηθικών και περιουσιακών του δικαιωμάτων.



Σύγχρονες εργαστηριακές μέθοδοι στην Εγκληματολογία

Αφροδίτη Κοκκόση

Επιτροπή Επίβλεψης Διπλωματικής Εργασίας

Επιβλέπων Καθηγητής:

Ανδρέας Σκορίλας

Καθηγητής, ΕΑΠ

Συν-Επιβλέπων Καθηγητής:

Αλέξανδρος Γεωργακίλας

Καθηγητής, ΕΑΠ

Πάτρα, Ιανουάριος 2024

Στην οικογένειά μου και τους φίλους μου

Περίληψη

Ο όρος εγκληματολογία προέρχεται από δύο λέξεις, το «έγκλημα» και το ρήμα «λέγω». Το αντικείμενο αυτού του επιστημονικού κλάδου είναι να μελετήσει τα χαρακτηριστικά της κάθε εγκληματικής πράξης καθώς και των εμπλεκομένων σε αυτήν (θύμα και θύτης).

Στο δικαστήριο, οι εγκληματολόγοι καταθέτουν κατέχοντας ειδικές γνώσεις, με σκοπό την πλήρη διαφάνεια για την κάθε υπόθεση. Συνεπώς, ο τομέας της εργαστηριακής εγκληματολογίας είναι συνεχώς εξελισσόμενος. Ο τρόπος συλλογής του δείγματος, η επιλογή της καταλληλότερης μεθόδου είναι παραδείγματα που παίζουν καθοριστικό ρόλο για τη διεξαγωγή του συμπεράσματος. Αξιοσημείωτο είναι ότι ένα λάθος συμπέρασμα μπορεί να στερήσει σ' έναν άνθρωπο την ελευθερία του και ταυτόχρονα ένα αληθές και έγκυρο συμπέρασμα μπορεί να καταδικάσει έναν εγκληματία.

Τα τελευταία χρόνια, η επιστήμη της εργαστηριακής εγκληματολογίας έχει εξελιχθεί με ταχείς ρυθμούς. Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται σήμερα και με τη βοήθεια της τεχνολογίας επιτρέπουν τη ακριβή ανάλυση των βιολογικών υλικών που έχουν συλλεχθεί από τους τόπους εγκλημάτων. Μερικές από αυτές τις τεχνικές είναι η υγρή και αέρια χρωματογραφία, η φασματομετρία μάζας, η αλληλούχηση επόμενης γενιάς και η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης. Κάθε αναλυτική ή μοριακή τεχνική παρουσιάζει διαφορετική ευαισθησία και ειδικότητα, όμως είναι αναμφίβολα το πιο δυνατό εργαλείο για τη διαλεύκανση των εγκλημάτων.

Στη παρούσα διπλωματική εργασία, θα αναλύσουμε τη θεμελιώδη αρχή στην οποία στηρίζεται κάθε μέθοδος, τα πλεονεκτήματα και τα μειονεκτήματα κάθε τεχνικής και πώς ακριβώς εφαρμόζονται στην εργαστηριακή εγκληματολογία. Παράλληλα, θα εξετάσουμε τα αποτελέσματα που μπορεί να προκύψουν από συνδυασμό των μεθόδων μεταξύ τους.

Λέξεις – Κλειδιά

Εγκληματολογία, Εργαστηριακές μέθοδοι, Χημική ανάλυση, Μοριακή ανάλυση, Βιολογικά δείγματα.

«Modern laboratory methods in Forensic Criminology»

Afroditi Kokkosi

Abstract

The term criminology comes from two words, "crime" and the verb "say". The object of this scientific branch is to study the characteristics of each criminal act as well as those involved in it (victim and perpetrator).

In court, criminologists testify possessing special knowledge, with the aim of complete transparency for each case. Therefore, the field of laboratory forensics is constantly evolving. The way to collect the sample, the choice of the most appropriate method are examples that play a decisive role in conducting the conclusion. It is noteworthy that a wrong conclusion can deprive a person of his freedom and at the same time a true and valid conclusion can convict a criminal.

In recent years, the science of laboratory forensics has developed rapidly. The methods used today and with the help of technology allow the precise analysis of biological materials collected from crime scenes. Some of these techniques are liquid and gas chromatography, mass spectrometry, next-generation sequencing, and polymerase chain reaction. Each analytical or molecular technique has a different sensitivity and specificity, but is undoubtedly the most powerful tool for solving crimes.

In this thesis, we will analyze the fundamental principle on which each method is based, the advantages and disadvantages of each technique and exactly how they are applied in laboratory forensics. At the same time, we will examine the results that may arise from a combination of the methods.

Keywords

Forensic Criminology, Laboratory methods, Chemical analysis, Molecular analysis, Biological samples.

Περιεχόμενα

Περίληψη.....	v
Abstract	vii
Περιεχόμενα	ix
Κατάλογος Εικόνων / Σχημάτων	xii
Κατάλογος Πινάκων	xiv
Συντομογραφίες & Ακρωνύμια.....	xv
1. Εισαγωγή.....	1
1.1 Η επιστήμη της εγκληματολογίας	1
1.2 Ιστορική αναδρομή της εγκληματολογίας.....	1
2. Επισκόπηση του πεδίου	4
2.1 Εκτίμηση χρόνου θανάτου	4
2.2 Σκηνή του εγκλήματος και συλλογή δειγμάτων	6
2.3 Βιολογικά Υλικά	7
2.3.1 Αίμα.....	8
2.3.2 Σάλιο	9
2.3.3 Οστά	10
2.3.4 Τρίχες	10
2.3.5 Ρούχα.....	11
3. Αναλυτικές εργαστηριακές τεχνικές	13
3.1 Χρωματογραφία	13
3.1.1 Αέρια χρωματογραφία	13
3.1.2 Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης	15
3.1.3 Χρωματογραφία Λεπτής Στοιβάδας.....	16

3.1.4 Εφαρμογές των χρωματογραφικών τεχνικών στο πεδίο	17
3.1.4.1 Ανίχνευση της κοκαΐνης και των μεταβολιτών της σε βιολογικά δείγματα.	18
3.1.4.2 Προσδιορισμός αμφεταμίνης και μεθαμφεταμίνης στο αίμα	24
3.1.4.3 Ανίχνευση κεταμίνης στο πλάσμα και στα ούρα	26
3.1.4.4 Προσδιορισμός νιτροκυτταρίνης και νιτρογλυκερίνης σε άκαπνη πυρίτιδα (smokeless powder).....	29
3.1.4.5 Προσδιορισμός του φαρμάκου φλουνιτραζαπάμη στα μαλλιά.....	34
3.2 Φασματοσκοπία υπερύθρου	35
3.2.1 Εξασθενημένη ολική ανάκλαση-Φασματοσκοπία υπέρυθρων	36
3.2.2 Ανάλυση βαφών από δοχεία ψεκασμού σε χαρτί	37
3.3 Φασματομετρία μάζας.....	40
3.3.1 Φασματομετρία μάζας υψηλής απόδοσης.....	42
3.3.2 Φασματομετρία μάζας ιονισμού περιβάλλοντος.....	43
3.3.3 Ανίχνευση βαρέων μετάλλων σε αίμα και ούρα	46
3.4 Περίθλαση ακτίνων Χ.....	47
3.4.1 Ανάλυση των στοιχείων του εδάφους για τη συσχέτιση σκηνών εγκλήματος, εργαλείων και ατόμων.....	48
3.5 Φασματοσκοπία Raman	50
3.5.1 Προσδιορισμός της σύστασης των μελανιών που χρησιμοποιούνται σ' ένα έγγραφο	51
4. Μοριακές εργαστηριακές τεχνικές.....	54
4.1 Ανοσολογικές δοκιμασίες	54
4.2 Ανάλυση μεταγραφώματος	59
4.2.1 Αλληλούχηση κατά Sanger	59

4.2.2 Αλληλούχηση επόμενης γενιάς.....	60
4.2.3 Αλληλούχηση τρίτης γενιάς.....	62
4.3 Ανάλυση STR.....	64
4.4 Ανάλυση μιτοχονδριακού γονιδιώματος.....	66
4.5 Ισόθερμη ενίσχυση με μεσολάβηση βρόχου.....	66
4.6 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου – ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης.....	68
5. Συμπεράσματα	73
Βιβλιογραφία.....	75

Κατάλογος Εικόνων / Σχημάτων

Εικόνα 1: Διαδικασία ανάλυσης δείγματος DNA	8
Εικόνα 2: Σχηματική απεικόνιση αέριου χρωματογράφου	14
Εικόνα 3: Οργανολογία της HPLC	17
Εικόνα 4: Η διαδικασία της TLC	18
Εικόνα 5: Οι μεταβολίτες της κοκαΐνης.....	19
Εικόνα 6: Ποσοτικοποίηση κοκαΐνης και των μεταβολιτών της σε δείγμα ούρων με GC- MS με ιονισμό πρόσκρουσης ηλεκτρονίων και παρακολούθηση επιλεγμένων ιόντων.....	21
Εικόνα 7: Χρωματογράφημα ενός τυφλού δείγματος ολικού αίματος με τη μέθοδο VAMS	24
Εικόνα 8: Χρωματογράφημα ενός άγνωστου δείγματος αίματος από παραγοντοποίηση στη στήλη και έπειτα ανάλυση GC/MS	25
Εικόνα 9: Χρωματογράφημα παρακολούθησης επιλεγμένων ιόντων από ούρα με αποτελέσμα αναζήτησης αυτόματης βιβλιοθήκης (κεταμίνη στα 20 ng/mL)	28
Εικόνα 10: Α) Δοκιμή με σκόνη διπλής βάσης. Β) Δοκιμή μέσης κηλίδας με έλεγχο αντιδραστήριου. Γ) Δοκιμή με σκόνη μονής βάσης	31
Εικόνα 11: Το αντιδραστήριο p-dmac	31
Εικόνα 12: Το χρωματογράφημα ολικού ιόντος (TIC) της NC και τα εύλογα παράγωγα της NC (a-c) καθώς και τα αντίστοιχα φάσματα μάζας τους.....	33
Εικόνα 13: Το χρωματογράφημα του φαρμάκου φλουνιτραζεπάμη έπειτα από εκχύλιση ενός σταδίου	35
Εικόνα 14: Φάσματα υπερύθρων δείγματος βαφής από σπρέι μετά από 0, 1, 2, 3, 4 και 5 λεπτά ανακίνησης αντίστοιχα. Στο κάτω μέρος της εικόνας απεικονίζεται το πρότυπο αναφοράς μίας χρωστικής βαφής, PR112	40

Εικόνα 15: Σχηματική απεικόνιση ενός φασματομέτρου μάζας.....	41
Εικόνα 16: Εφαρμογές της φασματομετρίας μάζας υψηλής ανάλυσης.....	43
Εικόνα 17: Κύριες τεχνικές ιονισμού περιβάλλοντος που χρησιμοποιούνται στην τοξικολογική εγκληματολογική ανάλυση	44
Εικόνα 18: Σχηματική απεικόνιση της XRD	48
Εικόνα 19: Φάσματα Raman διάφορων μελανιών που υπάρχουν σ' ένα υπό ανάλυση έγγραφο	54
Εικόνα 20: Οι τέσσερις τύποι ELISA	57
Εικόνα 21: Η PCR-ELISA	58
Εικόνα 22: Η μέθοδος LAMP	68
Εικόνα 23: Προετοιμασία ενός πηκτώματος αгарόζης για ηλεκτροφόρηση DNA.....	70

Κατάλογος Πινάκων

Πίνακας 1: Μερικά παραδείγματα παράνομων ναρκωτικών ουσιών και η μοριακή τους δομή.....	15
Πίνακας 2: Μοριακές τεχνικές για τη ταυτοποίηση βιολογικών υλικών.....	55

Συντομογραφίες & Ακρωνύμια

PMI	Postmortem Interval
GC	Gas Chromatography
HPLC	High-Performance Liquid Chromatography
TLC	Thin Layer Chromatography
MS	Mass Spectrometry
UV – Vis	UltraViolet – Visible
ATR – IR	Attenuated Total Reflection – Infra Red
DNA	Deoxyribonucleic acid
RNA	Ribonucleic acid
PCR	Polymerase Chain Reaction
LAMP	Loop-Mediated Isothermal Amplification
SEM	Scanning Electron Microscope
bp	Base Pair
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
NGS	Next-Generation Sequencing
MPS	Massive Parallel Sequencing
XRD	X-ray diffraction
SPE	Solid Phase Extraction
SPME	Solid Phase Microextraction
VAMS	Volumetric Absorptive Microsampling
STR	Short Tandem Repeat
SERS	Surface-Enhanced Raman Spectroscopy
RRS	Resonance Raman Spectroscopy
ESI	Electrospray Ionization
DPX	Dispersive Pipette Extraction
DBS	Dried Blood Spot
SIM	Single Ion Monitoring
TIC	Total Ion Chromatogram
RT	Room Temperature
AM	Amphetamine
MA	Methamphetamine

UAE	Ultrasound-Assisted Extraction
ΕΑΠ	Ελληνικό Ανοικτό Πανεπιστήμιο
ΘΕ	Θεματική Ενότητα
ΠΣ	Πρόγραμμα Σπουδών
ΣΥΝ	Συντονιστής
ΔΕ	Διπλωματική Εργασία

1. Εισαγωγή

1.1 Η επιστήμη της εγκληματολογίας

Εγκληματολογία είναι ο διεπιστημονικός κλάδος που ασχολείται με τη μελέτη του εγκλήματος αλλά και της εγκληματικής συμπεριφοράς. Αυτός ο τομέας περιλαμβάνει και επιμέρους τομείς όπως η Κοινωνιολογία, η Ψυχολογία, η Νομική, η Βιολογία και η Χημεία. Οι εγκληματολόγοι κατά την διάρκεια της έρευνάς τους, εξετάζουν πολλές προοπτικές για τα αίτια και τα αποτελέσματα του κάθε εγκλήματος. Ακόμη, διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στην καθιέρωση μιας πιο δίκαιης, βασισμένης στην επιστήμη κατανόησης του εγκλήματος, της πολιτικής και της κοινωνικής δικαιοσύνης. Εφαρμόζοντας τις θεωρητικές γνώσεις που έχουν αποκτήσει αλλά και την εργαστηριακή τους εμπειρία, συμβάλλουν στο έργο των υπηρεσιών επιβολής του νόμου και των νομικών.

Η εργαστηριακή εγκληματολογία μπορεί να επιβεβαιώσει ή να απορρίψει θεωρίες που αφορούν μια συγκεκριμένη τελεσθείσα αξιόποινη πράξη. Ασχολείται μόνο με την ανάλυση αποδεικτικών στοιχείων και δεν στηρίζεται σε εικασίες. Συνεπώς οι εγκληματολόγοι απομονώνουν και προστατεύουν την κάθε «σκηνή του εγκλήματος» και έπειτα επιλέγουν την πιο κατάλληλη μέθοδο για την επεξεργασία του δείγματος, με σκοπό το αποτέλεσμα της έρευνας να είναι αξιόπιστο. Επιπρόσθετα, η εργαστηριακή εγκληματολογία απαιτεί εξειδίκευση. Οι επιμέρους τομείς της, όπως η τοξικολογία, η χημεία και η βιολογία, πρέπει να ακολουθούν τα πρότυπα που έχουν καθοριστεί έτσι ώστε να μην υπάρχει κανένα περιθώριο αμφισβήτησης του αποτελέσματος.⁽¹⁾

1.2 Ιστορική αναδρομή της εγκληματολογίας

Η μελέτη της εγκληματολογίας σαν επιστήμη ξεκίνησε στην Ευρώπη στα τέλη του 1700. Εκείνη την εποχή υπήρχαν προβληματισμοί για τη σκληρότητα, την αδικία και την αναποτελεσματικότητα των φυλακών καθώς και του ποινικού δικαστικού συστήματος. Αρκετοί ανθρωπιστές, όπως ο Ιταλός νομικός Cesare Beccaria και ο Βρετανός δικηγόρος Sir Samuel Romilly, προσπάθησαν να μεταρρυθμίσουν τα σωφρονιστικά συστήματα και τα νομικά πλαίσια αλλά δεν εστίασαν στα αίτια του ίδιου του εγκλήματος. Αρχικά, θέλησαν να μειώσουν τη χρήση της θανατικής ποινής, οι φυλακές να εκσυγχρονιστούν και παράλληλα να υποχρεώσουν τους δικαστές να είναι αμερόληπτοι και δίκαιοι.

Οι πρώτες ετήσιες στατιστικές εκθέσεις για το έγκλημα δημοσιεύτηκαν στη Γαλλία στις αρχές του 1800. Ο Βέλγος μαθηματικός και κοινωνιολόγος Adolphe Quetelet ήταν ο πρώτος που ασχολήθηκε με τη μελέτη εγκλημάτων και ανακάλυψε ορισμένα επαναλαμβανόμενα μοτίβα σε αυτά. Αυτές οι εκθέσεις περιλαμβάνουν τα είδη των εγκλημάτων που διαπράχθηκαν, ο αριθμός των ατόμων που κατηγορήθηκαν για εγκλήματα, πόσοι από αυτούς καταδικάστηκαν καθώς και την ηλικία και το φύλο των δραστών. Οι σπουδές του και στους δύο κλάδους τον οδήγησαν στο να εξακριβώσει την αιτία της εγκληματικής συμπεριφοράς διάφορων δραστών.

Οι προσπάθειες αυτές συνεχίστηκαν και από τον Ιταλό γιατρό Cesare Lombroso στις αρχές του 1900. Θεωρείται ως ο πατέρας της σύγχρονης εγκληματολογίας. Ξεκίνησε να μελετά τα χαρακτηριστικά διάφορων εγκληματιών με απώτερο σκοπό να μάθει γιατί διέπραξαν εγκλήματα. Ήταν ο πρώτος άνθρωπος στην ιστορία που εφάρμοσε επιστημονικές μεθόδους στην ανάλυση του εγκλήματος. Το συμπέρασμα που διεξήγαγε από την μελέτη του ήταν ότι, η εγκληματικότητα είναι κληρονομική και οι εγκληματίες εμφανίζουν ορισμένα φυσικά χαρακτηριστικά.

Η χρονική περίοδος 1900 έως 2000 είναι εκείνη στην οποία η σύγχρονη εγκληματολογία εξελίχθηκε. Η μεγάλη εξέλιξη έγινε στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής (Η.Π.Α) και αποτελούνταν από τρεις φάσεις. Η πρώτη χρονική περίοδος από το 1900 έως το 1930, η αναφερόμενη ως «Χρυσή Εποχή της Έρευνας», χαρακτηρίστηκε από την προσέγγιση πολλών ταυτόχρονων πεδίων, την πεποίθηση ότι το έγκλημα προκαλείται από ένα πλήθος παραγόντων και απαιτούνται ειδικοί όροι για την επεξήγησή του. Κατά τη διάρκεια της «Χρυσής Εποχής της Θεωρίας» που ήταν από το 1930 έως το 1960, για τη μελέτη της εγκληματολογίας επικράτησε η «θεωρία του στελέχους» του Robert K. Merton. Ο ίδιος δήλωσε: «ότι η πίεση για την επίτευξη κοινωνικά αποδεκτών στόχων - το Αμερικανικό Όνειρο - πυροδότησε τις περισσότερες εγκληματικές συμπεριφορές». Η τελευταία χρονική περίοδος (1960 – 2000) έφερε επανάσταση στο τομέα της εγκληματολογίας. Η χρήση των κύριων κυρίαρχων εγκληματολογικών θεωριών μαζί με τις εμπειρικές μεθόδους σύνδραμαν στην εξέλιξη της επιστήμης αυτής. Οι έρευνες που πραγματοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια αυτής της τελευταίας φάσης, έφερε τις στηριζόμενες σε θεωρητικά πλαίσια για το έγκλημα και τους εγκληματίες που εφαρμόζονται μέχρι και σήμερα.

Σήμερα, το ανθρώπινο δυναμικό που εργάζεται στις αρχές επιβολής του νόμου, στην κυβέρνηση, σε ιδιωτικές ερευνητικές εταιρείες και στον ακαδημαϊκό χώρο, εφαρμόζουν την επιστήμη και την τεχνολογία, που συνεχώς εξελίσσεται, για να κατανοήσουν όσο το δυνατόν καλύτερα τα αίτια, τη προέλευση και τα αποτελέσματα που προέκυψαν από το κάθε έγκλημα. Συνεργάζονται με τοπικά, πολιτειακά και ομοσπονδιακά νομοθετικά όργανα, και συμβάλλουν στην αντιμετώπιση του εγκλήματος και της επιβολή μίας δίκαιης και ισότιμης τιμωρίας. ⁽¹⁾

2. Επισκόπηση του πεδίου της εγκληματολογίας

Πριν περιγράψουμε αναλυτικώς τις μεθόδους που χρησιμοποιούνται στην εγκληματολογία, θα πρέπει να αναφερθούμε σε κάποιους παράγοντες που παίζουν καθοριστικό ρόλο στην εγκυρότητα του αποτελέσματος. Σημαντικό ρόλο παίζει ο προσδιορισμός του χρόνου θανάτου στο τόπο του εγκλήματος και τα ευρήματα που προέκυψαν από την έρευνα. Τα ευρήματα μπορεί να είναι από δακτυλικά αποτυπώματα έως βιολογικά υγρά. Ακόμη, ο τρόπος συλλογής του δείγματος είναι σημαντικός και το πρωτόκολλο που υφίσταται πρέπει να εφαρμόζεται κατά γράμμα ώστε τα δείγματα να μην καταστρέφονται ή να επιμολύνονται.

2.1 Εκτίμηση του χρόνου θανάτου

Όταν βρίσκεται ένα πτώμα το σημαντικότερο είναι ο χρόνος για τον οποίο το άτομο είναι νεκρό. Η εκτίμηση του χρόνου θανάτου του ανθρώπου είναι ένα κομβικό σημείο της έρευνας στον εγκληματολογικό τομέα, λόγω των αστικών και ποινικών συνεπειών της. Στην πραγματικότητα, ένα από τα ολοένα και περισσότερο συζητούμενα θέματα στην ιατροδικαστική παθολογία είναι αυτό που αφορά την ποσοτικοποίηση του μεταθανάτιου διαστήματος (PMI). Η εκτίμηση του χρονικού διαστήματος μεταξύ του θανάτου ενός ατόμου και της ανακάλυψης του σώματος είναι εξαιρετικά περίπλοκη, καθώς επηρεάζεται από την επιρροή πολλών παραγόντων, τόσο ενδογενών όσο και εξωγενών. Επιπλέον, οι ειδικοί γνωρίζουν ότι όσο περισσότερος χρόνος περνάει μεταξύ του θανάτου και της ανακάλυψης του πτώματος, τόσο περισσότερο καθίσταται δύσκολο να εκτιμηθεί ο PMI. ⁽⁴⁾

Στην πραγματικότητα, αμέσως μετά το θάνατο, ξεκινούν διαφορετικά φαινόμενα διαδοχικής μεταμόρφωσης σε κάθε πτώμα, τα οποία γενικά ταξινομούνται σε πέντε στάδια αποσύνθεσης: φρέσκο, φούσκωμα, ενεργή σήψη, προχωρημένη σήψη και ξηρά υπολείμματα και επηρεάζουν το καθένα σώμα που αποσυντίθεται. Η νεκρική ακαμψία ξεκινά από τους μυς του προσώπου και πηγαίνει στη συνέχεια σε όλο το σώμα. Ακόμη, διάφοροι παράγοντες είναι σημαντικοί για το προσδιορισμό του χρόνου θανάτου. Για παράδειγμα, οι καιρικές συνθήκες παίζουν ρόλο στην πρόοδο των νεκρικών αλλοιώσεων. ⁽⁵⁾

Υπάρχουν πολλοί τρόποι για να υπολογίσουμε το χρόνο θανάτου. Ο πιο απλός τρόπος είναι η παρατήρηση του σώματος. Το πρόβλημα με τη χρονολόγηση του χρόνου θανάτου με βάση τη παρατήρηση μετασχηματιστικών πτωματικών φαινομένων είναι ότι έχει ένα εγγενές όριο ευαισθησίας, που καθορίζεται από παράγοντες που μπορεί να επηρεάσουν τις μεταθανάτιες διαδικασίες και από την εμπειρία του ιατροδικαστή. Γι' αυτό το λόγο, η επιστημονική έρευνα τα τελευταία χρόνια έχει επικεντρωθεί στην καθιέρωση μιας ποσοτικής μεθόδου που βασίζεται σε φυσικά και μαθηματικά κριτήρια και όχι σε παρατήρηση. Γνωστή ως το νομόγραμμα Henssge, εισήχθη το 1988, και βασίζεται σε ποσοτικά δεδομένα όπως το βάρος του πτώματος, η θερμοκρασία περιβάλλοντος και η θερμοκρασία του πτώματος. Αξίζει να σημειωθεί ότι η πιο σωστή μέτρηση της θερμοκρασίας του σώματος του νεκρού είναι η μέτρηση της θερμοκρασίας του σκωτιού. Η μέθοδος αυτή παρέχει αξιόπιστο χρονικό διάστημα θανάτου αλλά έχει και κάποιους εγγενείς περιορισμούς που δεν μπορούν να ξεπεραστούν, όπως η παρατεταμένη έκθεση του πτώματος στο άμεσο ηλιακό φως ή στον κλιματισμό.⁽⁵⁻⁶⁾

Ένα από τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα βιολογικά υγρά για το προσδιορισμό του χρόνου θανάτου είναι το υαλοειδές υγρό. Είναι σχετικά σταθερό και εύκολα προσβάσιμο, αλλά λιγότερο ευαίσθητο σε μολύνσεις από άλλες περιοχές του σώματος. Η μέθοδος για να προσδιοριστεί ο χρόνος θανάτου είναι η μέτρηση της συγκέντρωσης των ιόντων καλίου στο υγρό του υαλοειδούς σώματος των οφθαλμών. Η συγκέντρωση του ιόντος καλίου είναι περίπου 3,8 mmol/L και διατηρείται στο πρόσθιο και οπίσθιο μέρος του ματιού. Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι η συγκέντρωση ιόντων καλίου αφού επέλθει ο θάνατος αυξάνεται σημαντικά και δεν επηρεάζεται από εξωτερικούς παράγοντες όπως η υγρασία και η θερμοκρασία.⁽³⁾

Ένας άλλος τρόπος είναι το φαινόμενο «livor mortis», όπου η καρδιά έχει σταματήσει να χτυπά και η κυκλοφορία του αίματος έχει σταματήσει και τα έμμορφα συστατικά του θα καθιζάνουν στα αγγεία λόγω βαρύτητας. Η παραπάνω πορεία ξεκινά σε σύντομο χρονικό διάστημα από το θάνατο, περίπου 30 λεπτά. Ακόμη, μόνιμες μωβ κηλίδες σχηματίζονται από τα ερυθρά αιμοσφαίρια από 8 έως 12 ώρες μετά τον θάνατο.⁽⁷⁾ Επίσης, η χρήση εντόμων για την εκτίμηση του χρόνου θανάτου είναι καλά εδραιωμένη. Η εντομολογική εγκληματολογία εξελίσσεται και μπορεί να υπολογίσει το χρόνο θανάτου με βάση το κύκλο ζωής των εντόμων και παράλληλα χρησιμοποιώντας τεχνικές DNA.⁽⁸⁾

2.2 Σκηνή του εγκλήματος και συλλογή δειγμάτων

Σύμφωνα με την «Αρχή της ανταλλαγής» του Edmond Locard, κάθε εγκληματική ενέργεια έχει ως αποτέλεσμα την δημιουργία κάποιας μορφής ιχνών, τα οποία μπορούν να εντοπιστούν είτε πάνω στον ίδιο το δράστη ή στη σκηνή του εγκλήματος. Αυτά τα ίχνη είναι αντικειμενικά και η εργαστηριακή εγκληματολογία φροντίζει για τη σωστή ερμηνεία τους.⁽²⁾

Για τη διασφάλιση της εγκυρότητας του αποτελέσματος ο τόπος που έχει διαπραχθεί το έγκλημα θα πρέπει να ασφαλιστεί καταλλήλως και να επιτρέπεται η πρόσβαση κατόπιν εξουσιοδοτημένης άδειας. Χαρακτηριστικό παράδειγμα σφράγισης της σκηνής του εγκλήματος είναι η κίτρινη κορδέλα που τοποθετείται γύρω από αυτή. Επιπλέον, το εξειδικευμένο προσωπικό που καλείται να ερευνήσει το χώρο αυτό, εφοδιάζεται με τα κατάλληλα προστατευτικά μέσα.

Σε κάθε έγκλημα συλλέγονται διάφορα δείγματα. Αυτά τα δείγματα πρέπει να παρθούν σύμφωνα με κάποιες προδιαγραφές ώστε να μην αλλοιωθούν πριν φτάσουν στο εργαστήριο. Συγκεκριμένα οι προϋποθέσεις περιλαμβάνουν χρήση ειδικού εξοπλισμού που χρησιμοποιείται μία μόνο φορά αλλά και αποστείρωση εξαρτημάτων του εξοπλισμού αυτού που επαναχρησιμοποιούνται. Ακόμη, η φύση των δειγμάτων απαιτεί και τη κατάλληλη διαχείρισή τους και για να αποφευχθούν λάθη κατά τη μεταφορά ορίζονται διάφορα σημεία ελέγχου.

Η συλλογή των δειγμάτων πρέπει να γίνει πολύ προσεκτικά και να παρθούν όσο το δυνατόν περισσότερα δείγματα που θα βοηθήσουν στην διαλεύκανση της υπόθεσης. Κάθε δείγμα λαμβάνει ένα μοναδικό κωδικό που καθορίζεται από το άτομο που το συλλέγει. Αξίζει να σημειωθεί ότι διαφορετικά άτομα συλλέγουν τα δείγματα των θυμάτων και διαφορετικά των υπόπτων. Στη συνέχεια τα δείγματα κατηγοριοποιούνται ανάλογα με τη φύση τους. Επίσης, η συλλογή των δειγμάτων γίνεται σε νάιλον σακουλάκια αποστειρωμένα ώστε να διασφαλίζεται η ακεραιότητά τους.⁽⁹⁾

Ο κίνδυνος μόλυνσης οποιουδήποτε τύπου εγκλήματος μπορεί να μειωθεί περιορίζοντας την τυχαία δραστηριότητα. Είναι σημαντικό για όλο το προσωπικό επιβολής του νόμου στον τόπο του εγκλήματος να καταβάλει συνειδητή προσπάθεια να απέχει από το κάπνισμα, το φαγητό, το ποτό, τη ρίψη σκουπιδιών ή οποιαδήποτε άλλη ενέργεια που θα μπορούσε να θέσει σε κίνδυνο τον τόπο του εγκλήματος. Επειδή τα αποδεικτικά στοιχεία DNA είναι πιο ευαίσθητα από άλλα είδη αποδεικτικών στοιχείων, το προσωπικό επιβολής

του νόμου θα πρέπει να γνωρίζει ιδιαίτερα τις ενέργειές του στη σκηνή για να αποτρέψει την ακούσια μόλυνση των αποδεικτικών στοιχείων.

2.3 Τα Βιολογικά Υλικά

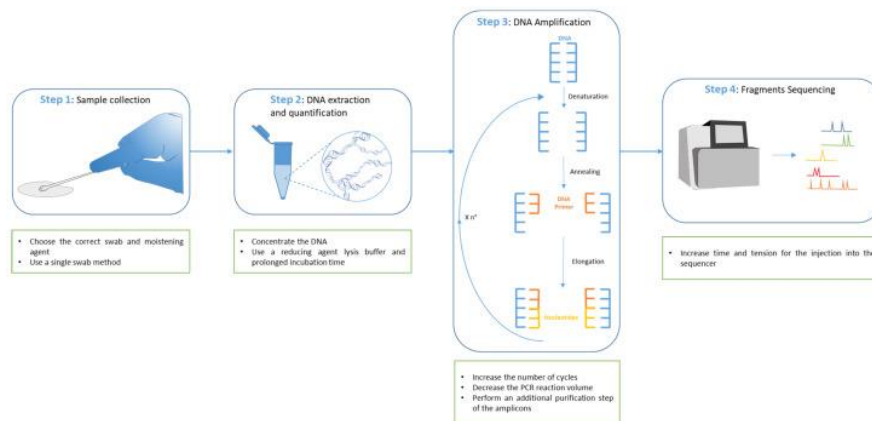
Τα βιολογικά υλικά αποτελούνται από σωματικά υγρά και ιστούς. Είναι ιδιαίτερα σημαντικά επειδή συχνά μπορεί να γίνει ανάλυση DNA. Αυτή η ανάλυση DNA μπορεί να αναγνωρίσει τον δράστη ή το θύμα. Παραδείγματα βιολογικών υλικών είναι το αίμα, το σάλιο, το σπέρμα, μαλλιά και ούρα. Δείγμα DNA μπορεί επίσης να ληφθεί με μια μπατονέτα που έχει ληφθεί από ένα αντικείμενο που είναι ύποπτο. Αυτό το είδος αποδεικτικών στοιχείων αναφέρεται μερικές φορές ως "Touch DNA". Η δύναμη του τεστ DNA είναι τέτοια που η εξέταση βιολογικών αντικειμένων μπορεί να προσφέρει πολύ πειστικά στοιχεία. Ωστόσο, πρέπει να ληφθούν υπόψη θέματα ασφάλειας, ρύπανσης και υποβάθμισης.

Τα βιολογικά υλικά μπορούν να ανιχνευθούν με έναν από τους ακόλουθους τρόπους: οπτική εξέταση, εναλλακτική πηγή φωτός, χημικά ενισχυτικά όπως η λουμινόλη. Οι ερευνητές συλλέγουν αντικείμενα που μπορεί να έχουν αγγίξει ή φορεθεί από όσους εμπλέκονται στο έγκλημα. Τα ακόλουθα στοιχεία που ενδέχεται να περιέχουν υλικό DNA είναι οι μάσκες, τα καπέλα, τα γάντια, ρούχα, διάφορα εργαλεία, όπλα, εσώρουχα, φλιτζάνια/μπουκάλια, τσιγάρα, οδοντογλυφίδες, οδοντόβουρτσες, χαρτομάντιλα, βούρτσες μαλλιών, γυαλιά, προφυλακτικά, ταινίες, σχοινιά, σύρματα, κορδόνια, γραμματόσημα ή και φάκελοι. Για παράδειγμα, εάν ένα άτομο αγγίξει ένα αντικείμενο, τα κύτταρα που έχει το δέρμα μπορεί να αποτυπωθούν σ' αυτό. Μπορεί επίσης να συλλεχθεί από το δέρμα και τους μώλωπες του θύματος. Τα δείγματα DNA είναι χρήσιμα όταν αναζητούνται στοιχεία που είναι δύσκολο να βρεθούν με δακτυλικά αποτυπώματα, όπως η ανάγλυφη επιφάνεια της λαβής του όπλου.⁽¹⁰⁾

Τα δείγματα DNA που αποστέλλονται στο εργαστήριο περνούν από την παρακάτω διαδικασία.

1. Εκχύλιση του DNA.
2. Ποσοτικοποίηση του DNA.
3. Ενίσχυση του DNA.
4. Διαχωρισμός των ενισχυμένων προϊόντων DNA για μετέπειτα ταυτοποίηση.
5. Ποσοτική και ποιοτική σύγκριση του δείγματος DNA με γνωστά προφίλ DNA.

6. Διαδικασία ελέγχου της τεχνικής που χρησιμοποιήθηκε και δημιουργία αναφοράς.



Εικόνα 1: Διαδικασία ανάλυσης δείγματος DNA.⁽¹⁰⁾

2.3.1 Αίμα

Το ανθρώπινο αίμα αποτελείται από το πλάσμα και τα κύτταρά του, όπως τα ερυθρά αιμοσφαίρια. Αυτά που είναι χωρίς πυρήνα είναι τα ώριμα ερυθρά αιμοσφαίρια και μεταφέρουν οξυγόνο στους ιστούς με τη βοήθεια της αιμοσφαιρίνης. Μία άλλη κατηγορία είναι τα λευκά αιμοσφαίρια, που είναι τα θεμελιώδη κύτταρα για το ανοσοποιητικό σύστημα. Τα τελευταία έχουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον στο τομέα της εγκληματολογίας λόγω της ύπαρξης του πυρήνα σε αυτά, και έτσι γίνεται δυνατή η απομόνωση DNA. Υπάρχουν πολλές τεχνικές για την ύπαρξη ή μη αίματος στη σκηνή του εγκλήματος. Αναλυτικότερα, η ύπαρξη της αίμης στο μόριο της αιμοσφαιρίνης χρησιμοποιείται με τη χρωματική δοκιμασία της φαινολοφθαλεΐνης. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην ιδιότητα της αίμης να αλλάζει χρώμα παρουσία του διαλύματος Kastle-Mayer και H_2O_2 . Το διάλυμα Kastle-Mayer μπορεί να συνδυαστεί με τη δοκιμασία τετραμέθυλο-βενζιδίνης (TMB) και με το τεστ πράσινο του λευκομαλαχίτη δίνοντας ικανοποιητικά αποτελέσματα.^{(15), (16), (18)}

Η τεχνική της λουμινόλης εφαρμόζεται για την ανίχνευση κηλίδων αίματος. Η λουμινόλη σαν χημική ένωση με Συντακτικό Τύπο: $C_8H_7N_3O_2$ λάμπει όταν αναμειγνύεται με ένα κατάλληλο οξειδωτικό μέσο, όπως είναι ο σίδηρος που έχει η αίμη. Στη σκηνή του εγκλήματος, οι εγκληματολόγοι ψεκάζουν τις επιφάνειες και μετά από λίγο χρονικό διάστημα και υπό υπεριώδη ακτινοβολία εμφανίζεται ένα μπλε στίγμα. Αυτό δηλώνει την παρουσία αίματος. Η μέθοδος δεν εμφανίζει ιδιαίτερη ειδικότητα, καθώς δεν μπορούμε να ταυτοποιήσουμε πλήρως το δείγμα. Επίσης, με τη πάροδο του χρόνου τα ίχνη σβήνονται γι' αυτό πρέπει να αποτυπώνονται στο φωτογραφικό φακό έγκαιρα οι κηλίδες αίματος.⁽¹⁵⁻¹⁶⁾

Επιπρόσθετα, μία ακόμη δοκιμασία ανίχνευσης του αίματος είναι το τεστ piramidon. Αυτή περιλαμβάνει τη αντίδραση του δείγματος σε μικρή ποσότητα (3 σταγόνες) με το αντιδραστήριο piramidon (αμινοφαιναζόνη) μαζί με CH_3COOH και H_2O_2 . Η ταυτοποίηση της παρουσίας αίματος γίνεται με αλλαγή χρώματος (μωβ). Τέλος, μία από τις πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος είναι το Adler ή βενζιδίνης. Η ομάδα αίμης της αιμοσφαιρίνης παρουσιάζει ενζυμική δραστηριότητα και μπορεί να καταλύσει τη διάσπαση του H_2O_2 . Ακόμη, η αντίδραση με τη βενζιδίνη θα την οξειδώσει κάνοντας μία χημική ένωση με έντονο μπλε χρώμα, όπου τη χρησιμοποιούν σαν δοκιμή ταυτοποίησης αίματος. Το τεστ αυτό παρουσιάζει μεγάλη ευαισθησία και ένα αρνητικό αποτέλεσμα αποκλείει τη παρουσία αίματος ενώ ένα θετικό χρειάζεται επιβεβαίωση με άλλες τεχνικές. ⁽¹⁶⁻¹⁷⁾

2.3.2 Σάλιο

Το σάλιο είναι ένα σύνθετο βιολογικό υγρό που εκκρίνεται από τα κύτταρα της κυψελίδας των κύριων και ελάσσονων σιελογόνων αδένων. Είναι δείκτης διαφόρων συστατικών του πλάσματος. Τα τελευταία χρόνια, ο ρόλος του ως διαγνωστικού και εγκληματολογικού εργαλείου ερευνάται και αξιολογείται όλο και περισσότερο. Εκτός από τη διατήρηση της ομοιόστασης των στοματικών δομών όπως η ακεραιότητα των δοντιών, διαδραματίζει επίσης κρίσιμο ρόλο στη γονιδιωματική, στη μεταβολομική και στη βιοπληροφορική. Είναι ένα σημαντικό στοιχείο διάκρισης στην ιατροδικαστική βιολογία, ενεργώντας ως δείκτης των καταστάσεων των σιελογόνων αδένων και της τοξικολογικής παρακολούθησης και της παρακολούθησης φαρμάκων. ⁽²¹⁻²²⁾

Οι δοκιμές που χρησιμοποιούνται για την ταυτοποίηση του σάλιου είναι δύο τύπων. Η πρώτη δοκιμή μπορεί να καθορίσει την πιθανότητα ύπαρξης συγκεκριμένου σωματικού ιστού ή υγρού, ενώ η επιβεβαιωτική δοκιμή μπορεί να προσδιορίσει ένα συγκεκριμένο βιολογικό υλικό. Η α-αμυλάση είναι ένα συστατικό του σάλιου. Ο φυσιολογικός του ρόλος είναι στην πέψη του αμύλου. Υπάρχει σε δύο ενζυμικές μορφές - σιελογόνο και παγκρεατικό. Με τη βοήθεια του kit RSID οι εγκληματολόγοι μπορούν να προσδιορίσουν ταχέως την ύπαρξη ή μη σάλιου. Η τεχνική αυτή δεν έχει ιδιαίτερη ευαισθησία και το δείγμα καταστρέφεται και δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί εκ νέου. Αντίθετα, η φασματομετρία μάζας (*Mass Spectrophotometry, MS*) είναι μία μέθοδος με μεγάλη ευαισθησία και ειδικότητα και μπορεί να ταυτοποιήσει δείγματα διαφορετικής προέλευσης χωρίς να καταστρέψει το DNA. ⁽²¹⁻²²⁾

Άλλες τεχνικές που χρησιμοποιούνται για την ταυτοποίηση του σάλιου και συνεπώς του γενετικού υλικού είναι η Real Time PCR (Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου). Ακόμη, η αμελογενίνη είναι μια πρωτεΐνη του σμάλτου που περιλαμβάνει το 90% των πρωτεϊνών του σμάλτου των δοντιών. Χρησιμοποιώντας εκκινητές ειδικούς για το ιντρόνιο 1 του γονιδίου της αμελογενίνης, τα χρωμοσώματα X και Y δίνουν ένα προϊόν ενίσχυσης 106 bp και ένα αμπλικόνιο 112 bp, αντίστοιχα. Επομένως, δείγματα σάλιου από αρσενικά (XY) εμφανίζουν δύο ζώνες ενώ τα θηλυκά δείγματα (XX) δείχνουν μόνο μία ζώνη. Αυτές οι διαφορές στην έκφραση του γονιδίου της αμελογενίνης επιτρέπουν τη διαφοροποίηση του φύλου. ⁽²²⁾

2.3.3 Οστά

Όταν βρεθούν οστά ή θραύσματα στο τόπο του εγκλήματος, αυτά αποτελούν σοβαρά στοιχεία για τη διερεύνηση της αιτίας θανάτου, τον τρόπο ζωής του θύματος. Οι εγκληματολόγοι προσπαθούν μέσω του μοριακού ελέγχου να προσδιορίσουν το προφίλ του ατόμου (κοινωνικό και βιολογικό), στον οποίο ανήκουν τα οστά. Η απομόνωση του DNA είναι δύσκολη καθώς στις περισσότερες περιπτώσεις τα οστά έχουν εκτεθεί στο περιβάλλον. Στη περίπτωση που έχουν καεί, δεν μπορεί να γίνει η ταυτοποίηση μέσω του DNA. ⁽²³⁻²⁴⁾

Υπάρχουν πολλές τεχνικές για να προσδιορίσουμε την ηλικία των οστών. Τα σχετικά πρόσφατα οστά φθορίζουν κάτω από υπεριώδες φως, ενώ τα οστά που είναι μεγαλύτερα των 100 χρόνων δεν φθορίζουν. Άλλες τεχνικές για να διαπιστωθεί η παλαιότητα των οστών είναι η μέτρηση του αζώτου. Τα πρόσφατα κόκκαλα περιέχουν έως και το 4% του βάρους σε άζωτο (N). Σε αντίθεση, το φθόριο (F) και το ουράνιο (U) δεν υπάρχουν στα ανθρώπινα οστά, απαντώνται στη φύση και συνεπώς μπορούν να βρεθούν τα οστά. Η συγκέντρωσή τους στα κόκκαλα είναι ανάλογη με το χρόνο τον οποίο τα κόκκαλα αυτά βρίσκονται στη συγκεκριμένο περιβάλλον και έτσι μπορούμε να έχουμε μια εκτίμηση του χρόνου θανάτου. Επιπλέον, για τα παλιά οστά χρησιμοποιείται ο C₁₄. Αν γνωρίζουμε την αρχική συγκέντρωσή του σ' ένα δείγμα είναι εύκολο να βρούμε την ηλικία του. ⁽²³⁻²⁴⁾

2.3.4 Τρίχες

Οι ερευνητές εντοπίζουν τρίχες στη σκηνή του εγκλήματος και μέσα από την ανάλυση του DNA γίνεται η αξιολόγησή τους. Οι εγκληματολόγοι θα εξετάσουν τη δομή και τα χαρακτηριστικά μιας τρίχας, τα οποία είναι η μυελώδης ουσία, η φλοιώδης ουσία και το περιτόχιο. Αφού μελετηθούν τα παραπάνω θα δώσει πληροφορίες για τη φυλή, το μέρος

τους σώματος, τη ζωική ή τη ανθρώπινη προέλευση και το σημαντικότερο οποιαδήποτε ουσία έχει χορηγηθεί μεταφέρεται στο σώμα μέσω του αίματος και συνεπώς και στα μαλλιά (π.χ. ναρκωτικές ουσίες, δηλητήρια). Χρησιμοποιούνται διάφορες τεχνικές για την ανάλυση των τριχών. Η ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (*Scanning Electron Microscopy, SEM*) είναι το πιο ευρέως χρησιμοποιούμενο εργαλείο για την ανάλυση των τριχών.⁽¹⁹⁾

Μία επιπλέον μέθοδος που χρησιμοποιείται για τη εξέταση των τριχών που βρέθηκαν στη σκηνή του εγκλήματος είναι η *Matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI)*. Η πειραματική διαδικασία περιλαμβάνει την ανάμειξη κατάλληλου υλικού μήτρας και την εφαρμογή του σε κατάλληλη πλάκα. Εκεί με τη βοήθεια ενός παλμικού λέιζερ το δείγμα ακτινοβολείται, προκαλώντας έτσι αφαίρεση και εκρόφηση αυτού και του υλικού της μήτρας. Στο τέλος ο ιοντισμός των μορίων της αναλυτέας ουσίας προκαλεί πρωτονίωση ή αποπρωτονίωση και στη συνέχεια, με τη βοήθεια του φασματομέτρου μάζας μπορεί να ταυτοποιηθεί.⁽²⁰⁾

Η αξιολόγηση των τριχών που βρίσκονται στη σκηνή του εγκλήματος μέσα από την ανάλυση είναι αναγκαία και ειδικά σε περιπτώσεις θυμάτων σεξουαλικής κακοποίησης που μπορεί να υπάρξουν πάνω στο σώμα τους ή στα ρούχα τους τρίχες του δράστη, όπως και σε περίπτωση διαμάχης. Η αρχική εξέταση που πραγματοποιείται είναι να τοποθετηθούν δείγμα των τριχών σε αντικειμενοφόρο πλάκα και να γίνει η προσθήκη μιας σταγόνας κεδρέλαιου, όπου στο μικροσκόπιο φαίνονται όλα τα χαρακτηριστικά της δομής και του μήκους της τρίχας. Είναι να σημαντικό να επισημανθεί ότι από τις τρίχες μπορούμε να διαπιστώσουμε εάν σε ένα άτομο έχει χορηγηθεί το χάπι του βιασμού, το Flunitrazepam. Αυτή η ουσία ανήκει στην κατηγορία των βενζοδιαζεπινών και χρησιμοποιείται κλινικά ως αναισθητικό στο χειρουργείο. Η υδρόλυση αυτών δίνει βενζοφαινόνες, οι οποίες μπορούν να ταυτοποιηθούν με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC). Μία ακόμη μέθοδος ταυτοποίησης που εφαρμόζεται στο πεδίο είναι η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) συζευγμένη με φασματομετρία μάζας (MS) καθώς και η φασματοσκοπία υπερύθρου (IR).^{(25), (28)}

2.3.5 Ρούχα

Οι ίνες ρούχων είναι πολύ σημαντικές στη σκηνή του εγκλήματος. Οι επιστήμονες συλλέγουν τις ίνες για να προσδιορίσουν τη φύση του αντικειμένου. Οι ίνες των ρούχων μπορούν να εξεταστούν για ποσότητες σωματικού υγρού (αίμα, σπέρμα, σάλιο). Συγκεντρώνονται με λαβίδες ή απλές κολλητικές ταινίες και εξετάζονται με μικροσκόπιο ή

με φασματόμετρο. Οι παράγοντες που λαμβάνονται υπόψη κατά την ανάλυση των ινών των ρούχων είναι ο αριθμός, ο τύπος και το χρώμα. Οι ίνες κατασκευάζονται από μακριά νήματα που ποικίλλουν σε ομοιομορφία ανάλογα με τον τρόπο κατασκευής τους. Υπάρχουν τρεις κατηγορίες ινών. Αυτές είναι οι συνθετικές, οι φυσικές και οι βιομηχανοποιημένες. Παραδείγματα συνθετικών ινών περιλαμβάνουν το νάilon, τον πολυεστέρα και το ακρυλικό ενώ το μετάξι αράχνης, το μαλλί προβάτου και το βαμβάκι ανήκουν στη κατηγορία των φυσικών ινών. Οι βιομηχανοποιημένες ίνες παράγονται από αναγεννημένη κυτταρίνη. Η συγκεκριμένη είναι μια ένωση που συνθέτει τα κυτταρικά τοιχώματα των φυτικών κυττάρων και δίνει στα φυτά την άκαμπτη δομή τους. ⁽²⁶⁻²⁷⁾

Οι τεχνικές που χρησιμοποιούνται για τη ταυτοποίηση των ινών είναι φασματοσκοπία υπερύθρου, φασματοσκοπία ορατού – υπεριώδους και η μικροσκοπία πολωμένου φωτός. Το UV-Vis είναι μια μέθοδος που χρησιμοποιείται για την ανάλυση μικρών χρωματικών διαφορών στα υφάσματα. Ένα δείγμα υλικού μπλε τζιν από διαφορετικούς κατασκευαστές μπορεί να έχει διαφορές που δεν είναι ορατές με το μάτι. Το UV-Vis χρησιμοποιεί το φως στην περιοχή υπεριώδους-ορατού για να αναλύσει τις λεπτές διαφορές στη χρωματική διακύμανση. Ακόμη, η μικροσκοπία πολωμένου φωτός χρησιμοποιείται για τη σύγκριση του χρώματος και των τρισδιάστατων δομών μιας ουσίας (σχήμα, πάχος). Αυτή η μέθοδος χρησιμοποιεί φίλτρα πόλωσης για να αλλάξει τον τρόπο με τον οποίο ανακλάται το φως. Χωρίς πολωτικό φίλτρο, μπορούν να παρατηρηθούν μόνο τα δομικά χαρακτηριστικά, όπως το μέγεθος και το σχήμα. Καθώς χρησιμοποιούνται διαφορετικές διαμορφώσεις φακών, μπορούν να γίνουν διάφορες οπτικές ιδιότητες και μελέτες χρώματος. Τέλος, η φασματοσκοπία υπερύθρου αναλύει τον τρόπο με τον οποίο το υπέρυθρο φως αλληλεπιδρά με τα μόρια. Στη συγκεκριμένη τεχνική, η υπέρυθρη ακτινοβολία μεταδίδεται μέσω ενός δείγματος. Μέρος της υπέρυθρης ακτινοβολίας απορροφάται από το δείγμα και μέρος της υπέρυθρης ακτινοβολίας μεταδίδεται μέσω του δείγματος. Η μετάδοση της ακτινοβολίας είναι μοναδική, δίνοντας σε κάθε ουσία ένα «δακτυλικό αποτύπωμα», το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον εντοπισμό άγνωστων ουσιών. ⁽²⁶⁻²⁷⁾

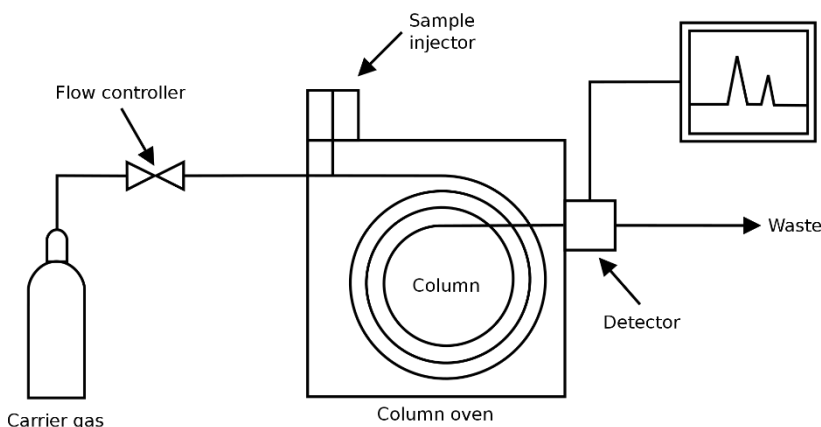
3. Αναλυτικές εργαστηριακές τεχνικές

Πολλές αναλυτικές τεχνικές χρησιμοποιούνται από τους εγκληματολόγους. Μερικές από αυτές είναι η υγρή και αέρια χρωματογραφία, η φασματομετρία μάζας, η φασματοσκοπία υπερύθρου. Με σύμμαχο αυτές τις τεχνικές αλλά και την εμπειρία των ειδικών μπορούν να λυθούν όλες οι εγκληματικές πράξεις χωρίς καμία αμφισβήτηση.

3.1 Χρωματογραφία

3.1.1 Αέρια Χρωματογραφία

Η αέρια χρωματογραφία (*Gas Chromatography, GC*) είναι από τις πιο διαδεδομένες αναλυτικές τεχνικές. Η αρχή της μεθόδου είναι ένα αέριο ή υγρό μείγμα εκχύνεται μέσα στην κινητή φάση, η οποία είναι συνήθως ένα αδρανές αέριο, και στη συνέχεια περνάει από τη στατική φάση, η οποία μπορεί να είναι είτε υγρή είτε στερεή. Η στατική φάση περιέχεται μέσα από μία τριχοειδή στήλη. Η στήλη της GC περικλείεται μέσα σε φούρνο ελεγχόμενης θερμοκρασίας. Καθώς τα δείγματα εξέρχονται από το τέλος της στήλης, ανιχνεύονται και ταυτοποιούνται (Εικόνα 2).⁽¹¹⁾



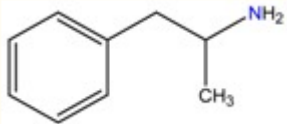
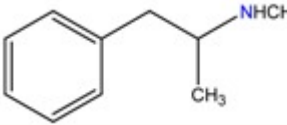
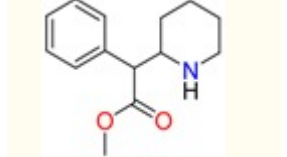
Εικόνα 2: Σχηματική απεικόνιση αέριου χρωματογράφου.⁽¹¹⁾

Η αέρια χρωματογραφία έχει μεγάλη ευαισθησία. Στην τεχνική αυτή χρησιμοποιούνται διάφοροι ανιχνευτές. Οι πιο χρησιμοποιούμενοι είναι ο ανιχνευτής ιονισμού φλόγας (FID) και ο φασματογράφος μάζας. Ο τελευταίος εξαιρετικά αποτελεσματικός και ευαίσθητος, ακόμη και σε μικρή ποσότητα δείγματος. Εφαρμόζεται σε πολλούς τομείς αλλά και στην εγκληματολογία.⁽¹¹⁾

Η αέρια χρωματογραφία σε συνδυασμό με τη φασματομετρία μάζας (GS – MS) μπορούν να συμβάλλουν στην ανίχνευση ναρκωτικών ουσιών, διερεύνηση εμπρησμού. Επίσης μπορεί να χρησιμοποιηθεί και στο αεροδρόμιο για την ταυτοποίηση δειγμάτων (σκόνες) μέσα στις βαλίτσες των ταξιδιωτών. Η μέθοδος αυτή μπορεί να αντικαταστήσει τον σκύλο για την εύρεση ναρκωτικών ή εμπρηστικών υλικών με μεγάλη ευαισθησία και ειδικότητα. Επιπρόσθετα, η GC – MS χρησιμοποιείται και στην ιατροδικαστική τοξικολογία για την εύρεση φαρμάκων ή/και δηλητηρίων σε βιολογικά δείγματα υπόπτων, θυμάτων ή θανόντων. Κατά τη διαδικασία ελέγχου για φάρμακα, στη μέθοδο GC – MS εφαρμόζεται συνήθως η εκχύλιση υγρού-υγρού ως μέρος της προετοιμασίας του δείγματος, στην οποία οι ενώσεις που θέλουμε να ταυτοποιήσουμε εξάγονται από το πλάσμα του αίματος. ⁽¹¹⁻¹⁴⁾

Μία ακόμη εφαρμογή της μεθόδου αυτής είναι η ανάλυση των τροφίμων και των ποτών που βρίσκονται στις σκηνές του εγκλήματος. Αυτά περιέχουν πολυάριθμες οργανικές ενώσεις, όπως είναι οι εστέρες, τα λιπαρά οξέα, οι αλκοόλες κ.λπ. Χρησιμοποιείται ακόμη για την ανίχνευση και τη μέτρηση ρύπων από αλλοίωση ή νοθεία που μπορεί να είναι επιβλαβείς και που συχνά ελέγχονται και από κυβερνητικούς οργανισμούς, παραδείγματος χάριν τα φυτοφάρμακα και συγκεκριμένα η μεταλλιδεΐδη. Αξίζει να ειπωθεί ότι η μέθοδος GC – MS μπορεί να ανιχνεύσει τις παράνομες ναρκωτικές ουσίες αλλά και τα παράγωγά αυτών. Στον πίνακα 1 θα παρουσιαστούν μερικά παραδείγματα ναρκωτικών ουσιών. ⁽¹¹⁻¹⁴⁾

Πίνακας 1: Μερικά παραδείγματα παράνομων ναρκωτικών ουσιών και η μοριακή τους δομή. ⁽¹³⁾

Παράνομη ναρκωτική ουσία	Μοριακή δομή
Αμφεταμίνη (AM)	
Μεταμφεταμίνη (MA)	
Μεθυλφαινιδάτη (MPH)	

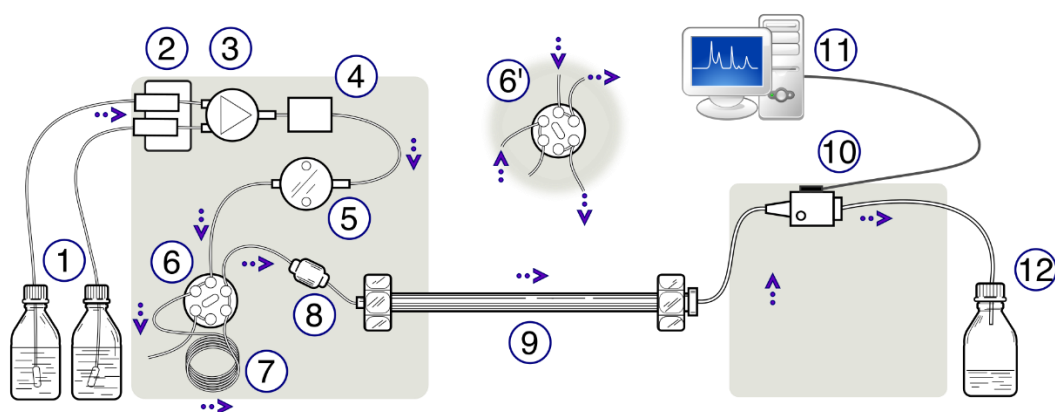
Ψευδοεφεδρίνη	
---------------	--

3.1.2 Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης

Η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (*High-Performance Liquid Chromatography, HPLC*) είναι παρόμοια με την αέρια χρωματογραφία. Μερικά μικρόλιτρα από το μείγμα εισάγεται στο ρεύμα της κινητής φάσης που διηθείται μέσω της στήλης. Τα συστατικά του δείγματος κινούνται μέσω της στήλης με διαφορετικές ταχύτητες, λόγω διαφορετικών αλληλεπιδράσεων με τη στατική φάση. Η ταχύτητα κάθε συστατικού εξαρτάται από τις φυσικοχημικές ιδιότητες της ουσίας, από τη φύση της στατικής φάσης και από τη σύνθεση της κινητής φάσης. Ο χρόνος κατά τον οποίο μια συγκεκριμένη αναλυόμενη ουσία εκλύεται ονομάζεται χρόνος κατακράτησης της (t_R). Ο χρόνος κατακράτησης που μετράται υπό συγκεκριμένες συνθήκες είναι ένα αναγνωριστικό χαρακτηριστικό μιας δεδομένης αναλυόμενης ουσίας.⁽¹¹⁾

Υπάρχουν κάποιοι παράμετροι που επηρεάζουν το τρόπο έκλουσης. Πιο συγκεκριμένα, η ισοκρατική έκλουση ορίζεται όταν η σύνθεση της κινητής φάσης παραμένει σταθερή καθ' όλη τη διάρκεια, ενώ βαθμιδωτή έκλουση όταν δεν παραμένει σταθερή. Στην ισοκρατική έκλουση, το πλάτος της κορυφής αυξάνεται με το χρόνο κατακράτησης. Αυτό μπορεί να αποτελέσει μειονέκτημα κατά την ανάλυση ενός άγνωστου δείγματος. Όταν η κινητή φάση δεν είναι ισχυρή, ο χρόνος κατακράτησης επιμηκώνεται και έχει ως αποτέλεσμα οι κορυφές να είναι ευρείες, οδηγώντας σε μειωμένη ευαισθησία. Στην βαθμιδωτή έκλουση, η σειρά έκλουσης μπορεί να αλλάξει καθώς αλλάζουν οι διαστάσεις της στήλης (μήκος και εσωτερική διάμετρος) ενώ στη πρώτη περίπτωση όχι.⁽¹¹⁾

Η οργανολογία είναι σχετικά απλή. Στην Εικόνα 3 φαίνονται τα μέρη ενός HPLC χρωματογράφου. Ειδικότερα, υπάρχουν τα μπουκάλια με τους διαλύτες και ο απαερωτής τους. Έπειτα, συναντάται η βαλβίδα βαθμίδωσης, το δοχείο ανάμειξης για τη κινητή φάση καθώς και η αντλία υψηλής πίεσης. Σημαντικό εξάρτημα είναι βαλβίδα μεταγωγής που βρίσκεται είτε στη «θέση έγχυσης», είτε στη «θέση φορτίου». Τέλος, υπάρχει ο βρόχος έγχυσης του δείγματος, η αναλυτική στήλη, ο ανιχνευτής και δοχείο αποβλήτων.⁽¹¹⁾



Εικόνα 3: Οργανολογία της HPLC.⁽¹¹⁾

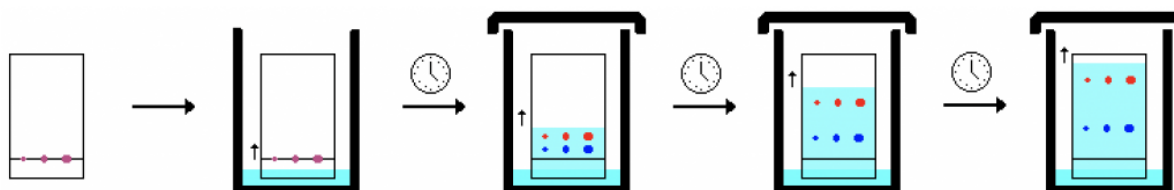
Και αυτή η τεχνική εφαρμόζεται στα εγκληματολογικά εργαστήρια. Η HPLC χρησιμοποιείται κυρίως για την ανάλυση του περιεχομένου των εκρηκτικών καθώς οι διάφορες ουσίες που χρησιμοποιούνται σε αυτά έχουν διαφορετικούς χρόνους κατακράτησης λόγω των διαφορετικών χημικών και φυσικών ιδιοτήτων τους. Η HPLC μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση ορισμένων ναρκωτικών και έχει χρησιμοποιηθεί σε έρευνες για τρομοκρατία, καρτέλ ναρκωτικών, δολοφονίες και συνδικάτα οργανωμένου εγκλήματος.⁽²⁸⁾

3.1.3 Χρωματογραφία Λεπτής Στοιβάδας

Η χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (*Thin-Layer Chromatography, TLC*) περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1938. Έκτοτε, η TLC χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό και την ταυτοποίηση μη πτητικών μειγμάτων. Η χρήση της προσφέρει πολλά πλεονεκτήματα όσον αφορά το κόστος, την ευκολία και την απλότητα. Η μέθοδος εξαρτάται από τη στατική φάση, που είναι ένα πορώδες υλικό, συνήθως silica gel, και τη κινητή φάση, που γενικά αποτελείται από έναν συνδυασμό οργανικών διαλυτών. Ο διαχωρισμός πραγματοποιείται πάνω σε μία πλάκα. Η τεχνική παρουσιάζει υψηλή ευαισθησία.⁽¹¹⁾

Η διαδικασία της TLC (Εικόνα 4) είναι απλή και γρήγορη. Σε ποτήρι ζέσεως τοποθετείται μικρή ποσότητα του διαλύτη. Στη συνέχεια στην πλάκα της TLC βάζουμε μικρές σταγόνες από το δείγμα και έπειτα η πλάκα τοποθετείται μέσα στο ποτήρι ζέσεως για λίγα λεπτά. Με τη πάροδο του χρόνου παρατηρούμε ότι ο διαλύτης φτάνει στη κορυφή της πλάκας. Τα πρωτόκολλα ανάλογα με τι είναι η στατική και η κινητή φάση ποικίλλουν. Ο διαχωρισμός των ενώσεων οφείλεται στην αλληλεπίδρασή τους με τη στατική φάση. Πιο

συγκεκριμένα, η στατική φάση είναι πολική. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα πολικές ενώσεις σε ένα δείγμα να αλληλεπιδρούν περισσότερο με την πολική στατική φάση και να κινούνται λιγότερο ενώ λιγότερες πολικές ενώσεις κινούνται ψηλότερα στην πλάκα. ⁽¹¹⁾



Εικόνα 4: Η διαδικασία της TLC.⁽¹¹⁾

Η TLC είναι μία τεχνική που χρησιμοποιείται και στην εγκληματολογία. Εφαρμόζεται συγκεκριμένα σε δείγματα αίματος, αλλά όχι ούρων. Κάθε ουσία, ανάλογα με τα φυσικοχημικά της χαρακτηριστικά, τρέχει με διαφορετική ταχύτητα στις δύο φάσεις. Αυτή η ταχύτητα είναι μοναδική για κάθε ουσία και αντικατοπτρίζεται στον παράγοντα κατακράτησης (R_F), που ορίζεται ως ο λόγος της απόστασης που διένυσε το δείγμα στη στερεή φάση προς την απόσταση της υγρής φάσης. Το R_F του δείγματος συγκρίνεται με το R_F γνωστού δείγματος για να εξαγάγουμε ένα συμπέρασμα. Για την ταυτοποίηση πολλές φορές χρησιμοποιούνται και φθορίζουσες χρωστικές, οι οποίες υπό το φως της υπεριώδους ακτινοβολίας (UV) φθορίζουν. Η χρήση της μεθόδου έχει περιοριστεί λόγω της εξέλιξης άλλων τεχνικών. ⁽¹¹⁾

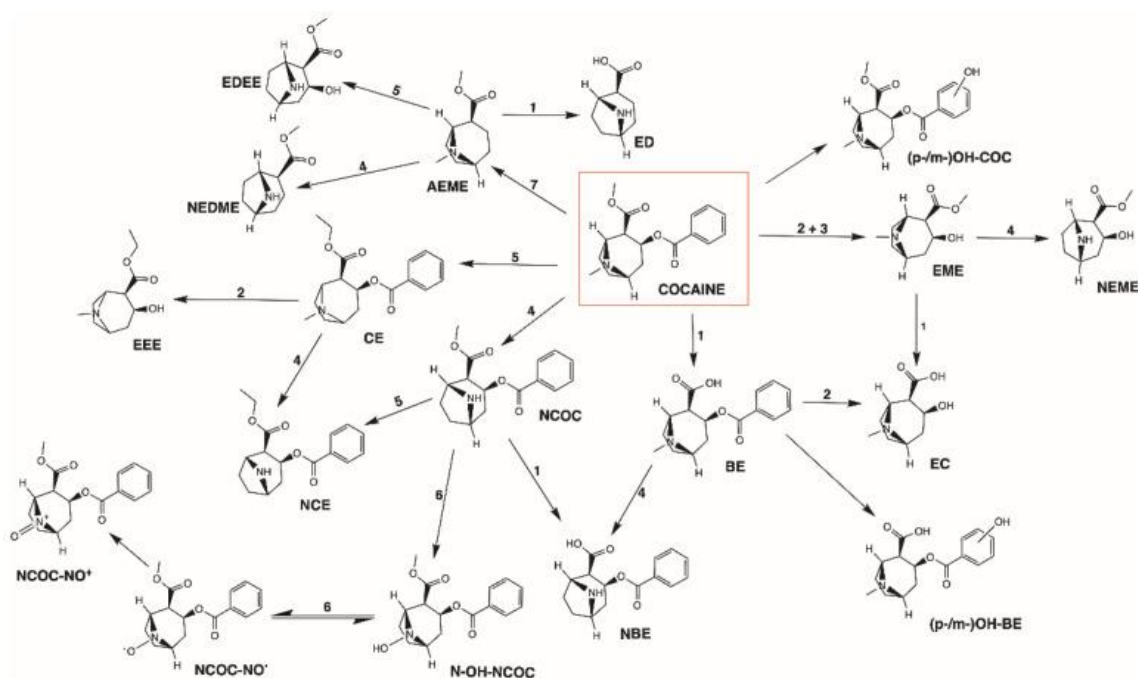
3.1.4 Εφαρμογές των χρωματογραφικών τεχνικών στο πεδίο

Οι χρωματογραφικές μέθοδοι εφαρμόζονται εκτενώς στην εγκληματολογική επιστήμη. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον εντοπισμό πληθώρας χημικών ενώσεων που μπορεί να υπάρχουν σε δείγματα από τρομοκρατικά επεισόδια, υποθέσεις ναρκωτικών, δολοφονίες και ληστείες. Όπως ειπώθηκε και στις προηγούμενες ενότητες υπάρχουν τρεις διαφορετικοί τύποι χρωματογραφίας που εφαρμόζονται στο πεδίο. Αυτοί περιλαμβάνουν τη χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC), και μεθόδους που βασίζονται σε στήλη όπως η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) και η αέρια χρωματογραφία (GC). Παρακάτω θα δούμε αναλυτικώς διάφορες εφαρμογές αυτών των χρωματογραφικών τεχνικών.

3.1.4.1 Ανίχνευση της κοκαΐνης και των μεταβολιτών της σε βιολογικά δείγματα

Η κοκαΐνη κατατάσσεται ως το δεύτερο πιο διαδεδομένο ναρκωτικό παγκοσμίως. Είναι ένα αλκαλοειδές τροπανίου που προέρχεται από το φυτό *Erythroxylon Coca* και χρησιμοποιείται ως διεγερτικό. Η κοκαΐνη μπορεί να βρεθεί συνήθως σε δύο μορφές, την υδροχλωρική κοκαΐνη, μια κρυσταλλική λευκή σκόνη η οποία είναι διαλυτή στο νερό και καταναλώνεται κυρίως μέσω της ενδορρινικής οδούς. Η δεύτερη μορφή της είναι το λεγόμενο «κρακ», που προκύπτει από την αντίδραση υδροχλωρικής κοκαΐνης με αμμώνιο ή μαγειρική σόδα.⁽⁶⁶⁻⁶⁸⁾

Η κοκαΐνη μεταβολίζεται (Εικόνα 5) κυρίως μέσω της υδρόλυσης σε βενζοϋλεκγονίνη (BE) και στον μεθυλεστέρα της εκγονίνης (EME), τα οποία μπορούν να υδrolυθούν περαιτέρω σε εκγονίνη (EC). Η κοκαΐνη μπορεί επίσης να υποβληθεί σε υδροξυλίωση για να δώσει παρα-/μετα-υδροξυκοκαΐνη (p-/m-OH-COC). Μια άλλη δευτερεύουσα μεταβολική αντίδραση είναι η N -απομεθυλίωση της κοκαΐνης σε νορκοκαΐνη (NCOC). Παρουσία αιθανόλης (EtOH), η κοκαΐνη θα υποστεί μετεστεροποίηση και θα σχηματίσει το κοκααιθυλένιο (CE). Άλλοι μεταβολίτες της κοκαΐνης είναι ο μεθυλεστέρας της ανυδροεκγονίνης (AEME), η εκγονιδίνη (ED) και ο αιθυλεστέρας της (EED) και τα παράγωγα της νορκοκαΐνης (NCOC-NO[•], NCOC-NO⁺, N-OH-NCOC).⁽⁶⁶⁻⁶⁸⁾



Εικόνα 5: Οι μεταβολίτες της κοκαΐνης.⁽⁶⁷⁾

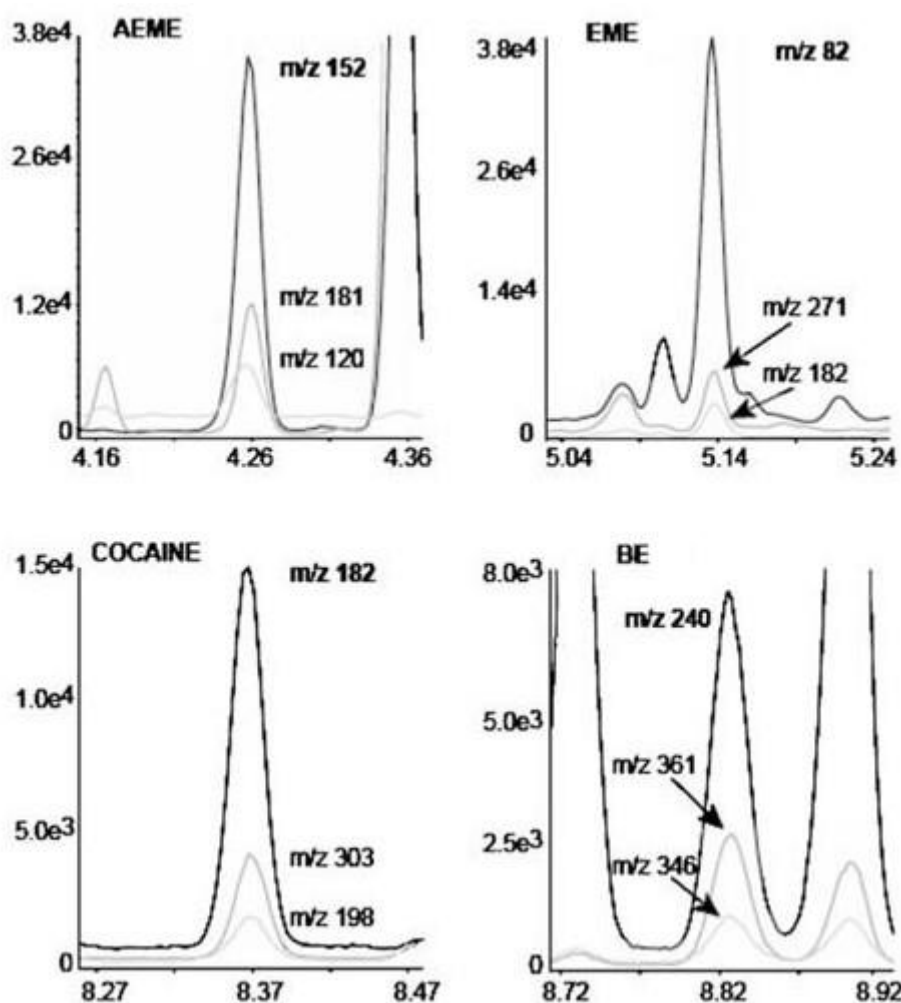
Με τη βοήθεια των χρωματογραφικών μεθόδων η κοκαΐνη και οι μεταβολίτες της μπορούν να ανιχνευτούν ποσοτικά τόσο σε βιολογικές όσο και σε μη βιολογικές μήτρες. Στη παρούσα εργασία θα εστιάσουμε την ανίχνευσή της από δείγματα ούρων, αίματος και μαλλιών.

- Ούρα:

Η πιο χρησιμοποιούμενη μέθοδος ταυτοποίησης της κοκαΐνης και των μεταβολιτών σε δείγματα ούρων είναι η αέρια χρωματογραφία συζευγμένη με φασματομετρία μάζας (GC – MS). Πριν, όμως, από τη ποσοτική ταυτοποίηση πραγματοποιείται ποιοτικός έλεγχος του δείγματος για τη παρουσία ή μη κοκαΐνης και των μεταβολιτών της.

Κατά τη πειραματική διαδικασία ταυτοποίησης μικρή ποσότητα ούρων (~3 mL) ρυθμίζονται σε pH = 5.5 και διέρχονται μέσω στηλών εκχύλισης στερεάς φάσης. Το υδατικό έκλουσμα που περιείχε μη απορροφημένο EC συλλέγεται. Οι υπόλοιπες αναλυόμενες ουσίες (κοκαΐνη, BE, EME, pOHBE, mOHBE και NBE) εκλύονται με ένα μίγμα χλωριούχου μεθυλενίου – μεθανόλης και πυκνό υδροξείδιο αμμωνίου σε αναλογία 9:1:0.2. Το δείγμα χωρίζεται σε δύο μέρη (Α και Β), και εξατμίζεται μέχρι ξηρού. Το μέρος Α χωρίζεται περαιτέρω σε δύο μέρη (1 και 2). 60 μ L ακετόνης προστίθενται στο τμήμα 1 του μέρους Α, το οποίο αναλύεται για παράγωγα κοκαΐνης. 50 μ L διαλύματος διμεθυλοφορμαμίδιου και διμεθυλοφορμαμίδης σε αναλογία 2:1 v/v προστίθενται στο τμήμα 2 του μέρους Α και εγχύνονται στο GC-MS με θερμοκρασία θύρας έγχυσης 280°C για προπυλίωση σε στήλη BE, mOHBE και pOHBE. Επιπλέον, 50 μ L πενταφθοροπροπανόλης (PFPOH) και πενταφθοροπροπιονικού ανυδρίτη (PFPA) προστίθενται στο ξηρό εκχύλισμα από το Μέρος Β και θερμαίνονται στους 50°C για 15 λεπτά. Η περίσσεια του αντιδραστήριου εξατμίζεται μέχρι ξηρού υπό άζωτο σε θερμοκρασία δωματίου και διαλύεται σε 50 μ L ξηρού ακετονιτριλίου για να δώσει παράγωγα πενταφθοροπροπυλίου (PFP) των EME και NBE. Το υδατικό έκλουσμα που περιέχει EC ρυθμίζεται σε pH = 2-3, εκχυλίζεται χρησιμοποιώντας ένα άλλο σύνολο στηλών SPE. Το διάλυμα εκπλένεται με 0.15 M θειικό οξύ και οξικό αιθυλεστέρα, στη συνέχεια το pH γίνεται βασικό με προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος συγκεντρώσεως 1.5 M. Έπειτα, 60 μ L ακετόνης προστίθενται και στη συνέχεια πραγματοποιείται η ανάλυση GC-MS.⁽⁶⁶⁻⁶⁸⁾

Όπως προκύπτει από τα παραπάνω η προετοιμασία του δείγματος πραγματοποιείται μέσω εκχύλισης υγρού-υγρού. Ακόμη, η μέθοδος της αέριας χρωματογραφίας σε συνδυασμό με την φασματομετρία μαζών με παρακολούθηση επιλεγμένων ιόντων (*Selected-Ion Monitoring, SIM*) εκτός του ότι εφαρμόζεται για γενική ανάλυση (*screening*), αλλά ταυτόχρονα και για επιβεβαίωση και ποσοτικοποίηση. Για τη γενική ανάλυση, χρησιμοποιείται το μοριακό ιόν, ενώ για την ταυτοποίησή τους χρειάζονται και τα θραύσματα. Χαρακτηριστικά παραδείγματα m/z (Εικόνα 6) για τη κοκαΐνη είναι 182,198 και 303 ενώ για τους μεταβολίτες της όπως ο ΑΕΜΕ είναι 120,152 και 181. Επιπρόσθετα, 240,346 και 361 m/z για το ΒΕ καθώς και 182, 271 m/z για το ΕΜΕ.⁽⁶⁶⁻⁶⁸⁾



Εικόνα 6: Ποσοτικοποίηση κοκαΐνης και των μεταβολιτών της σε δείγμα ούρων με GC-MS με ιονισμό πρόσκρουσης ηλεκτρονίων και παρακολούθηση επιλεγμένων ιόντων.⁽⁶⁸⁾

- Αίμα:

Σε πολλές περιπτώσεις που έχει διαπραχθεί κάποιο έγκλημα (π.χ. φόνος), οι εγκληματολόγοι συλλέγουν από τη σκηνή του εγκλήματος αίμα. Εκτός από τη ταυτοποίησή του, δηλαδή σε ποιον ανήκει, χρησιμοποιείται για να ελεγχθεί αν το άτομο αυτό έχει καταναλώσει κάποια ναρκωτική ουσία. Για τις περισσότερες αναλύσεις χρησιμοποιείται ορός ή πλάσμα.

Για τη συλλογή του πλάσματος (το υγρό συστατικό του αίματος) χρησιμοποιείται σωληνάριο με αντιπηκτικό και πραγματοποιείται φυγοκέντρωση για περίπου 3 λεπτά. Αφού συλλεχθούν τα διάφορα δείγματα πλάσματος, ακολουθείται μια πλήρως επικυρωμένη διαδικασία που βασίζεται στην εκχύλιση στερεάς φάσης (*Solid-Phase Extraction, SPE*) σε συνδυασμό με την ανάλυση LC-MS/MS. Εν συντομία, η διαδικασία SPE πραγματοποιείται σε μικρές στήλες κυλίνδρων συρίγγων μιας χρήσης, προηγουμένως ενεργοποιημένα με 2×1 mL μεθανόλης και ρυθμισμένα με 2×1 mL υπερκάθολου νερού. Έπειτα, 400 μ L πλάσματος φορτώθηκε στη στήλη, και εκπλένεται διαδοχικά με 2×1 mL υπερκάθολου νερού και 1 mL μείγματος νερού/μεθανόλης (90:10). Οι αναλυόμενες ουσίες στη συνέχεια εκκλούνται με 1 mL καθαρής μεθανόλης, ξηραίνονται υπό κενό. Τέλος, επαναδιαλύονται με 100 μ L μίγματος νερού/ακετονιτριλίου (50:50) που περιέχει 0,5% μυρμηκικό οξύ (FA) και εγχύνονται στο σύστημα LC-MS/MS. Η ανάλυση της μάζας των αναλυτών πραγματοποιείται με δύο φασματομέτρα στη σειρά, τα οποία αποτελούνται από παγίδες ιόντων. Για την ανίχνευση της κοκαΐνης και των μεταβολιτών της, εφαρμόζεται η λειτουργία επιλεγμένου ιόντος (SIM) στο πρώτο και πλήρης σάρωση στο δεύτερο φασματομέτρο.^{(11),(67),(69),(70)}

Τα τελευταία χρόνια στο πεδίο εφαρμόζονται και νέες τεχνικές που σκοπό έχουν να σταματούν τις περισσότερες διαδικασίες αποδόμησης και μεταβολισμού, αυξάνοντας έτσι τη σταθερότητα της αναλυόμενης ουσίας και επιτρέποντας την αποθήκευση σε θερμοκρασία δωματίου (RT) για μεγάλες χρονικές περιόδους. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η μέθοδος, βασισμένη σε ογκομετρική απορροφητική μικροδειγματοληψία αίματος ή πλάσματος (*volumetric absorptive microsampling, VAMS*) που ακολουθείται από εξαγωγή με υπερήχους (*ultrasound-assisted extraction, HAE*) και ανάλυση LC-MS/MS. Η μέθοδος VAMS χρησιμοποιεί μια καινοτόμο συσκευή μικροδειγματοληψίας, που αποτελείται από μια σκληρή πλαστική λαβή εξοπλισμένη με αποσπώμενο άκρο κατασκευασμένο από

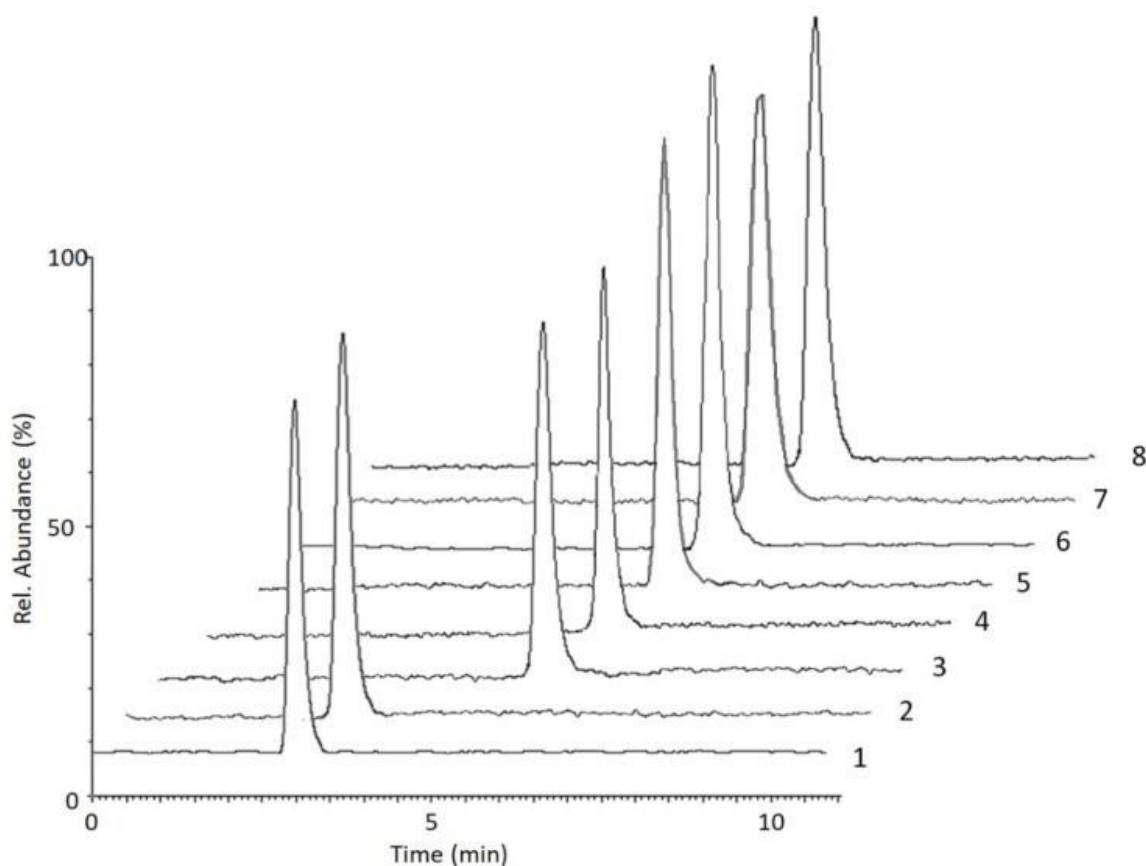
ιδιόκτητο, πορώδες πολυμερές υλικό. Το άκρο είναι ικανό να απορροφά σταθερό όγκο δείγματος υγρού (μερικά μL), ανάλογα με το μέγεθός του και ανεξάρτητα από την πυκνότητα ή το ιξώδες του δείγματος. Μετά την απορρόφηση, το δείγμα αφήνεται να στεγνώσει και στη συνέχεια είναι έτοιμο για αποθήκευση, αποστολή ή άμεση εκχύλιση και ανάλυση.^{(69),(70)}

Η χρήση αποξηραμένων μικροδειγμάτων σταθερού όγκου προσφέρει αρκετά πλεονεκτήματα σε σχέση με τα παραδοσιακά βιοδείγματα μεγάλου όγκου. Το μικρό αποξηραμένο δείγμα μπορεί να τοποθετηθεί σε πολύ μικρούς αποθηκευτικούς χώρους και να αποσταλεί με ασφάλεια στα εργαστήρια. Επίσης, μειώνει την κατανάλωση διαλυτών και επομένως είναι φθηνότερο. Η χρήση της μεθόδου VAMS ειδικότερα έχει σχεδιαστεί για να αυτοματοποιείται εύκολα και να λαμβάνει ακριβείς όγκους αίματος χωρίς να επηρεάζεται το αποτέλεσμα λόγω μεταβλητών τιμών του αιματοκρίτη σε διάφορα δείγματα, κάτι που αποτελεί σημαντικό μειονέκτημα άλλων τεχνικών μικροδειγματοληψίας, όπως οι ξηρές κηλίδες αίματος (*Dried blood spot, DBS*). Δεδομένου ότι η μέθοδος VAMS αναπτύχθηκε ειδικά για εφαρμογή σε πλήρες αίμα, η ακρίβεια όγκου παρέχεται μόνο για αυτήν τη μήτρα.^{(67), (69), (70)}

Η πειραματική διαδικασία που ακολουθείται είναι ότι μετά από τη δειγματοληψία και την ξήρανση, οι αναλυόμενες ουσίες εκχυλίζονται από τα άκρα VAMS με εκχύλιση με διαλύτη. Μετά την εκχύλιση, το διάλυμα υποβάλλεται σε επεξεργασία ως τέτοιο με εκχύλιση με διασπορά πιπέτας (*dispersive pipette extraction, DPX*). Η DPX είναι μια ισχυρή αλλά απλή τεχνική προεπεξεργασίας δείγματος. Χρησιμοποιεί πολύ μικρές ποσότητες χρωματογραφικού ροφητή, που περιέχεται χαλαρά σε ένα αυτόματο άκρο πιπέτας, με διαδικασίες παρόμοιες με εκείνες της εκχύλισης στερεάς φάσης διασποράς (*dSPE*). Ωστόσο, η DPX έχει πολλά πλεονεκτήματα σε σχέση με τη dSPE. Χρειάζεται ελάχιστες ποσότητες ροφητή, διαλυτών και δείγματος. Ακόμη, τα βήματα προετοιμασίας και πλύσης είναι συχνά περιττά, καθιστώντας τη διαδικασία πιο πρακτική και αναπαραγώγιμη. Γρήγορες, βέλτιστες αλληλεπιδράσεις μεταξύ αναλυόμενης ουσίας και ροφητή εξασφαλίζονται με τυρβώδη ανάμιξη, που επιτυγχάνεται με την έλξη αέρα στο άκρο της πιπέτας που περιέχει το δείγμα και το χαλαρό προσροφητικό υλικό. Μετά την έκλουση, το δείγμα εκχύνεται χωρίς περαιτέρω επεξεργασία σύστημα LC-MS/MS.^{(67), (69), (70)}

Το χρωματογράφημα ενός τυφλού δείγματος ολικού αίματος, που επεξεργάστηκε με τη μέθοδο VAMS απεικονίζεται στην Εικόνα 7. Όπως μπορεί κανείς να δει, κάτω από αυτές τις συνθήκες εργασίας καμία ενδογενής ένωση δεν παρεμβαίνει στον προσδιορισμό.

Οι κορυφές της αναλυόμενης ουσίας διαχωρίζονται πλήρως εντός 10 λεπτών και είναι ικανοποιητικά συμμετρικές. Η κορυφή 1 αντιστοιχεί στο μεταβολίτη EME, η κορυφή 2 στο NEME. Ακόμη οι κορυφές 3 και 4 αντιστοιχούν στους μεταβολίτες BE και NBE αντίστοιχα. Η κορυφή 5 αντιστοιχεί 5 στην κοκαΐνη ενώ η κορυφή 6 στο μεταβολίτη της NCOC. Τέλος οι κορυφές 7 και 8 αντιστοιχούν στους μεταβολίτες CE και NCE.^{(67), (69)}



Εικόνα 7: Χρωματογράφημα ενός τυφλού δείγματος ολικού αίματος με τη μέθοδο VAMS.⁽⁶⁹⁾

- Τρίχες:

Τα τελευταία χρόνια, οι τρίχες έχουν γίνει ένα εναλλακτικό βιολογικό δείγμα για δοκιμές φαρμάκων στους τομείς της ιατροδικαστικής και κλινικής τοξικολογίας. Σε αντίθεση με τη δοκιμή φαρμάκων σε συμβατικές μήτρες, η δοκιμή των μαλλιών μπορεί να παρέχει δεδομένα για τη μακροχρόνια έκθεση σε φάρμακα. Το τυπικό δείγμα μαλλιών (3,0 cm κομμένο κοντά στο τριχωτό της κεφαλής) προσδιορίζει τη χρήση ναρκωτικών έως και τρεις μήνες πριν, ενώ οι τρίχες του σώματος μπορεί να υποχωρήσουν ακόμη περισσότερο, σε αντίθεση με την ανάλυση ούρων, η οποία συνήθως ανιχνεύει τη χρήση ναρκωτικών από τις τελευταίες 48 έως 72 ώρες. Ακόμη, η τμηματική ανάλυση τρίχας μπορεί να αποκαλύψει

από μήνα σε μήνα (λαμβάνοντας υπόψη περικοπές τμήματος 1 cm) ενδεχόμενες επαναλαμβανόμενες χρόνιες εκθέσεις και, σε ορισμένες περιπτώσεις, να εντοπίσει πρότυπα χρήσης/χορήγησης ναρκωτικών. Επιπλέον, η δοκιμή φαρμάκων για τα μαλλιά μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε επιδημιολογικές και κλινικές μελέτες για την αντικειμενική αξιολόγηση της επαναλαμβανόμενης έκθεσης σε ένα συγκεκριμένο φάρμακο σε συγκεκριμένους πληθυσμούς ασθενών. ^{(67), (71)}

Όταν σε σκηνή που έχει διαπραχθεί κάποιο έγκλημα, οι εγκληματολόγοι συλλέγουν τρίχες που βρίσκονται μέσα στο χώρο καθώς και από το πτώμα εάν υπάρχει. Τις αποθηκεύουν σε ειδικά αποστειρωμένα σακουλάκια και τα στέλνουν προς ανάλυση στα εργαστήρια. Αφού φτάσουν στα εγκληματολογικά εργαστήρια, τα διάφορα δείγματα τριχών κόβονται κοντά στο τριχωτό της κεφαλής στην περιοχή της κορυφής. Τα δείγματα επωάζονται με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 0,1 M και pH=6 για όλη τη νύχτα στους 45 °C. Τα δείγματα, μετά από ψύξη και φυγοκέντρωση, εκχυλίζονται με εκχύλιση στερεάς φάσης (SPE). Μετά την έκλουση και την εξάτμιση της οργανικής στιβάδας, οι αναλυόμενες ουσίες παραγωγοποιήθηκαν με το κατάλληλο αντιδραστήριο στους 70 °C για 30 λεπτά, και τα παράγωγα εγχύθηκαν σε σύστημα GC/MS. ^{(67), (71)}

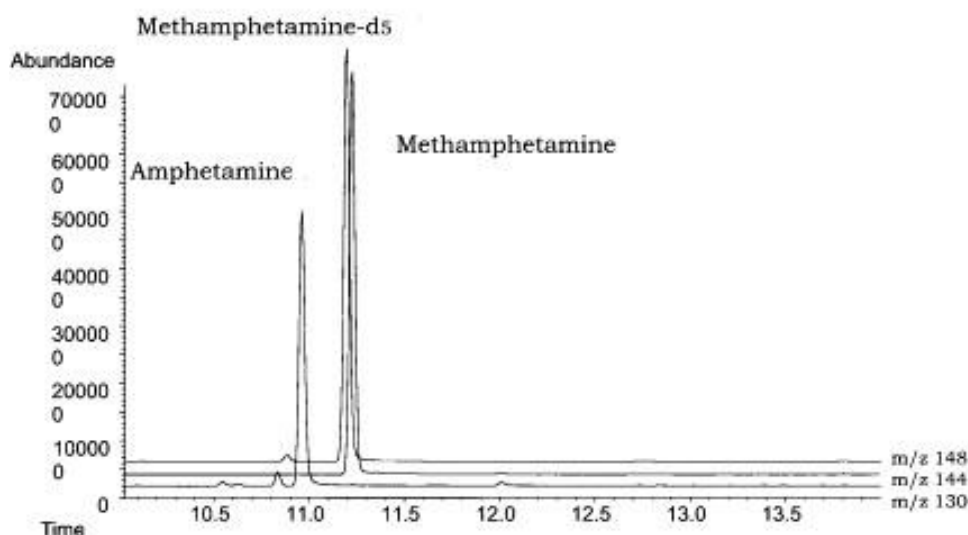
3.1.4.2 Προσδιορισμός αμφεταμίνης και μεθαμφεταμίνης στο αίμα

Η μεθαμφεταμίνη (MA) και ο μεταβολίτης της, αμφεταμίνη (AM) (βλ. Πίνακας 1) είναι ισχυρά διεγερτικά του κεντρικού νευρικού συστήματος και καταχρώνται σε πολλές χώρες. Θάνατος λόγω υπερβολικής δόσης έχουν αναφερθεί μετά τη λήψη MA και των σχετικών ενώσεων της. Είναι σημαντικό να προσδιοριστεί η συγκέντρωση των αμφεταμινών στο αίμα, προκειμένου να γνωρίζουμε την αιτία θανάτου. Απαιτείται μια απλή και ακριβής μέθοδος για την ανάλυση ρουτίνας και τον έλεγχο των αμφεταμινών σε βιολογικά υλικά για εγκληματολογικούς, δικαστικούς και κλινικούς σκοπούς. ⁽⁷²⁻⁷⁴⁾

Ειδικότερα, δείγμα αίματος (0,5 g) και ένα εσωτερικό πρότυπο (MA-d5, 0.1 mg/mL, 5μL) αναμιγνύεται με ρυθμιστικό διάλυμα βορικού (C=50 mM, pH=10.5, 1.0 mL). Το μίγμα εφαρμόζεται σε στήλη Extrelut. Οι στήλες αυτές απλοποιούν την διαδικασία της εκχύλισης υγρού-υγρού αντικαθιστώντας τις χοάνες διαχωρισμού. Είναι πιο αποτελεσματική και εξοικονομεί διαλύτη, υλικό και χρόνο σε αντίθεση με τον κλασικό διαχωρισμό με χρήση χοάνης. Μετά από 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, 1 mL οξικού αιθυλεστέρα που περιέχει χλωρομυρμηκικό αλκυλεστέρα (10 μL/mL σε οξικό

αιθυλεστέρα) εισάγεται στη στήλη. Για να αντιδράσουν πλήρως οι αμφεταμίνες και το χλωρομυρμηκικό αλκυλεστέρα, η στήλη αφήνεται για τουλάχιστον 10 λεπτά. Τα παράγωγα στη συνέχεια εκλύονται με οξικό αιθυλεστέρα (3 mL). Το υγρό έκλυσης εξατμίζεται σε κενό χρησιμοποιώντας έναν φυγοκεντρικό συμπυκνωτή. Το υπόλειμμα στη συνέχεια διαλύεται σε 200 μL οξικού αιθυλεστέρα και 1 μL του δείγματος αυτού εκχύνεται σε σύστημα GC-MS. ⁽⁷²⁻⁷⁴⁾

Ο αέριος χρωματογράφος-φασματομέτρο μάζας (GC-MS) που χρησιμοποιείται για το προσδιορισμό των AM και MA εξοπλισμένο με τριχοειδής στήλη τηγμένης πυριτίας 0.25 mm. Η θερμοκρασία του φούρνου ρυθμίζεται στους 100 °C για 1 λεπτό, και στη συνέχεια προγραμματίζεται από 100 έως 300 °C στους 10 °C/min και διατηρείται στους 300 °C για 3 λεπτά. Οι θερμοκρασίες της θύρας έγχυσης και του ανιχνευτή ρυθμίζονται στους 250 και 280 °C, αντίστοιχα. Χρησιμοποιείται λειτουργία έγχυσης χωρίς διαχωρισμό. Ο ανιχνευτής επιλεκτικής μάζας λειτούργησε στη λειτουργία κρούσης ηλεκτρονίων (EI) στα 70 eV ενέργειας ηλεκτρονίων. Ως αέριο φορέας χρησιμοποιείται ήλιο με ρυθμό ροής 0.8 mL/min. Τα ιόντα που χρησιμοποιούνται για την ποσοτικοποίηση είναι $m/z=130$ για το παράγωγο AM, $m/z=144$ για το παράγωγο MA και $m/z=148$ για το παράγωγο MA- d5 (*internal standard, IS*) σε επιλεγμένη παρακολούθηση ιόντων (SIM). Για να επιβεβαιωθεί το τμήμα μάζας των παραγώγων, λαμβάνονται δεδομένα σε λειτουργία πλήρους σάρωσης με εύρος σάρωσης από m/z ίσο με 50 έως 550. ⁽⁷²⁻⁷⁴⁾



Εικόνα 8: Χρωματογράφημα ενός αγνώστου δείγματος αίματος από παραγοντοποίηση στη στήλη και έπειτα ανάλυση GC/MS. ⁽⁷²⁾

Μία καλά εδραιωμένη τεχνική για το προσδιορισμό των ΑΜ και ΜΑ στο αίμα είναι η τριφθοροακετυλίωση για την παραγωγοποίηση των αμφεταμινών. Η συγκεκριμένη τεχνική εφαρμόζεται σε κάποια εγκληματολογικά εργαστήρια μέχρι και σήμερα. Ωστόσο, υπάρχουν ορισμένα σοβαρά προβλήματα στην τριφθοροακετυλίωση των αμφεταμινών. Για παράδειγμα απώλεια των παραγώγων κατά την παραγωγοποίηση ή σταθερότητα των παραγώγων. Ακόμη, είναι ευρέως γνωστό ότι οι ελεύθερες αμίνες είναι δύσκολο να εξαχθούν από τις μήτρες δειγμάτων και δεν μπορούν να διαχωριστούν καλά, λόγω της υψηλής πολικότητας και πτητικότητάς τους. Επίσης, η ανάλυση των ελεύθερων αμφεταμινών με GC ή GC-MS σχετίζεται με δυσκολίες στην ευαισθησία και την αναπαραγωγιμότητα λόγω της προσρόφησης και της αλληλεπίδρασης με τη στήλη. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα κακή ανάλυση αιχμής. Επομένως, συνήθως απαιτείται παραγωγοποίηση της ανάλυσης GC για αυτές τις ενώσεις και οι διαδικασίες προετοιμασίας του δείγματος γίνονται επίπονες, δαπανηρές και χρονοβόρες. Άλλες τεχνικές προσδιορισμού των ναρκωτικών αυτών είναι ένα τριχοειδές όργανο GC με ανίχνευση ιονισμού φλόγας (FID) σε ολικό αίμα με τη μέθοδο να είναι γρήγορη, ακριβής και ευαίσθητη.⁽⁷²⁻⁷⁴⁾

3.1.4.3 Ανίχνευση κεταμίνης στο πλάσμα και στα ούρα

Η κεταμίνη, (RS)-2-μεθυλαμινο-2-(2-χλωροφαινυλο)κυκλοεξανόνη, η οποία είναι ένα ανάλογο φαινκυκλιδίνης που χρησιμοποιείται κυρίως ως αναισθητικό φάρμακο. Προκαλεί απώλεια συνείδησης, αμνησία, ακινησία, ανακούφιση από τον πόνο και καταστολή, ενώ οι καρδιοπνευμονικές λειτουργίες και τα προστατευτικά αντανακλαστικά των αεραγωγών παραμένουν αμετάβλητα. Επιπλέον, η κεταμίνη είναι ένα ναρκωτικό που χρησιμοποιείται συνήθως σε εφήβους σε νυχτερινά κέντρα και ψυχαγωγικά πάρτι λόγω των διεγερτικών, διαχωριστικών και παραισθησιογόνων επιδράσεών της. Η υπερδοσολογία κεταμίνης έχει βρεθεί ότι προκαλεί ποικίλες παρενέργειες όπως δυσλειτουργίες του νευρικού, του ουροποιητικού και του καρδιαγγειακού συστήματος. Επομένως, η ταυτοποίηση και ο ποσοτικός προσδιορισμός της κεταμίνης σε βιολογικά υγρά και φαρμακευτικά δείγματα έχουν σημαντική σημασία για εξιχνίαση του κάθε εγκλήματος.⁽⁷⁵⁻⁷⁷⁾

Μέχρι σήμερα, διάφορες τεχνικές όπως υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC), αέρια χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας (GC-MS), υγρή χρωματογραφία-

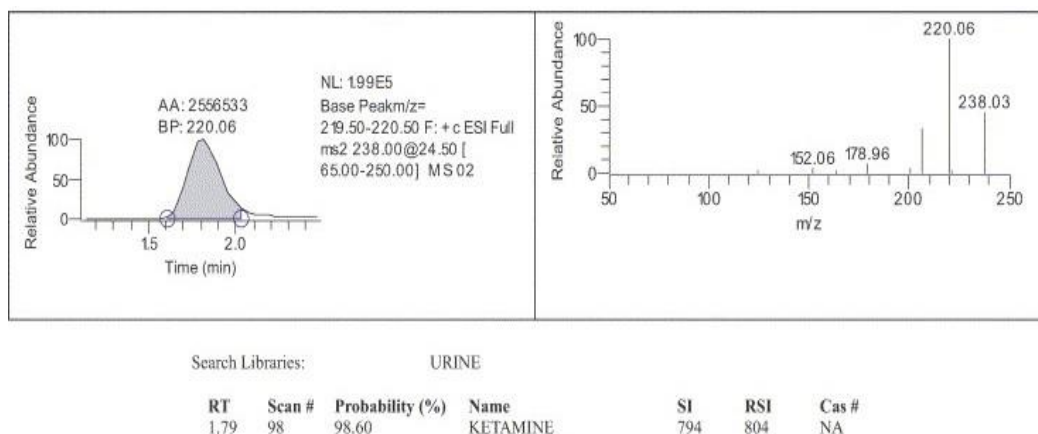
φασματομετρία μάζας (LC-MS) και ενζυμική ανοσοπροσροφητική δοκιμασία (ELISA) έχουν προταθεί για τον προσδιορισμό της κεταμίνης. Οι δημοσιευμένες μέθοδοι για τον προσδιορισμό της κεταμίνης σε δείγματα ούρων ή αίματος ήταν κυρίως οι παραπάνω. Η προετοιμασία του δείγματος με εκχύλιση υγρού-υγρού και οι μεγάλοι χρόνοι χρωματογραφίας κατέστησαν αυτές τις μεθόδους μη εφαρμόσιμες σε εργαστήρια υψηλής απόδοσης για τη διενέργεια εξέτασης ρουτίνας κεταμίνης. Πρόσφατα, έχει αναπτυχθεί μια απλή, γρήγορη, ευαίσθητη και επαναλαμβανόμενη μέθοδος HPLC-UV για τον προσδιορισμό κεταμίνης. Η απλότητα της προτεινόμενης μεθόδου διευκολύνεται με τη χρήση μιας διαδικασίας εκχύλισης υγρού-υγρού ενός σταδίου, αντί της χρήσης των ακριβών φυσιγγίων εκχύλισης στερεάς φάσης.⁽⁷⁵⁾

Αναλυτικότερα, η προετοιμασία των δειγμάτων περιλαμβάνει φυγοκέντρηση σε φιαλίδια ηπαρίνης για 15 λεπτά στα δείγματα αίματος και το διαχωρισμένο πλάσμα αποθηκεύεται αμέσως στους -20°C πριν από την ανάλυση. Δείγματα (500 μL) πλάσματος μεταφέρονται σε γυάλινο σωλήνα με βιδωτό πώμα και αλκαλοποιούνται με 500 μL υδροξειδίου του νατρίου 1 M. Στη συνέχεια, προστίθενται 5 mL διαιθυλαιθέρα-μεθυλενοχλωρίδιο (7:3, v/v) και οι σωλήνες αναμιγνύονται χρησιμοποιώντας συσκευή vortex για 5 λεπτά στις 2000 rpm και στη συνέχεια φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στα 4000 × g στους 4 °C. . Οι σωλήνες με βιδωτό πώμα, που περιέχουν τα δείγματα, καταψύχονται για ~ 40 λεπτά στους -20 °C. Η οργανική στιβάδα μεταφέρεται σε κωνικούς γυάλινους σωλήνες φυγοκέντρησης και συμπυκνώνεται (στοις 40 °C) κάτω από ένα ήπιο ρεύμα αζώτου. Τα υπολείμματα επαναδιαλύθηκαν σε 150 μL της κινητής φάσης και 30 μL εγχύνονται στο σύστημα HPLC. Ο χρωματογραφικός διαχωρισμός πραγματοποιείται σε στήλη C₁₈ χρησιμοποιώντας κινητή φάση που περιέχει ρυθμιστικό διάλυμα επτανοσουλφονικού νατρίου ακετονιτριλίου-10 mM ρυθμισμένο σε pH 3, με παγόμορφο οξικό οξύ (44:10:46, v:v) σε μήκος κύματος ανίχνευσης 269 nm και 277 nm, με συνολικό χρόνο λειτουργίας 10 λεπτών. Ο χρόνος κατακράτησης της κεταμίνης με τη προαναφερθείσα μέθοδο είναι στα 5.2 λεπτά.⁽⁷⁵⁻⁷⁷⁾

Μία ακόμη μέθοδος που επιτρέπει ταχύτερο προσδιορισμό της κεταμίνης σε δείγματα ούρων είναι η υγρή χρωματογραφία με διαδοχική φασματομετρία μάζας (LC-MS/MS). Η πειραματική διαδικασία που ακολουθείται είναι η παρακάτω. Στα δείγματα ούρων (1,6 mL) προστίθενται 30 μL μεφαιντερμίνης (εσωτερικό πρότυπο, 100 ng/ml) και αλκαλοποιούνται με 0.5 mL κορεσμένου ρυθμιστικού διαλύματος διττανθρακικού νατρίου (pH=8-9). Το μίγμα που προκύπτει, φυγοκεντρείται για 10 λεπτά και στη συνέχεια

μεταφέρονται σε δοκιμαστικούς σωλήνες σε θερμοκρασία δωματίου. Η περαιτέρω προετοιμασία του δείγματος περιλαμβάνει αυτοματοποιημένη SPE. Τα φυσίγγια ρυθμίζονται με έκπλυση 1 mL μεθανόλης ακολουθούμενη από 1 mL απιονισμένου νερού. Στη συνέχεια, 2 mL των μιγμάτων του δείγματος εφαρμόζονται στα ρυθμισμένα φυσίγγια με ρυθμό ροής 0,75 mL/min. Τα φυσίγγια εκπλένονται διαδοχικά με 1 mL απιονισμένου νερού, 1 mL διαλύματος ακετονιτριλίου 10%. Τα φυσίγγια εκχύλισης τελικά εκλούονται με 1 mL μεθανόλης, ακολουθούμενο από καθαρισμό με 0.5 mL αέρα. Μετά από φυγοκέντρηση των εκχυλισμάτων για 30 λεπτά, τα ανώτερα στρώματα των εκχυλισμάτων μεταφέρονται σε φιαλίδια για ανάλυση σε σύστημα LC. ⁽⁷⁵⁻⁷⁷⁾

Το σύστημα LC αποτελείται από μια τεταρτοταγή αντλία, έναν απαερωτή κενού και έναν αυτόματο δειγματολήπτη. Πραγματοποιούνται ενέσεις 2 μ L με τη χρήση του αυτόματου δειγματολήπτη. Η κινητή φάση αποτελείται από 77% από 10 mM μυρμηκικό αμμώνιο (pH= 3) και 23% από ακετονιτρίλιο. Η ισοκρατική έκλυση διατηρείται με ρυθμό ροής 0.2 mL/min για χρωματογραφικό κύκλο 2.5 λεπτών. Η στήλη της LC C₁₈ διατηρήθηκε σε θερμοκρασία δωματίου καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος. Το LC συζεύχθηκε με ένα φασματομέτρο μάζας παγίδας ιόντων με μια πηγή ιονισμού ηλεκτροψεκασμού. Ο θετικός ιονισμός ηλεκτροψεκασμού (ESI) επιτεύχθηκε χρησιμοποιώντας αέριο περιβλήματος αζώτου στα 620 PKa και τάση ψεκασμού στα 4 kV. Η τάση και η θερμοκρασία του τριχοειδούς ρυθμίστηκαν στα 10 V και στους 200 °C, αντίστοιχα. Οι μεταβάσεις MS–MS πραγματοποιήθηκαν ως εξής: κεταμίνη (m/z 238→220) με κανονικοποιημένη ενέργεια συμπαιγνίας 24,5% και πλάτος απομόνωσης 2 m/z. Αυτές οι μεταβάσεις πραγματοποιούνται παρακολουθώντας τις πλήρεις σαρώσεις m/z 65→250. ⁽⁷⁵⁻⁷⁷⁾



Εικόνα 9: Χρωματογράφημα παρακολούθησης επιλεγμένων ιόντων από ούρα με αποτέλεσμα αναζήτησης αυτόματης βιβλιοθήκης (κεταμίνη στα 20 ng/mL).⁽⁷⁶⁾

Τα εκχυλίσματα που ελήφθησαν από SPE αναλύθηκαν με LC-MS/MS, όπως περιγράφηκε παραπάνω. Η ανάκτηση κεταμίνης από δείγματα ούρων ήταν 89% στα 20 ng/mL και το όριο ανίχνευσης ($S/N \geq 3$) υπολογίστηκε ότι ήταν 5 ng/mL. Το φάσμα μάζας της κεταμίνης στα 20 ng/mL και το χρωματογράφημα επιλεκτικής παρακολούθησης ιόντων (SIM) της δοκιμής LC-MS/MS φαίνονται στην Εικόνα 9. Τα δύο χαρακτηριστικά ιόντα στα $m/z=220$ και 207 δημιουργήθηκαν με διάσταση που προκαλείται από σύγκρουση του μητρικού ιόντος στο $m/z=238$. Συμπερασματικά, ο επιπολασμός της κατάχρησης κεταμίνης απαιτεί άμεσο και γρήγορο προσδιορισμό. Γι' αυτό το λόγο, στο πεδίο εφαρμόζονται και άλλες τεχνικές. Οι διαφορές μεταξύ των μεθόδων αυτών είναι στη διαδικασία της εκχύλισης των δειγμάτων. Συνεπώς, η μικροεκχύλιση στερεάς φάσης εντός σωλήνα (in-tube SPME) είναι μία νέα τεχνική που μπορεί να πραγματοποιήσει την εκχύλιση με ένα τριχοειδές συνδεδεμένο απευθείας σ' ένα σύστημα HPLC, παρέχοντας έτσι μια αυτοματοποιημένη και ακριβή διαδικασία εκχύλισης για τον ακριβή προσδιορισμό της κεταμίνης σε βιολογικά δείγματα. ⁽⁷⁵⁻⁷⁷⁾

3.1.4.4 Προσδιορισμός νιτροκυτταρίνης και νιτρογλυκερίνης σε άκαπνη πυρίτιδα (smokeless powder)

Οι εγκληματολόγοι απαιτούν πληροφορίες για όλα τα διακριτά συστατικά ενός εκρηκτικού μείγματος, πριν από την ταυτοποίηση και την ταξινόμηση. Σχεδόν όλες οι οργανικές εκρηκτικές ενώσεις και τα πρόσθετα αυτών μπορούν να ανιχνευθούν χρησιμοποιώντας GC-MS. Η GC-MS είναι σήμερα από τις πιο ευρέως χρησιμοποιούμενες τεχνικές, στην ανάλυση εκρηκτικών, κυρίως λόγω της ακρίβειας και της ευαισθησίας της μεθόδου. ⁽⁷⁸⁻⁸⁰⁾

Η νιτροκυτταρίνη (nitrocellulose, NC) και η νιτρογλυκερίνη (nitroglycerin, NG) είναι τα δύο κύρια συστατικά για τη πλήρωση φυσιγγίων (πυρίτιδα) και για την κατασκευή πυρομαχικών. Η NC ή βαμβακοπυρίτιδα είναι ένα μη πτητικό μακρομόριο, που παράγεται από τη νίτρωση της κυτταρίνης με νιτρικό οξύ. Η NC είναι μια από τις πιο διαδεδομένες εκρηκτικές ενώσεις. Υπάρχει σε διάφορες μορφές, οι οποίες έχουν διαφορετική περιεκτικότητα σε άζωτο. Εάν η περιεκτικότητα σε άζωτο είναι υψηλή, η NC μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε εμπρηστικές περιπτώσεις. Από την άλλη μεριά, η νιτρογλυκερίνη είναι ένα βαρύ, ελαιώδες εκρηκτικό υγρό με χημικό τύπο $C_3H_5(ONO_2)_3$. Η αντίδραση της γλυκερόλης με ένα μίγμα νιτρικού και θειικού οξέος μας δίνει τη NG, το πρώτο εκρηκτικό

που αναπτύχθηκε καθώς και δρα ως ενεργό συστατικό στη νιτροκυτταρίνη και σε κάποια στερεά προωθητικά καύσιμα. ⁽⁷⁸⁻⁸⁰⁾

Οι συνήθεις εγκληματολογικές εργαστηριακές εξετάσεις της οργανικής σύνθεσης του δείγματος σκόνης και της άκαπνης πυρίτιδας (smokeless powder) μπορεί να είναι επωφελείς καθώς μπορούν να παρέχουν αποδεικτικές πληροφορίες σχετικά με τον τύπο της σκόνης και την πιθανή εύρεση της πηγής. Στις περισσότερες περιπτώσεις η NC είναι το βασικό ενεργειακό υλικό. Οι εγκληματολόγοι απαιτούν πληροφορίες για όλα τα διακριτά συστατικά ενός εκρηκτικού μείγματος, πριν από την ταυτοποίηση και την ταξινόμηση. Οι σκόνες μπορούν να ταξινομηθούν με βάση το περιεχόμενό τους. Ειδικότερα, η άκαπνη πυρίτιδα μονής βάσης αποτελείται μόνο από NC, η άκαπνη πυρίτιδα διπλής βάσης αποτελείται από NC και NG και η τριπλή βάση περιέχει τρία ενεργητικά υλικά: NC, NG και νιτρογουανιδίνη. Η διαφοροποίηση μεταξύ σκόνης μονής βάσης και σκόνης διπλής βάσης προσφέρει τουλάχιστον περισσότερα στοιχεία αναγνώρισης, τα οποία μπορούν να διερευνήσουν περαιτέρω. ⁽⁷⁸⁻⁸⁰⁾

Για την ταχεία ανίχνευση της νιτρογλυκερίνης από τη νιτροκυτταρίνη, έχουν προταθεί νέες μελέτες, όπως το αντιδραστήριο p-dmac. Η 3-[4-(Διμεθυλαμινο)φαινυλ]προπ-2-ενάλη (p-dmac) είναι ένας αρωματικός υδρογονάνθρακας. Το επιλεγμένο αντιδραστήριο για την δοκιμή, p-dmac, έχει αποδειχθεί ότι παρουσιάζει αλλαγή χρώματος παρουσία νιτρικής ουρίας. Σε ένα ουδέτερο διάλυμα, το p-dmac θα αλλάξει από πορτοκαλί σε κόκκινο όταν εκτεθεί στη νιτρική ουρία. Τα αποτελέσματα της δοκιμής χρώματος είναι μόνο προκαταρκτικά και πρέπει να επιβεβαιώνονται με άλλες τεχνικές, όπως GC-MS. Επιπλέον, αυτό το αντιδραστήριο θα χρησιμεύσει επίσης ως αποτελεσματικό μέσο ανίχνευσης της παρουσίας NG, επιτρέποντας έτσι τη διαφοροποίηση των σκονών διπλής βάσης από τις σκόνες μίας βάσης. Αυτή η μέθοδος αποδεικνύεται επωφελής τόσο σε in-situ όσο και σε ex-situ καταστάσεις και έχει μεγάλες δυνατότητες για τη συμπλήρωση των SOP λόγω της ταχύτητας, της αναπαραγωγιμότητας και της οικονομικής προσιτότητας. ⁽⁷⁸⁻⁸⁰⁾

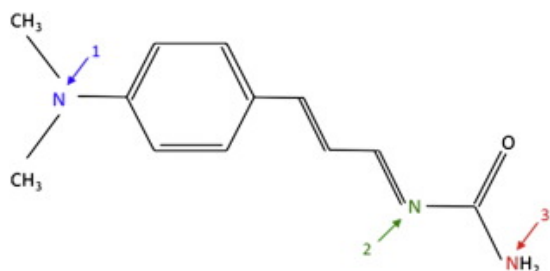
Η πειραματική διαδικασία είναι γρήγορη και αξιόπιστη. Διάφορες σκόνες τοποθετούνται σε σωληνάκια Eppendorf και σ' αυτά προστίθενται 500 μ L ακετόνης και έπειτα αναμιγνύονται με τη βοήθεια της συσκευής Vortex. Το υπερκείμενο αναλύεται σε αέριο χρωματογράφο συζευγμένο με φασματόμετρο μάζας. Η στήλη GC είναι με 5% φαινυλομεθυλοσιλόξ και το ήλιο ως το φέρον αέριο. Οι συνθήκες GC ήταν οι εξής: θερμοκρασία εγχυτήρα 150 °C, θερμοκρασία στήλης διατηρήθηκε στους 100 °C για 3

λεπτά, θερμάνθηκε στους 250 °C με ρυθμό 10 °C/min και διατηρήθηκε για 5 λεπτά στους 250 °C. Εύρος σάρωσης 25 έως 500 m/z. και ταχύτητα σάρωσης 3,1 σαρώσεις/δευτ. Οι ενέσεις πραγματοποιήθηκαν σε λειτουργία διαχωρισμού με αναλογία 150:1. Ο όγκος του δείγματος που εγχύθηκε ήταν 1 μL. Επίσης, έχει αναλυθεί και ένα δείγμα που περιέχει NG, ως πρότυπο και αναλύθηκε υπό παρόμοιες συνθήκες με τα δείγματα δοκιμής. ⁽⁷⁸⁻⁸⁰⁾

Ταυτοχρόνως, μερικές σταγόνες από το υπερκείμενο διάλυμα των δειγμάτων τοποθετήθηκαν σε γυάλινη αντικειμενοφόρο πλάκα μέσα σε γυάλινο δακτύλιο με εξωτερική διάμετρο 22 mm. Στη συνέχεια, προστίθενται το αντιδραστήριο p-dmac (2-3 σταγόνες). Η αντικειμενοφόρος πλάκα του μικροσκοπίου τοποθετείται αμέσως σε μια προθερμασμένη εστία στους 70 °C. Όλες οι αντιδράσεις παρατηρήθηκαν σε περίοδο 5 λεπτών. Η αντίδραση ολοκληρώνεται μέσα σε 3 λεπτά. Όλες οι σκόνες μονής βάσης, όταν αντέδρασαν με το p-dmac, παρήγαγαν μια κίτρινη κηλίδα. Όλες οι σκόνες διπλής βάσης, όταν αντέδρασαν με το p-dmac, παρήγαγαν μια φούξια κηλίδα. (Εικ. 10) ⁽⁷⁸⁻⁸⁰⁾



Εικόνα 10: Α) Δοκιμή με σκόνη διπλής βάσης. Β) Δοκιμή μέσης κηλίδας με έλεγχο αντιδραστηρίου. Γ) Δοκιμή με σκόνη μονής βάσης. ⁽⁷⁸⁾



Εικόνα 11: Το αντιδραστήριο p-dmac. ⁽⁷⁸⁾

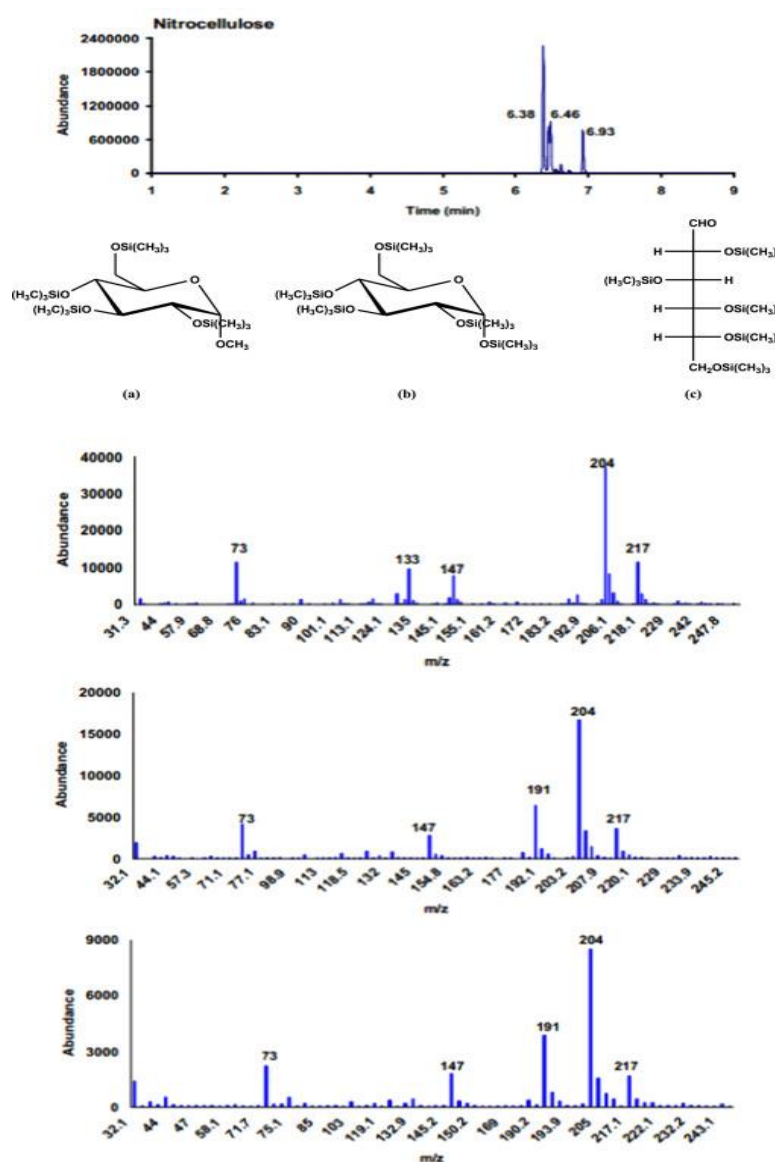
Μελέτες έχουν δείξει ότι, η ανίχνευση προκαλείται από την αλληλεπίδραση των N₃ και N₂ της ελεύθερης βάσης με δύο από το οξυγόνο οποιουδήποτε από τα νίτρο τμήματα στη νιτρογλυκερίνη. Αυτό είναι πολύ παρόμοιο με την αλληλεπίδραση του p-dmac με τη νιτρική ουρία, αλλά δημιουργεί

διαφορετικό χρώμα (Εικ. 11). Όλες οι δοκιμές που κατέληξαν σε θετική απόκριση για τη νιτρογλυκερίνη υποστηρίχθηκαν από τον θετικό έλεγχο και με GC–MS. ⁽⁷⁸⁻⁸⁰⁾

Λαμβάνοντας υπόψη ότι η ανίχνευση της NC έχει και αυτή μεγάλη σημασία στον τομέα της εγκληματολογίας, πολλές μέθοδοι έχουν ήδη αναπτυχθεί μετά από μια σειρά μελετών. Οι περισσότερες από τις τρέχουσες μεθόδους για την αναγνώριση της NC βασίζονται στην ανίχνευση ιόντων που προέρχονται από NC, όπως νιτρικά ή νιτρώδη, καθώς και άλλα ιόντα αποσύνθεσης. Έτσι, η σαφής ανίχνευση του NC κατά την ανάλυση μειγμάτων παραμένει μια πρόκληση, λόγω του γεγονότος ότι τα προϊόντα αποσύνθεσης της NC μπορεί να επικαλύπτονται με προϊόντα που προέρχονται από άλλα εκρηκτικά συστατικά. Οι επιστήμονες εφαρμόζουν την αέρια χρωματογραφία συζευγμένη με φασματομετρία μάζας. Ειδικότερα, χρησιμοποιώντας GC–EI–MS μπορούμε να ανιχνεύσουμε τόσο ποιοτικά όσο και ποσοτικά νιτροκυτταρίνη σ' ένα μείγμα εκρηκτικών ουσιών σε άκαπνη πυρίτιδα. Μικρές ποσότητες από κάθε εκρηκτικό (3-4 κόκκοι από κάθε προωθητικό, ~0,3 g) προστίθενται σε δοκιμαστικούς σωλήνες και αραιώθηκαν σε ακετόνη, τον διαλύτη στον οποίο η NC παρουσιάζει τη μέγιστη διαλυτότητά του. Διάφορες μελέτες έχουν δείξει ότι η NC συμπεριφέρεται όπως η κυτταρίνη, επομένως κάθε εκρηκτικό υποβλήθηκε σε επεξεργασία με το ακόλουθο πρωτόκολλο. ⁽⁷⁸⁻⁸⁰⁾

Πρώτον, η υδρόλυση του μακρομορίου σε μονάδες γλυκόζης επιτεύχθηκε προσθέτοντας 0,5 mL TFA 2 M σε κάθε σωληνάριο και τα σωληνάρια αφήνονται σε θερμοαντήρα μπλοκ στους 100 °C για 30 λεπτά. Τα δείγματα στη συνέχεια ξηραίνονται υπό ρεύμα αερίου αζώτου και προστίθενται επανειλημμένα 100 μL μεθανόλης για να αφαιρεθούν τυχόν υπολείμματα του οξέος. Συνεχίζοντας, τα δείγματα ξηραίνονται ξανά. Για το στάδιο της μεθανόλυσης, προστίθενται 0,5 mL άνυδρης μεθανόλης με 0,3 M HCl και οι σωλήνες διατηρούνται στους 80 °C για 2 ώρες. Αφού τα δείγματα ψύχονται σε θερμοκρασία δωματίου, αφήνονται να στεγνώσουν κάτω από ένα ρεύμα αερίου αζώτου. Για να ληφθούν τα παράγωγα τριμεθυλοσιλυλομεθυλογλυκοσιδίου, προστίθενται 0,25 mL αντιδραστήριου TMS και οι σωλήνες τοποθετούνται στους 80 °C για 20 λεπτά. Το αντιδραστήριο TMS είναι ένα μείγμα πυριδίνης, HDMS και TMCS (10:2:1). Όλα τα αντιδραστήρια απομακρύνθηκαν υπό ρεύμα αερίου αζώτου. Τέλος, τα υπολείμματα εκχυλίστηκαν με 1 mL εξανίου και 0,5 mL απιονισμένου νερού. Η οργανική φάση συμπυκνώθηκε σε περίπου 30 μL και αραιώθηκε σε 0,6 mL ακετόνης που χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση GC–EI–MS. ⁽⁷⁸⁻⁸⁰⁾

Η NC αποτελείται από υπολείμματα D -γλυκόζης και χρησιμοποιώντας αυτή τη μέθοδο τα παράγωγα τριμεθυλοσιλυλίου, που προέρχονται από την εκρηκτική ουσία που μας ενδιαφέρει, αναγνωρίστηκαν από το χρόνο κατακράτησης και τα χαρακτηριστικά μοτίβα κατακερματισμού MS τους. Από τα χρωματογραφήματα με τη συγκεκριμένη μέθοδο διαπιστώνουμε ότι υπάρχουν και παράγωγα της νιτροκυτταρίνης. Η παρουσία των εύλογων παραγώγων που περιγράφονται στην Εικ. 12 βασίζεται στην ακόλουθη υπόθεση. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, όταν εμφανίζονται πολλαπλές κορυφές στα χρωματογραφήματα των παραγώγων TMS, θα μπορούσαν να αποδοθούν είτε σε μείγματα α- και β-ανωμερών είτε σε διαφορετικές μορφές μονοσακχαριτών (πυρανόζη ή φουρανόζη). (78-80)



Εικόνα 12: Το χρωματογράφημα ολικού ιόντος (TIC) της NC και τα εύλογα παράγωγα της NC (a-c), καθώς και τα αντίστοιχα φάσματα μάζας τους. ⁽⁷⁹⁾

3.1.4.5 Προσδιορισμός του φαρμάκου φλουνιτραζεπάμη στα μαλλιά

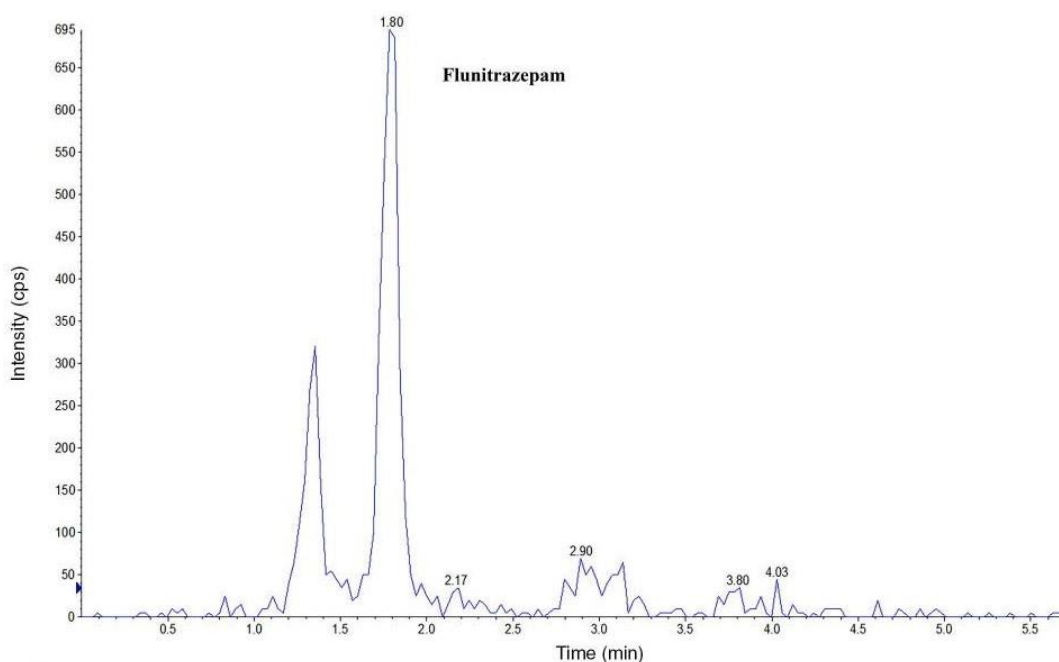
Η μελέτη μαλλιών παρέχει στους ερευνητές το πλεονέκτημα ενός ευρέος παραθύρου ανίχνευσης, το οποίο μπορεί να είναι ιδιαίτερα χρήσιμο για την αξιολόγηση της αναδρομικής έκθεσης σε ναρκωτικά σε περιπτώσεις κατάχρησης ναρκωτικών ή εγκλημάτων που διευκολύνονται από ναρκωτικά και στη μεταθανάτια τοξικολογία. Οι τρίχες της κεφαλής μεγαλώνουν περίπου 1 cm το μήνα. Με βάση τον ρυθμό ανάπτυξης των μαλλιών, οι τμηματικές αναλύσεις μαλλιών μπορεί να καταδείξουν τόσο τη μακροχρόνια έκθεση σε φάρμακα όσο και τα πρότυπα έκθεσης σε φάρμακα. ⁽⁸¹⁻⁸³⁾

Η Flunitrazepam (X.T.: $C_{16}H_{12}N_3O_3F$) είναι μια βενζοδιαζεπίνη που διατίθεται στην αγορά και χορηγείται για χρήση στην Ευρώπη, την Ασία και τη Λατινική Αμερική για τη βραχυπρόθεσμη θεραπεία της αϋπνίας, ως καταπραϋντικό-υπνωτικό και προαναισθητικό. Έχει φαρμακολογικά αποτελέσματα παρόμοια με άλλες βενζοδιαζεπίνες, με ισχύ περίπου δεκαπλάσια από εκείνη της διαζεπάμης. Αν και δεν κατασκευάζεται ούτε πωλείται στις Ηνωμένες Πολιτείες, η φλουνιτραζεπάμη είναι διαθέσιμη στη μαύρη αγορά από τις αρχές της δεκαετίας του 1990. Η φλουνιτραζεπάμη μπορεί να είναι πιο γνωστή ως το «χάπι του βιασμού» ή ως Rohypnol. ⁽⁸¹⁻⁸³⁾

Βιβλιογραφικές μελέτες έχουν δείξει ότι τόσο για το ποιοτικό όσο και για το ποσοτικό προσδιορισμό του φαρμάκου φλουνιτραζεπάμη στα μαλλιά είναι η υγρή χρωματογραφία με διαδοχική φασματομετρία μάζας (LC-MS/MS). Ειδικότερα, τρία έως έξι τμήματα μαλλιών χωρίζονται ανάλογα με το μήκος τους. Δέκα χιλιοστόγραμμα της τεμαχισμένης τρίχας ζυγίζονται σε πλαστικό σωλήνα. Τα τμήματα των μαλλιών ξεπλένονται διαδοχικά με 1 mL ακετόνης και δύο φορές με 0,5 mL νερού και ανακινούνται για 1 λεπτό πριν από την ανάλυση. Τα τμήματα μαλλιών στη συνέχεια ξηραίνονται όλη τη νύχτα σε θερμοκρασία δωματίου και προστίθονται κεραμικά σφαιρίδια. ⁽⁸¹⁻⁸³⁾

Οι εφαρμοζόμενες διαδικασίες εκχύλισης στις δημοσιευμένες μελέτες είναι είτε υγρή εκχύλιση (LLE) είτε εκχύλιση στερεάς φάσης (SPE), οι οποίες είναι περίπλοκες και χρονοβόρες. Νέες μελέτες εφαρμόζουν εκχύλιση ενός σταδίου, η οποία απαιτεί λιγότερο χρόνο προετοιμασίας του δείγματος και μικρότερη ποσότητα. Η ανίχνευση πραγματοποιείται από ένα σύστημα LC συνδεδεμένο με ένα φασματόμετρο μάζας. Ο ιονισμός πραγματοποιείται με θετικό τρόπο. Ο διαχωρισμός διεξάγεται σε στήλη προπυλίου, σε θερμοκρασία δωματίου και ρυθμό ροής 0,25 mL/min. Η κινητή φάση αποτελείται από 20 mmol/L οξικού αμμωνίου και 0,1% μυρμηκικό οξύ σε νερό και

ακετονιτρίλιο. Η ισοκρατική έκλυση πραγματοποιείται εντός 6 λεπτών. Το άζωτο χρησιμοποιείται ως το φέρον αέριο και το όργανο λειτουργούσε σε λειτουργία παρακολούθησης πολλαπλών αντιδράσεων (MRM). Ο χρόνος κατακράτησης και η αναλογία ιόντων δύο μεταπτώσεων MRM χρησιμοποιήθηκαν για την ταυτοποίηση της αναλυόμενης ουσίας.⁽⁸¹⁻⁸³⁾



Εικόνα 13: Το χρωματογράφημα του φαρμάκου φλουνιτραζεπάμη έπειτα από εκχύλιση ενός σταδίου.⁽⁸¹⁾

3.2 Φασματοσκοπία υπέρυθρου

Η φασματοσκοπία FT-IR είναι μια ευρέως χρησιμοποιούμενη τεχνική για τη διερεύνηση υλικών σε αέρια, υγρή ή στερεή φάση. Βασίζεται στην αλληλεπίδραση μεταξύ της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας και των φυσικών δονήσεων των χημικών δεσμών μεταξύ των ατόμων. Για να απορροφήσει ένα υλικό την ακτινοβολία στην υπέρυθρη περιοχή, θα πρέπει να πληρούνται δύο προϋποθέσεις. Πρώτον, θα πρέπει να υπάρχει συντονισμός μεταξύ των συχνοτήτων της υπέρυθρης ακτινοβολίας και της μοριακής δόνησης και δεύτερον η φυσική δόνηση θα πρέπει να προκαλεί αλλαγή στη διπολική ροπή κατά τη διάρκεια της δόνησης.⁽¹¹⁾

Οι συχνότητες δόνησης ενός χημικού δεσμού εξαρτώνται από την ακαμψία αυτού του δεσμού και τις μάζες των ατόμων σε κάθε άκρο του δεσμού. Υπάρχουν δύο τύποι μοριακών δονήσεων: ένας που αλλάζει το μήκος του δεσμού (τάσεως) και άλλος που

αλλάζει τη γωνία του δεσμού (κάμψεως). Το ηλεκτρομαγνητικό φάσμα χωρίζεται σε τρεις φασματικές περιοχές, δηλαδή, στο εγγύς ($14000 - 4000 \text{ cm}^{-1}$), το μεσαίο ($4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$) και το υπέρυθρο ($400 - 10 \text{ cm}^{-1}$). Τα κύρια μέρη ενός σύγχρονου φασματόμετρου είναι: η πηγή IR, ο μονοχρωμάτορας και ο ανιχνευτής υπέρυθρων. ⁽¹¹⁾

Οι υφαντικές ίνες είναι ένα από τα πιο κρίσιμα αποδεικτικά στοιχεία που μπορούν εύκολα να βρεθούν στους τόπους του εγκλήματος. Η ίνα μπορεί να αναγνωριστεί εκτελώντας μια σωστή σύγκριση χρησιμοποιώντας ορισμένες αναλυτικές τεχνικές. Η κύρια μέθοδος που χρησιμοποιείται φασματοσκοπία υπέρυθρου μετασχηματισμού Fourier (FT-IR). Το FT-IR είναι το πιο χρήσιμο για τη διάκριση μεταξύ ινών που ανήκουν στην ίδια γενική κατηγορία και υποκατηγορία. Επιπλέον, αυτή η μέθοδος βρέθηκε ότι είναι η πιο πολύτιμη μεμονωμένη δοκιμή όταν είναι διαθέσιμες μόνο λίγες ίνες. ⁽²⁹⁻³⁰⁾

3.2.1 Εξασθενημένη ολική ανάκλαση-Φασματοσκοπία υπέρυθρων

Οι σύγχρονες ποινικές έρευνες βασίζονται στα λόγια του θύματος και των αυτόπτων μαρτύρων. Βασίζονται επίσης στα φυσικά στοιχεία που βρέθηκαν στον τόπο του εγκλήματος. Αυτά τα αποδεικτικά στοιχεία, και πιο συγκεκριμένα τα βιολογικά, έχουν μεγάλη αξία για την επίλυση της υπόθεσης. Συνήθως χρησιμοποιούνται για να ανακαλέσουν τους ισχυρισμούς του υπόπτου και να επιβεβαιώσουν ή να αντικρούσουν τις δηλώσεις του θύματος και των μαρτύρων. Σε πολλές ποινικές υποθέσεις, η επιτυχία της έρευνας βασίζεται στη σωστή αναγνώριση και ταξινόμηση των βιολογικών υλικών. Ως εκ τούτου, η υιοθέτηση αξιόπιστων και ακριβών μεθόδων εγκληματολογικής ανάλυσης φαίνεται να είναι ζωτικής σημασίας για την επίτευξη αυτού του στόχου. Η φασματοσκοπία υπέρυθρων με εξασθενημένη ολική ανάκλαση (ATR-IR) είναι μια σύγχρονη και καθολική αναλυτική τεχνική ικανή να αναγνωρίζει το δακτυλικό αποτύπωμα της αναλυόμενης ουσίας χρησιμοποιώντας ελάχιστη ποσότητα του δείγματος. ⁽²⁹⁻³²⁾

Όταν χρησιμοποιείται το ATR-IR για την ανίχνευση και την ταυτοποίηση ιατροδικαστικών αποδεικτικών στοιχείων, το φάσμα απορρόφησης IR της αναλυόμενης ουσίας συγκρίνεται συνήθως με κάποια πρότυπα. Η διαδικασία σύγκρισης επιτρέπει στον αναλυτή να καταλήξει σε μια απόφαση με ένα καθορισμένο όριο εμπιστοσύνης. Είναι σημαντικό να τονιστεί το γεγονός ότι κάθε λειτουργική ομάδα έχει ένα καθορισμένο εύρος συχνοτήτων δόνησης και απορροφά μια καθορισμένη περιοχή (ζώνη) συχνοτήτων IR. Η ζώνη απορρόφησης IR για κάθε λειτουργική ομάδα εξαρτάται από τους χημικούς δεσμούς

και τις μάζες των ατόμων αυτής της ομάδας. Εκτός αυτού, επηρεάζεται από τις αλληλεπιδράσεις των δεσμών υδρογόνου και τις γειτονικές λειτουργικές ομάδες. ⁽²⁹⁻³²⁾

Το ATR-IR είναι μια εξαιρετικά ακριβής αναλυτική μέθοδος που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για έναν γρήγορο *in situ* έλεγχο και την αναγνώριση ενός ευρέος φάσματος υλικών και λεκέδων σε ποινικές έρευνες. Αυτή η τεχνική έχει αρκετά πλεονεκτήματα σε σχέση με άλλες τεχνικές που χρησιμοποιούνται σε εγκληματολογικές αναλύσεις. Πρώτον, η συσκευή είναι μικρού μεγέθους και μπορεί εύκολα να μεταφερθεί και να χρησιμοποιηθεί σε διάφορους τύπους πεδίων εργασίας. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την άμεση αναγνώριση και διάκριση μεταξύ των λεκέδων από σωματικά υγρά σε σκηνές εγκλήματος. Σε αντίθεση με άλλες αναλυτικές μεθόδους, το ATR-IR δεν απαιτεί τη διενέργεια ειδικών προετοιμασιών για το δείγμα. Εκτός αυτού, μόνο μια μικρή ποσότητα του δείγματος δοκιμής χρειάζεται για να πραγματοποιηθεί η μέτρηση. Επιπλέον, δεν απαιτούνται απαραίτητα αντιδραστήρια για την ανάλυση. Το ATR-IR είναι μια μη καταστροφική τεχνική που δεν προκαλεί αλλοιώσεις στο ελεγχόμενο δείγμα. Αυτό σημαίνει ότι το δείγμα μπορεί να χρησιμοποιηθεί εκ νέου σε περαιτέρω εγκληματολογικές αναλύσεις. ⁽²⁹⁻³²⁾

Οι κηλίδες αίματος εντοπίζονται συνήθως σε σκηνές εγκλήματος, ειδικά εκείνες που περιλαμβάνουν ανθρωποκτονία. Επιπλέον, το αίμα θεωρείται το πιο κατατοπιστικό βιολογικό στοιχείο στις ιατροδικαστικές έρευνες. Τα φασματικά δεδομένα που εξάγονται από την διερεύνηση κηλίδων αίματος από το ATR-IR μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να συναχθεί ένας πλούτος πληροφοριών που σχετίζονται με το είδος του δότη, την ηλικία, το φύλο και τη φυλή. Αυτά τα δεδομένα μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν για την εκτίμηση της ηλικίας των κηλίδων αίματος και για τη διαφοροποίηση μεταξύ εκείνων που ανήκουν σε διαφορετικούς τύπους αίματος. Παρόμοιες πληροφορίες μπορούν επίσης να συναχθούν από τα φάσματα απορρόφησης IR του σπερματικού υγρού. Επιπλέον, η τεχνική αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την πρόβλεψη του PMI με βάση την ανάλυση μεταθανάτιων βιοχημικών αλλαγών σε λιπώδεις ιστούς. ⁽²⁹⁻³²⁾

3.2.2 Ανάλυση βαφών από δοχεία ψεκασμού σε χαρτί

Οι ποινικές υποθέσεις που αφορούν βαφές με σπρέι είναι ποικίλες και στις περισσότερες περιπτώσεις παραμένουν συνδεδεμένες με βανδαλισμούς. Γενικά ένα ίχνος ανακτάται, αναλύεται και συγκρίνεται με δείγματα αναφοράς βαφής, όπως δοχεία ψεκασμού που ανήκουν σε έναν ύποπτο. Η ανάλυση των χαρακτηριστικών των χρωμάτων

ψεκασμού έχει διερευνηθεί σε βάθος. Μεταξύ των δημοσιευμένων εγγράφων, ορισμένες εργασίες επικεντρώθηκαν κυρίως σε πληθυσμιακές μελέτες και διακρίσεις ανά τύπο χρώματος, όπως μαύρο, κόκκινο, πράσινο ή διάφορα χρώματα γκράφιτι. Άλλες έρευνες επικεντρώθηκαν στα ίχνη βαφής και στη μεταφορά μικροσκοπικών σταγονιδίων χρώματος στα ρούχα, καθώς και στην ομοιογένεια της βαφής με τίναγμα, ή στη διάκριση των παρτίδων χρωμάτων ψεκασμού. ⁽⁸⁴⁻⁸⁶⁾

Εκτός από αυτές τις μελέτες, το ζήτημα της εξήγησης της προέλευσης των μικρών παραλλαγών και του επιπέδου των διακρίσεων στο οποίο μπορούμε να φτάσουμε δεν έχει εξεταστεί ελάχιστα. Μεταξύ αυτών των περιορισμών, ένα μεγάλο μέρος ασχολείται με την ερμηνεία φασματοσκοπικών δεδομένων (π.χ. Υπέρυθρο, Raman), κυρίως για να αποφασίσουμε πώς να ληφθούν υπόψη μικρές διαφορές στις σχετικές εντάσεις των κορυφών των χρωμάτων από δύο διαφορετικές πηγές. Οι στατιστικές μέθοδοι είναι σίγουρα σε θέση να εντοπίσουν αυτές τις διαφορές, αλλά ο ειδικός πρέπει στη συνέχεια να αποφασίσει εάν αυτές είναι πραγματικές διαφορές και πώς να τις ερμηνεύσει. ⁽⁸⁴⁻⁸⁶⁾

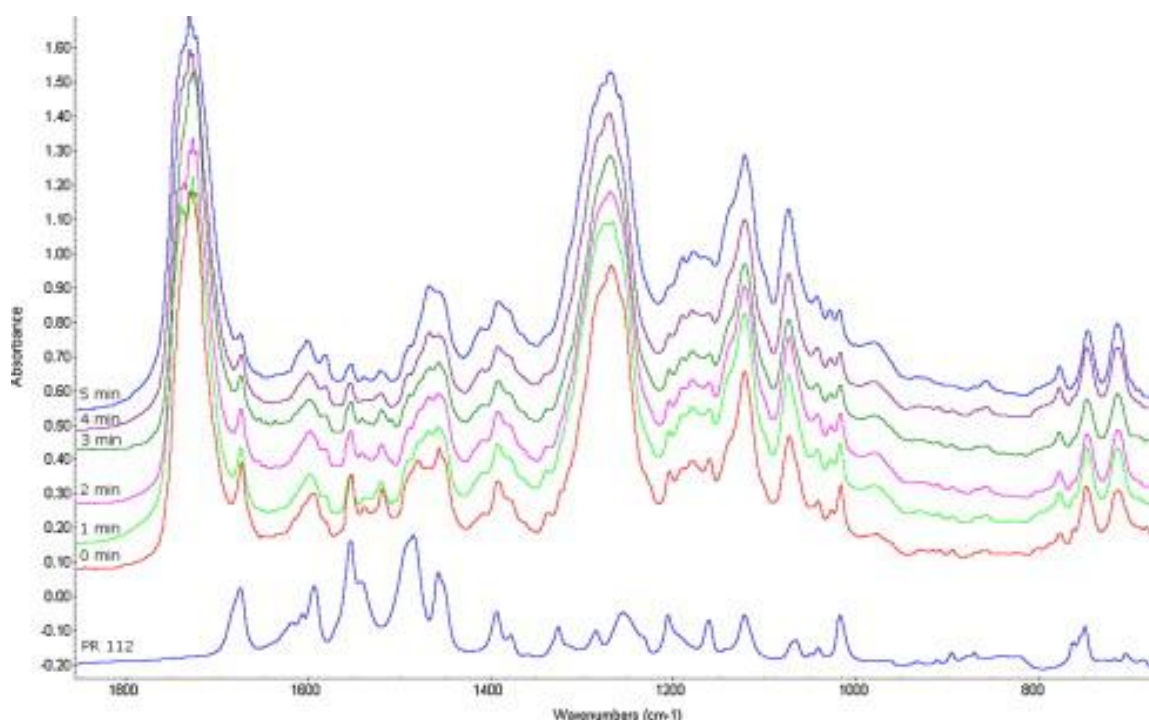
Οι μικρές διαφορές στα φάσματα μπορεί να είναι ποικίλες και από διαφορετική προέλευση όταν λαμβάνουμε υπόψη τόσο τα χρώματα αναφοράς όσο και τα ίχνη βαφής. Για τα χρώματα αναφοράς (π.χ. δοχεία ψεκασμού), όταν μετρώνται σε βέλτιστες συνθήκες, οι παραλλαγές περιλαμβάνουν κυρίως την κατανομή των συστατικών (ομοιογένεια του ψεκασμού) ή τις διαφορές που προέρχονται από τη διαδικασία κατασκευής (παρτίδες παραγωγής). Η χρήση διαφορετικών οργάνων είναι μια άλλη σημαντική πηγή της φασματικής διακύμανσης, δεδομένου ότι η απόκτηση δεδομένων εξαρτάται από το εργαστήριο/όργανο καθώς και από τη διαδικασία/τον χειριστή. Αν και συνήθως περιορίζεται στο ελάχιστο από τον χειριστή, η διακύμανση του οργάνου μπορεί να είναι προβληματική για μη διαδοχικές μετρήσεις. Για τα ίχνη βαφής (π.χ. γκράφιτι), πολλοί άλλοι παράγοντες προσθέτουν στην ανεπιθύμητη διακύμανση των φασμάτων, όπως η μόλυνση, η φθορά της επιφάνειας ή η ποσότητα του υλικού που συλλέγεται. ⁽⁸⁴⁻⁸⁶⁾

Νέες μελέτες έχουν εστιάσει στην επίδραση της ανακίνησης των σπρέι πριν χρησιμοποιηθούν. Οι έρευνες έδειξαν ότι στερεά υλικά καθιζάνουν στον πυθμένα του κουτιού. Σε περιπτώσεις ανεπαρκούς ανακίνησης, αυτά τα βαρύτερα υλικά ψεκάζονταν πρώτα λόγω της γειννίας με τον σωλήνα και στη συνέχεια ακολουθούν διαλύτες κυρίως που γέμιζε τον κρατήρα που σχηματιζόταν στα στερεά υλικά. Με χρήση των φασματοσκοπικών τεχνικών αναμένεται να παρατηρηθούν διαφορές στα φάσματα. Όλα τα παραπάνω μπορούν να οδηγήσουν σε σημαντικές αλλαγές στις φασματικές ιδιότητες ενός

χρώματος, καθώς η ομοιογένεια είναι κρίσιμης σημασίας για τη σύγκριση δύο δειγμάτων εγκληματολογίας και την παραγωγή ποιοτικών υλικών αναφοράς. ⁽⁸⁴⁻⁸⁶⁾

Σε αυτή την εργασία, ένα εξάρτημα ATR χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση των φασματικών χαρακτηριστικών υπερύθρων των βαφών από σπρέι σε λευκό χαρτί γραφής. Αυτό το αξεσουάρ επιλέχθηκε λόγω των δυνατοτήτων προβολής δειγμάτων μεγεθυμένο. Τα φάσματα συλλέχθηκαν χρησιμοποιώντας ένα φασματόμετρο FT-IR εξοπλισμένο με ανιχνευτή τελλουρίου-καδμίου-υδραργύρου (MCT) και ένα εξάρτημα δειγματοληψίας με ενσωματωμένες δυνατότητες μικροσκοπίου. Αυτό το αξεσουάρ διαθέτει μονολιθικό κρύσταλλο διαμαντιού και όλα τα ανακλαστικά οπτικά στοιχεία για σχεδόν απεριόριστο εύρος φάσματος. Η ενσωματωμένη μικροσκοπική κάμερα CCD, εστιασμένη στο κάτω μέρος του κρυστάλλου διαμαντιού, προσφέρει ποιότητα μικροσκοπίου βίντεο με μεγέθυνση 110×. Κατά τη διεξαγωγή της πειραματικής διαδικασίας, το δείγμα χαρτιού με ή χωρίς σημάδια βαφής τοποθετείται με την όψη προς τα κάτω πάνω στο διαμάντι. Το ενσωματωμένο μικροσκόπιο βίντεο επιτρέπει την επαλήθευση της επιθυμητής περιοχής του δείγματος. Η επιλεγμένη περιοχή σάρωσης είναι 4000–400 cm^{-1} με φασματική ανάλυση 4 cm^{-1} . Οι χρόνοι συλλογής background και δειγμάτων είναι ~1 λεπτό. ⁽⁸⁴⁻⁸⁶⁾

Για να εκτιμηθεί η έκταση της διακύμανσης μεταξύ ακίνητων και ανακινούμενων δοχείων ψεκασμού, τα φάσματα εξετάζονται πρώτα οπτικά και προσδιορίζεται η σύνθεσή τους με βάση τις κύριες κορυφές απορρόφησης. Το συνδετικό υλικό (ρητίνη) παρήγαγε πάντα το κύριο σήμα στα φάσματα. Μερικές φορές παρατηρήθηκαν ζώνες απορρόφησης υπερύθρων από τις χρωστικές, οι οποίες ήταν εν μέρει κρυμμένες από τις κορυφές του συνδετικού. Αυτές οι απορροφήσεις ήταν παρατηρήσιμες στη φασματική περιοχή του «δακτυλικού αποτυπώματος» από 1300 έως 1800 cm^{-1} (Εικ. 14). Η μεμονωμένη χημική αντιστοίχιση κάθε δονητικής απορρόφησης σε αυτήν την περιοχή είναι πάντα δύσκολη λόγω πολλών αλληλεπικαλυπτόμενων κορυφών. Ωστόσο, έχουν μεγαλύτερο ενδιαφέρον για σύγκριση, καθώς οι οργανικές χρωστικές μπορεί να εμφανίζουν απορροφήσεις υπερύθρων σε αυτήν την περιοχή δακτυλικών αποτυπωμάτων. Στην Εικόνα 14 απεικονίζονται τα φάσματα ενός δείγματος μετά από 0, 1, 2, 3, 4 και 5 λεπτά ανακίνησης αντίστοιχα. Επίσης, μπορούμε να παρατηρήσουμε μείωση της έντασης των ζωνών που αποδίδονται στις χρωστικές. Η αναλογία με το συνδετικό είναι υψηλή στα 0 λεπτά και στη συνέχεια μειώνεται και σταθεροποιείται μετά από περίπου 1–2 λεπτά για να παραμείνει σταθερή στη συνέχεια. ⁽⁸⁴⁻⁸⁶⁾



Εικόνα 14: Φάσματα υπερύθρων δείγματος βαφής από σπρέι μετά από 0, 1, 2, 3, 4 και 5 λεπτά ανακίνησης αντίστοιχα. Στο κάτω μέρος της εικόνας απεικονίζεται το πρότυπο αναφοράς μίας χρωστικής βαφής, PR112.⁽⁸⁴⁾

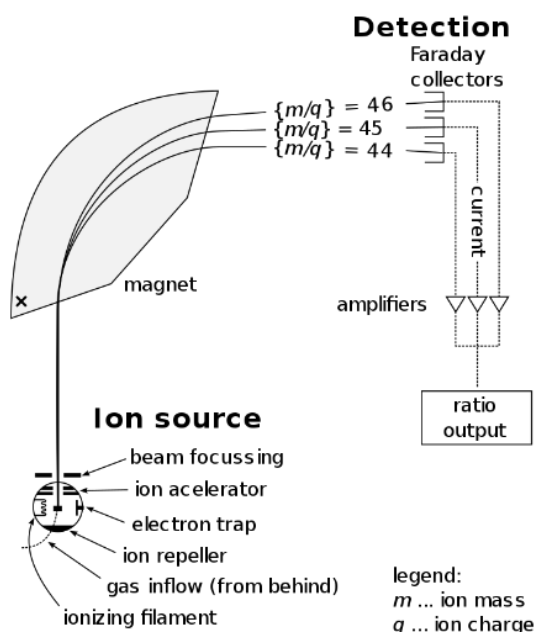
3.3 Φασματομετρία Μάζας

Η θεμελιώδης αρχή στην οποία στηρίζεται η φασματομετρία μάζας (*Mass Spectrometry, MS*) είναι η μέτρηση της μάζας ενός μορίου, με συνέπεια να ληφθούν πολλαπλά επίπεδα και είδη πληροφοριών. Η συγκεκριμένη τεχνική περιλαμβάνει τον ιονισμό των μορίων (από το διάλυμα στην αέρια φάση). Τα ιόντα που παράγονται, έπειτα, συγκεντρώνονται σε μια δέσμη και κατευθύνονται προς μια κυψέλη σύγκρουσης, με σκοπό να προκληθεί η διάστασή τους. Στη συνέχεια, οι μάζες των ιόντων και/ή των θραυσμάτων τους αναλύονται με βάση την αναλογία μάζας προς φορτίο (m/z) που προκύπτει.⁽¹¹⁾

Πριν πραγματοποιηθεί η ανάλυση MS, μπορούν να χρησιμοποιηθούν διαφορετικές διαδικασίες για τη προετοιμασία των δειγμάτων ανάλογα με το τι θέλουμε να προσδιορίσουμε. Επίσης, μπορούν να χρησιμοποιηθούν αρκετοί τύποι αναλυτών μάζας, όπως τετραπολικοί. Η φασματομετρία μάζας (MS) είναι μια ευαίσθητη αναλυτική τεχνική και μπορεί να χρησιμοποιηθεί τόσο για το ποιοτικό προσδιορισμό όσο και για το ποσοτικό ενός δείγματος. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης αποτυπώνονται στο φάσμα μάζας, το οποίο

είναι η γραφική παράσταση του σήματος ιόντων ως συνάρτηση του λόγου μάζας προς φορτίο. ⁽¹¹⁾

Ένα φασματόμετρο μάζας αποτελείται από τρία μέρη. Αρχικά υπάρχει η πηγή ιόντων, έπειτα ο αναλυτής μάζας και τέλος ο ανιχνευτής (Εικόνα 15). Ο ιονιστής μετατρέπει μέρος του δείγματος σε ιόντα. Ανάλογα με τη φάση του δείγματος (στερεό, υγρό, αέριο) χρησιμοποιούνται και διαφορετικές τεχνικές ιονισμού. Ο αναλυτής μάζας ταξινομεί τα ιόντα με βάση το m/z . Ο ανιχνευτής δίνει πληροφορίες για τον υπολογισμό της αφθονίας κάθε ιόντος που υπάρχει. ⁽¹¹⁾



Εικόνα 15: Σχηματική απεικόνιση ενός φασματόμετρου μάζας.⁽³⁶⁾

Η σύζευξη τεχνικών χρωματογραφίας με φασματομετρία μάζας έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως στην ανάλυση φαρμάκων κατάχρησης, ειδικά όταν απαιτείται η διαλογή του δείγματος, έχοντας τεχνικές διαχωρισμού όπως αέρια χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας (GC-MS), υγρή χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας (LC-MS), υγρή χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας σε σειρά (LC-MS/MS). Πέρα από τα θετικά στοιχεία που παρουσιάζουν αυτές οι τεχνικές, τα μειονεκτήματα της χρήσης της αέριας χρωματογραφίας συζευγμένης με φασματομετρία μάζας έχουν δυσκολέψει το έργο των επιστημόνων. Ειδικότερα, η τύπος της αναλυόμενης ουσίας που μπορεί να αναλυθεί χρησιμοποιώντας αυτή τη χρωματογραφική τεχνική (χαμηλό μοριακό βάρος, πτητικά) είναι περιοριστικό. Παρόλο που οι ενώσεις υψηλού μοριακού βάρους μπορούν να

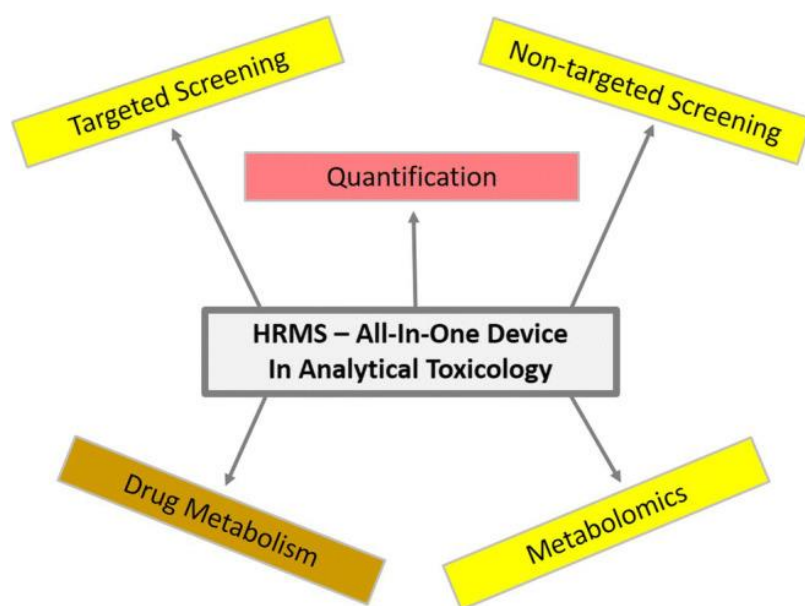
παραγωγοποιηθούν και να αναλυθούν με GC, η επεξεργασία του δείγματος δεν είναι ελκυστική για την ιατροδικαστική τοξικολογική ανάλυση φαρμάκων κατάχρησης, όπου η ταχύτητα ανάλυσης είναι θεμελιώδης. Ωστόσο, οι μέθοδοι τοξικολογικής ανάλυσης σε διάφορες μήτρες είναι καλά καθιερωμένες και χρησιμοποιούνται ευρέως στην ανάλυση φαρμάκων, προκειμένου να επιβεβαιωθεί η ιατροδικαστική τοξικολογία από δείγματα αίματος, ούρων, σάλιου και μαλλιών, μεταξύ άλλων, κατά τη διάρκεια ειδικής ανάλυσης διαλογής, επιδεικνύοντας υψηλή επιλεκτικότητα.⁽³⁶⁾

Η χρήση μιας μικροσκοπικής αναλυτικής μεθόδου είναι ο στόχος κατά την ανάπτυξη νέων αναλυτικών μεθόδων και η ανάλυση φαρμάκων κατάχρησης με φασματομετρία μάζας δεν αποτελεί εξαίρεση. Η φασματομετρία μάζας είναι η προτιμώμενη τεχνική όταν ο στόχος είναι να πραγματοποιηθεί μια γρήγορη ανάλυση απευθείας στο δείγμα. Η κύρια διαφορά μεταξύ των μεθόδων χρωματογραφίας-MS είναι η εισαγωγή του δείγματος. Τα όργανα MS αποτελούνται από πηγές ιόντων, τον αναλυτή μάζας και τον ανιχνευτή. Ωστόσο, η πρόκληση στην εγκληματολογική ανάλυση είναι η δυνατότητα μείωσης του χρόνου και του κόστους ανάλυσης ανά δείγμα. Μια κύρια αναλυτική εστίαση στην τοξικολογία είναι ο προσδιορισμός της παρουσίας ή απουσίας μεταβολιτών φαρμάκων σε βιολογικά δείγματα. Υπό αυτή την έννοια, η χρήση της τεχνικής επέτρεψε την ανάλυση του δείγματος χωρίς υπερβολική προετοιμασία.⁽³⁷⁾

3.3.1 Φασματομετρία μάζας υψηλής ανάλυσης

Τα τελευταία χρόνια η φασματομετρία μάζα υψηλής ανάλυσης (HRMS) συζευγμένη κυρίως με GC ή LC χρησιμοποιείται για την ανάλυση μικρών και μεγάλων μορίων στην αναλυτική τοξικολογία. Η HRMS αναπτύχθηκε τη δεκαετία του 1960 με φασματομέτρα μάζας διπλής εστίασης, αλλά σήμερα οι αναλυτές μάζας χρόνου πτήσης (TOF) ή Orbitrap (OT) είναι πιο συνηθισμένοι. Η υψηλή ανάλυση μάζας επιτρέπει τη διαφοροποίηση ισοβαρών ενώσεων με την ίδια μάζα αλλά διαφορετική στοιχειακή αναλογία. Έτσι, ίχνη μάζας ισοβαρών ενώσεων συνεκλουόμενων, π.χ. ενδογενών βιομορίων, μπορούν να αποκλειστούν αυξάνοντας την επιλεκτικότητα και συνεπώς την ευαισθησία της μεθόδου. Η στοιχειακή αναλογία ενός μορίου μπορεί να υπολογιστεί με ακριβή προσδιορισμό της μητρικής μάζας και των μαζών του θραύσματος που επιτρέπει την προσωρινή ταυτοποίηση άγνωστων ενώσεων, π.χ., συγκρίνοντας με λίστες των ακριβών μαζών και εμπειρικούς τύπους πιθανών δηλητηρίων. Ωστόσο, οι ισομερείς ενώσεις

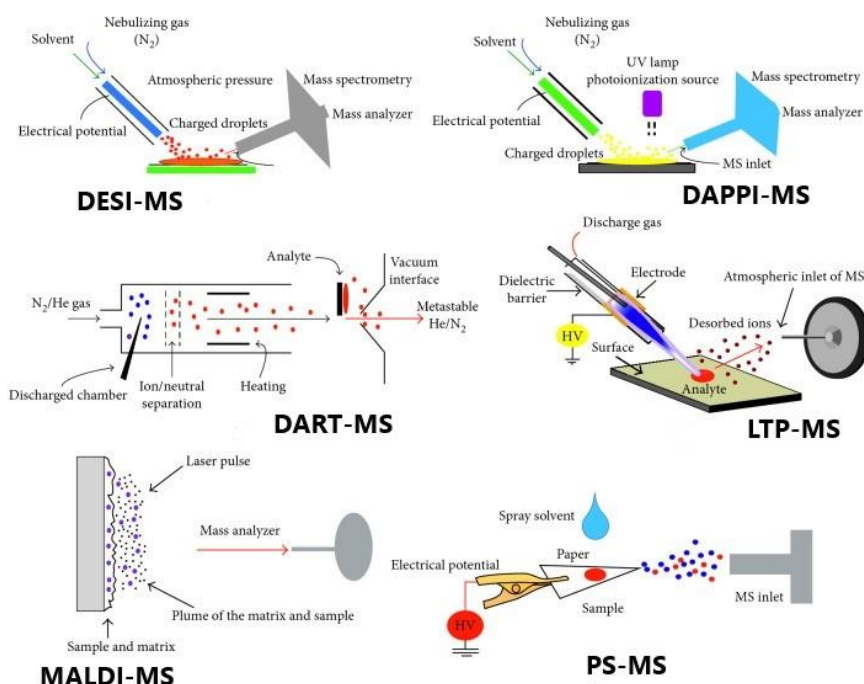
μπορούν να διαφοροποιηθούν μόνο με διαφορετικό κατακερματισμό. Ο αυξανόμενος αριθμός παρουσιάσεων της τεχνικής σε επιστημονικές συναντήσεις, αντίστοιχες πρωτότυπες εργασίες και άρθρα ανασκόπησης μπορεί να οδηγήσει στην υπόθεση ότι έχει ή θα γίνει η συσκευή «all-in-one» για στοχευμένο ή μη στοχευμένο έλεγχο, ποσοτικοποίηση, μεταβολισμό φαρμάκων και μεταβολομική στην αναλυτική τοξικολογία, συγκεκριμένα σε κλινική και ιατροδικαστική τοξικολογία, εγκληματολογική χημεία, έλεγχος ντόπινγκ κ.λπ. (Εικόνα 16).⁽³³⁻³⁵⁾



Εικόνα 16: Εφαρμογές της φασματομετρίας μάζας υψηλής ανάλυσης.⁽³³⁾

3.3.2 Φασματομετρία μάζας ιονισμού περιβάλλοντος

Τα αποδεικτικά στοιχεία θα σταλούν σε εγκληματολογικό εργαστήριο. Για να βοηθήσει στον εντοπισμό των αποδεικτικών στοιχείων που είναι πιο πολύτιμα, οι εγκληματολόγοι μπορεί να διεξάγουν αρχικές δοκιμές ελέγχου στη σκηνή. Αυτές οι δοκιμές μπορούν να είναι χρήσιμες για τον προσδιορισμό του τύπου της ουσίας που υπάρχει. Θέλοντας έτσι οι εγκληματολόγοι να μειώσουν το χρόνο ανάλυσης των δειγμάτων αλλά και ταυτόχρονα να πραγματοποιούν τις αναλύσεις στη σκηνή του εγκλήματος και με σύμμαχο την τεχνολογία, έπρεπε να εφαρμόσουν άλλες τεχνικές. Η φασματομετρία μάζας ιονισμού περιβάλλοντος μπορεί να χωριστεί ανάλογα με την τεχνική εκρόφησης που εφαρμόζεται. Οι κύριες τεχνικές ιονισμού περιβάλλοντος που χρησιμοποιούνται στην τοξικολογική εγκληματολογική ανάλυση και θα αναλύσουμε παρακάτω είναι η DESI-MS, η DAPPI-MS, η DART-MS, η LTP-MS, η MALDI-MS, η PS-MS. (Εικόνα 17).



Εικόνα 17: Κύριες τεχνικές ιονισμού περιβάλλοντος που χρησιμοποιούνται στην τοξικολογική εγκληματολογική ανάλυση.⁽³⁸⁾

Η DESI-MS χρησιμοποιείται στην εγκληματολογία λόγω της ικανότητάς της για *in situ* ανάλυση. Ωστόσο, οι άμεσες αναλύσεις που περιλαμβάνουν DESI (Ιοντισμός ηλεκτροψεκασμού εκρόφησης) και DAPPI (Φωτοϊονισμός ατμοσφαιρικής πίεσης εκρόφησης) είναι λιγότερο συχνές στην τοξικολογική ανάλυση λόγω των παρεμβολών που μπορεί να προκληθούν από την καταστολή του προϊόντος ιονισμού των επιδράσεων της μήτρας στα δείγματα. Επομένως, συχνά απαιτείται η προσθήκη ενός επιπλέον βήματος στην προετοιμασία του δείγματος. Η DESI-MS επέτρεψε επίσης την ανάλυση κοινών φαρμάκων σε δείγματα ούρων όπως η πεθιδίνη, η διφαινυδραμίνη, η νορτριπτυλίνη και η μεθαδόνη. Επιπλέον, η DAPPI-MS έχει χρησιμοποιηθεί σε συνδυασμό με παγίδα τετραπλού ιόντος MS και MS/MS σε σειρά για την απευθείας ανάλυση φυτικών προϊόντων.⁽³⁸⁻³⁹⁾

Οι τεχνικές που περιλαμβάνουν μετασταθερά και αντιδραστικά ιόντα, στα οποία το είδος αντιδρά με την αναλυόμενη ουσία άμεσα ή έμμεσα μέσω αντιδράσεων μεταφοράς πρωτονίων και φορτίου είναι οι πιο χρησιμοποιούμενες. Στην ανάλυση των ναρκωτικών κατάχρησης, η DART και η LTP μπορεί να χρησιμοποιηθούν χωρίς καμία αμφιβολία. Η DART είναι η προτιμώμενη τεχνική στην τοξικολογική ιατροδικαστική ανάλυση και χρησιμοποιεί μια αρνητικά πολωμένη εκκένωση πυράκτωσης ατμοσφαιρικής πίεσης από ένα σημείο σε ένα επίπεδο χαμηλότερου ρεύματος, που διαχωρίζονται φυσικά από την περιοχή ιονισμού με ένα ή περισσότερα ηλεκτρόδια. Τα μετασταθερά είδη σχηματίζονται

μέσα στο αέριο υποστήριξης εκκένωσης που τυπικά είναι He ή N₂, δημιουργώντας συστάδες πρωτονιωμένου νερού. Το κύριο πλεονέκτημα της DART είναι η ανάλυση δειγμάτων σε στερεά, αέρια και υγρή κατάσταση, ο χειρισμός πολικών και μη πολικών αναλυτών με μάζες κάτω του 1 kDa. Η DART έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως στην ανίχνευση μικρών φαρμάκων, αλλά η αναπαραγωγιμότητα της μεθόδου είναι μικρή και εξαρτάται από τη θέση του δείγματος μέσα στην πηγή ιόντων, καθιστώντας τον αριθμό των φαρμάκων που μπορούν να ποσοτικοποιηθούν πολύ περιορισμένο. ⁽⁴⁰⁾

Η τεχνική ψεκασμού χαρτιού (PS) εισήχθη το 2009 και έχει χρησιμοποιηθεί στην ανάπτυξη ενός ευρέος φάσματος ποσοτικών και ποιοτικών εφαρμογών. Εδώ, το δείγμα εναποτίθεται στο χαρτί με μια αιχμηρή αιχμή και παράγονται ιόντα από την τάση που εφαρμόζεται, ενώ το υπόστρωμα συγκρατείται από ένα μεταλλικό κλιπ στο χαρτί και τοποθετείται στο μπροστινό μέρος της εισόδου ενός φασματόμετρου μάζας. Στη συνέχεια, το μπροστινό φασματόμετρο μάζας εκτελεί την ανίχνευση μετά την έκλυση του δείγματος, η οποία μπορεί να πραγματοποιηθεί με τον ίδιο τρόπο μέσω της χρωματογραφίας χαρτιού, αλλά με άμεση έγχυση δείγματος στο φασματόμετρο μάζας. Σε αυτή την τεχνική, ένα ευρύ φάσμα χημικών ουσιών μπορεί να ιονιστεί με ψεκασμό χαρτιού, από μικρά μόρια έως μεγάλα βιομόρια. ⁽⁴¹⁾

Στη MALDI-MS (Φασματομετρία μάζας ιονισμού εκρόφησης λέιζερ με υποβοηθούμενη μήτρα), ένα διάλυμα που αποτελείται από την αναλυόμενη ουσία και μια κατάλληλη μήτρα τοποθετείται σε μια πλάκα MALDI, η οποία είναι συνήθως μια ειδικά σχεδιασμένη μεταλλική πλάκα. Μετά την εξάτμιση του διαλύτη, η αναλυόμενη ουσία και η μήτρα συν-κρυσταλλώνονται. Η μήτρα έχει συνήθως ισχυρή οπτική απορρόφηση είτε στην περιοχή υπεριώδους είτε στην υπεριώδη ακτινοβολία, και το λέιζερ που χρησιμοποιούνται είναι από αυτές τις φασματικές περιοχές. Συνεπώς, η μήτρα απορροφά σε μεγάλο βαθμό το φως του λέιζερ και στη συνέχεια διευκολύνει την πρωτονίωση ή αποπρωτονίωση των μορίων της αναλυόμενης ουσίας μέσω μιας σειράς διεργασιών όπως η αφαίρεση μήτρας και ο ιονισμός. Η MALDI-MS είναι μια φασματομετρική μέθοδος μάζας που χρησιμοποιεί μαλακό ιονισμό και είναι κατάλληλη για την ανάλυση βιομορίων όπως το DNA και οι πρωτεΐνες καθώς και οργανικών μορίων όπως τα πολυμερή, τα οποία τείνουν να είναι εύθραυστα και εύκολα κατακερματισμένα με τις συμβατικές τεχνικές ιονισμού. Ένα κοινό πρόβλημα για τα συμβατικά MALDI-MS είναι ότι τα περισσότερα βιοϋλικά είναι στερεά και μπορεί να μην διαλυθούν εύκολα από έναν διαλύτη. ⁽⁴²⁾

3.3.3 Ανίχνευση βαρέων μετάλλων σε βιολογικά δείγματα

Στις μέρες μας ο άνθρωπος εκτίθεται στα υψηλότερα επίπεδα τοξικών και βαρέων μετάλλων που προέρχονται από πολλές πηγές, δηλαδή από την καύση άνθρακα, φυσικού αερίου και πετρελαίου και αποτέφρωση αποβλήτων παγκοσμίως. Τέτοια μέταλλα αντιπροσωπεύουν μια κύρια αιτία γήρανσης, ασθενειών, ακόμη και γενετικών ελαττωμάτων. Επομένως, ο ακριβής και ακριβής προσδιορισμός αυτών των στοιχείων στα ανθρώπινα υγρά και ιστούς είναι εξαιρετικά σημαντικός. Σε αυτό το πλαίσιο, έχουν αναφερθεί πολλές αναλυτικές προσεγγίσεις για τον προσδιορισμό των βαρέων και τοξικών μετάλλων σε βιολογικά δείγματα. Ωστόσο, ο προσδιορισμός των τοξικών βαρέων μετάλλων, δευτερευόντων ορυκτών, ακόμη και σημαντικών στοιχείων στο ανθρώπινο σώμα είναι ένα κρίσιμο ζήτημα στον τομέα της εγκληματολογικής και τοξικολογικής κλινικής χημείας. Τα κύρια μέταλλα που υπάρχουν σε υψηλά επίπεδα όπως Na, K, Mg και Ca είναι ζωτικής σημασίας για το μεταβολισμό και τη δραστηριότητα του ανθρώπινου σώματος. Τα δευτερεύοντα μέταλλα που υπάρχουν σε χαμηλότερα επίπεδα όπως Mn, Fe, Co, Cu και Zn είναι επίσης απαραίτητα ως μεταβολικοί παράγοντες καθώς και ως καταλύτες ενζύμων. Τα ίχνη βαρέων και τοξικών μετάλλων (As, Al, Ag, Se, Pb, Ba, Cr, V, Cd, Hg, Ni, Ti και Sr) δεν πρέπει να υπάρχουν στο ανθρώπινο σώμα. Αν και το ανθρώπινο σώμα χρειάζεται ορισμένα μέταλλα για να διατηρήσει μια υγιή κατάσταση, η υπερβολική ποσότητα ενός ορυκτού μπορεί να γίνει τοξική. Επιπλέον, τα τοξικά και βαρέα μέταλλα είναι εξαιρετικά επικίνδυνα ακόμη και σε ίχνη και μπορεί να προκαλέσουν χρόνια ή οξεία δηλητηρίαση. Στην πραγματικότητα, αυτά τα μέταλλα είναι επιβλαβή και δεν έχουν καμία γνωστή λειτουργία στο ανθρώπινο σώμα. Η τοξικότητα αυτών των μετάλλων μπορεί να οδηγήσει σε πολλές ασθένειες ακόμη και στο θάνατο. ⁽⁸⁷⁻⁸⁹⁾

Μια μέθοδος υψηλής απόδοσης έχει αναπτυχθεί και επικυρωθεί για την ανάλυση βαρέων μετάλλων στο αίμα χρησιμοποιώντας επαγωγικά συζευγμένη φασματομετρία μάζας πλάσματος (ICP-MS) και με ένα ολοκληρωμένο σύστημα εισαγωγής δειγμάτων με διακριτή δειγματοληψία (ISIS-DS). Λόγω της πολύ υψηλής θερμοκρασίας του πλάσματος (8000 K), τα μέταλλα και τα μεταλλοειδή ιονίζονται και εστιάζονται σε έναν ανιχνευτή μάζας. Η διαδικασία ICP-MS είναι χρήσιμη, γρήγορη, ευαίσθητη καθώς αυτή η μέθοδος μπορεί να επιτρέψει τη διάγνωση παραβλέψεων ή σπάνιων δηλητηριάσεων. ⁽⁸⁷⁻⁸⁹⁾

Αξίζει να σημειωθεί ότι πριν από την ανάλυση, κάθε δείγμα που ερευνάται απαιτεί και διαφορετική προετοιμασία.

- Αίμα:

Για το πλάσμα ή το ολικό αίμα, υποβάλλονται σε χώνευση μεμονωμένα με 3 mL νιτρικού οξέος (69%) και 1,5 mL H₂O₂ (35% w/v). Στη συνέχεια, θερμαίνονται στους 200 °C για 20 λεπτά, και επακολούθως ψύξη έως ότου η θερμοκρασία φτάσει κάτω από τους 40 °C. Όλα τα δείγματα αίματος ομογενοποιούνται με στροβιλισμό για 2 λεπτά πριν τη μεταφορά με πιπέτα στο κλειστό δοχείο πέψης. Μετά από επαρκή ψύξη των δοχείων πέψης, τα προκύπτοντα διαυγή χωνευμένα διαλύματα αραιώνονται ποσοτικά με διπλά απεσταγμένο νερό πριν αναλυθούν με ICP-MS.

- Ούρα:

Ανάλογα με το στοιχείο, η αραιώση των ούρων είναι 1:10 ή 1:5. Και σε αυτή τη περίπτωση μικρή ποσότητα ούρων (0,5 mL) αναμιγνύονται με 3,6 mL νιτρικού οξέος

- Μαλλιά:

Για τα μαλλιά, μετά από απολύμανση με ζεστό νερό και ακετόνη, 25 mg μαλλιών αναμιγνύονται με 0,25 mL νιτρικού οξέος στους 70 °C για 1 ώρα. Έπειτα, 0,1 mL αυτού του διαλύματος αραιώνεται σε 3,9 mL διαλύματος που περιέχει 0,5% (v/v) βουτανόλη, 0,65% (v/v) νιτρικό οξύ, και 0,01% (v/v) Triton.

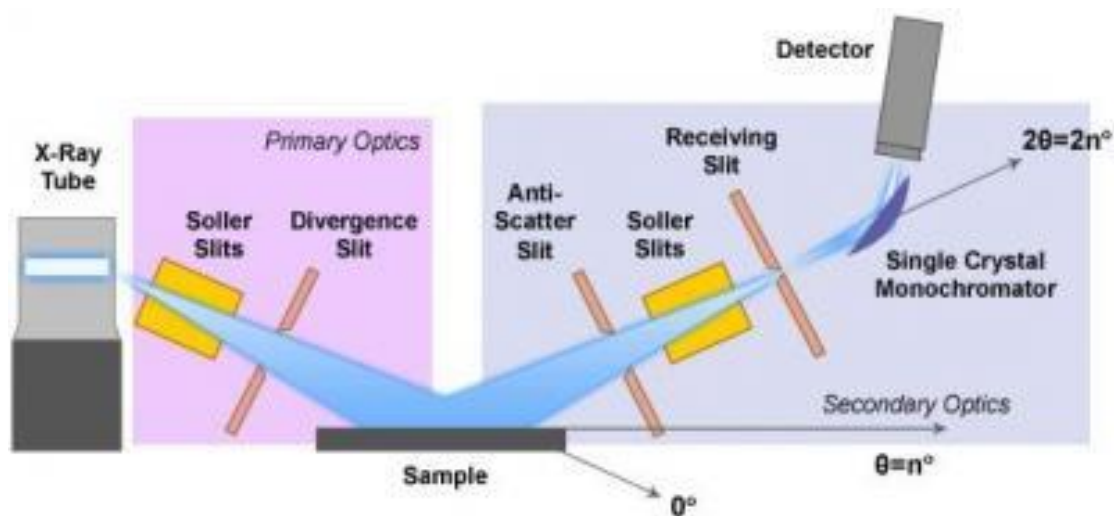
Για την ανάλυση βαρέων μετάλλων χρησιμοποιείται η επαγωγικά συζευγμένη φασματομετρία μάζας πλάσματος (ICP-MS) με ένα ολοκληρωμένο σύστημα εισαγωγής δειγμάτων με διακριτή δειγματοληψία (ISIS-DS). Οι αναλύσεις εκτελούνται χρησιμοποιώντας τη λειτουργία σύγκρουσης ηλίου στο όργανο. Το ICP-MS έχει κάνει σημαντικές προόδους στον τομέα της κλινικής βιολογίας, ιδιαίτερα στην τοξικολογική ανάλυση. Αυτό οφείλεται στη χρήση εξαιρετικά αποτελεσματικού εξοπλισμού που επιτρέπει τη βέλτιστη κλινική, ιατροδικαστική, επαγγελματική και περιβαλλοντική αξιολόγηση της κατάστασης των μετάλλων και των μεταλλοειδών για κάθε άτομο. Το ICP-MS θα πρέπει να θεωρείται γρήγορο και αποτελεσματικό τοξικολογικό εργαλείο.⁽⁸⁷⁻⁸⁹⁾

3.4 Περίθλαση ακτίνων X

Η περίθλαση ακτίνων X (*X Ray Diffraction, XRD*) είναι μια μη καταστροφική αναλυτική τεχνική που παρέχει λεπτομερείς πληροφορίες σχετικά με την κρυσταλλογραφική δομή, τη χημική σύνθεση και τις φυσικές ιδιότητες ενός δείγματος.

Βασίζεται στην εποικοδομητική παρεμβολή μονοχρωματικών ακτίνων X και ενός κρυσταλλικού δείγματος. Οι ακτίνες X είναι ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία μικρότερου μήκους κύματος που παράγονται όταν επιβραδύνονται ηλεκτρικά φορτισμένα σωματίδια με επαρκή ενέργεια. Στην XRD (Εικόνα 18), οι παραγόμενες ακτίνες X ευθυγραμμίζονται και κατευθύνονται σε ένα δείγμα, όπου η αλληλεπίδραση των προσπίπτων ακτίνων με το δείγμα παράγει μια διαθλασμένη ακτίνα, η οποία στη συνέχεια ανιχνεύεται, επεξεργάζεται και μετράται.⁽¹¹⁾

Η XRD εφαρμόζεται στη μελέτη του χρόνου θανάτου (PMI). Ειδικότερα, η XRD χρησιμοποιείται για το προσδιορισμό του χρόνου θανάτου από οστά. Αυτό επιτυγχάνεται με ότι ο βαθμός κρυσταλλικότητας του υδροξυαπατίτη (συστατικό των οστών) αυξάνεται κατά τη μεταθανάτια διαδικασία αποδόμησης, δείχνοντας έτσι μεγαλύτερο μέγεθος κρυστάλλου και συνεπώς καλύτερα αποτελέσματα. Είναι γρήγορη, φθηνή τεχνική για τη μελέτη στερεών με μια μη επεμβατική μέθοδο και απαιτούν μόνο μια μικρή ποσότητα δείγματος για ανίχνευση (<1 mg) με εντελώς μη καταστροφικό τρόπο.⁽⁴³⁾



Εικόνα 18: Σχηματική απεικόνιση της XRD.⁽⁴³⁾

3.4.1 Ανάλυση των στοιχείων του εδάφους είναι ζωτικής σημασίας για τη συσχέτιση σκηνών εγκλήματος, εργαλείων και ατόμων

Τα δείγματα εδάφους είναι σημαντικά ίχνη αποδεικτικών στοιχείων που μπορούν να βρεθούν σε πολλές διαφορετικές περιπτώσεις, π.χ. στα ελαστικά ενός ύποπτου οχήματος, σε εργαλεία εγκληματικότητας και στα παπούτσια των υπόπτων. Το έδαφος είναι πολύ

περίπλοκο, αποτελούμενο από μέταλλα, οργανικές ουσίες, νερό, οργανισμούς, καθώς και αμέτρητους τύπους ανθρωπογενών σωματιδίων. Η κατανομή του εδάφους επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες, όπως το κλίμα, το γεωγραφικό περιβάλλον και τις ανθρώπινες δραστηριότητες. Ως εκ τούτου, η κατανομή του εδάφους παρουσιάζει κανονικά χαρακτηριστικά. Στην Κίνα, για παράδειγμα, υπάρχουν μαύρα εδάφη, μαύρα ασβεστούχα εδάφη, ασβεστούχα εδάφη κεχρί, καστανά ασβεστούχα εδάφη και καστανά εδάφη της ερήμου που κατανέμονται από την ανατολή προς τη δύση. Έτσι, η εξέταση των αποδεικτικών στοιχείων του εδάφους είναι σημαντική για τη συσχέτιση των σκηνών του εγκλήματος, των εργαλείων και των ατόμων που εμπλέκονται, ειδικά όταν η διερεύνηση του τόπου του εγκλήματος και η αυτοψία δεν παρέχουν επαρκείς πληροφορίες.⁽⁹⁰⁻⁹¹⁾

Οι συνήθεις μέθοδοι για την ανάλυση εδάφους περιλαμβάνουν την ανάλυση χρώματος (χρωματομετρία Munsell), τη στοιχειακή ανάλυση (ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης- φασματομετρία διασποράς ενέργειας (SEM-EDS), το φθορισμό ακτίνων X (XRF), και την επαγωγικά συζευγμένη φασματομετρία πλάσματος-μάζας (ICP-MS), καθώς και την ανάλυση ορυκτών με χρήση της περίθλασης ακτίνων X (XRD). Αυτές οι μέθοδοι μπορούν να περιγράψουν τις διάφορες ιδιότητες των στοιχείων του εδάφους, αλλά για μεγάλο αριθμό δειγμάτων, είναι δύσκολο να συγκριθούν άμεσα τα αποτελέσματα του πειράματος για να καταστεί δυνατή η διαφοροποίηση και η ταξινόμηση των εδαφών. Ως εκ τούτου, είναι απαραίτητο να εισαχθούν χημειομετρικές μέθοδοι για να βοηθήσουν στην κρίση των αποτελεσμάτων της ανάλυσης.⁽⁹⁰⁻⁹¹⁾

Σε κάθε τόπο εγκλήματος ή σε κάποιο αντικείμενο που έχουν βρεθεί χώματα, τα επιφανειακά υπολείμματα και τα απορρίμματα φύλλων αφαιρούνται και στη συνέχεια συλλέγονται σε φιαλίδια. Τα δείγματα του εδάφους ξηραίνονται φυσικά στον αέρα για 24-48 ώρες και στη συνέχεια συνθλίβονται ελαφρά χρησιμοποιώντας γουδί και γουδοχέρι για να σπάσουν τυχόν συσσωματώματα και τελικά κοσκινίζονται σε ξηρό μέρος. Το κλάσμα < 38 μm συλλέγεται για ανάλυση.⁽⁹⁰⁻⁹¹⁾

Περίπου 50 mg του εδάφους που παρασκευάστηκε παραπάνω τοποθετούνται σε σωλήνα φυγοκέντρησης 10 mL, προστίθονται 7 mL διαλύματος $MgCl_2$ 0,5 M και αναδεύονται για 5 λεπτά και στη συνέχεια το δείγμα φυγοκεντρείται στις 2000 rpm για 1 λεπτό. Το υπερκείμενο χύνεται και αυτό το στάδιο πλύσης επαναλαμβάνεται τρεις φορές. Στη συνέχεια, προστίθονται 7 mL διαλύματος γλυκερίνης (γλυκερίνη: νερό, 1:9, v/v), το μίγμα αναδεύεται επιμελώς για 5 λεπτά και στη συνέχεια φυγοκεντρείται στις 5000 rpm για 2 λεπτά. Το υπερκείμενο αποχύνεται και αυτό το στάδιο πλύσης επαναλαμβάνεται δύο

φορές. Στη συνέχεια, το πλυμένο χώμα διασκορπίζεται καλά σε νερό. Το εναιώρημα εδάφους στη συνέχεια χύνεται σε γυάλινη αντικειμενοφόρο πλάκα και στεγνώνει φυσικά για ανάλυση XRD. ⁽⁹⁰⁻⁹¹⁾

Τα ορυκτά είναι ένα από τα πιο σημαντικά συστατικά του εδάφους. Για την ακρίβεια της εδαφολογικής ανάλυσης, εκτός από χρώματα και στοιχεία, έχουμε αναλύσει και τα ορυκτά σε δείγματα εδάφους. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης με XRD μπορεί να δείξουν ότι υδρομίκας, καολινίτης, χλωρίτης, χαλαζίας, άστριος, ασβεστίτης και αιματίτης υπάρχουν σε δείγματα που περιέχουν χώματα. Με βάση τα αποτελέσματα προσδιορισμού των αναλύσεων χρώματος, στοιχείων και ορυκτών, σε συνδυασμό με τη στατιστική προσέγγιση, η πηγή του δείγματος μπορεί να προσδιοριστεί με απόλυτη εγκυρότητα. ⁽⁹⁰⁻⁹¹⁾

3.5 Φασματοσκοπία Raman

Μέσα στις τεχνικές που έχουν πρωτοπορήσει αλλού μπορούν να έχουν εφαρμογές στην εγκληματολογική επιστήμη είναι φασματοσκοπία Raman. Η φασματοσκοπία Raman είναι μια τεχνική που λαμβάνει πληροφορίες σχετικά με τον τρόπο δόνησης των μορίων σε ένα σύστημα που διεγείρεται από την ανελαστική (Raman) σκέδαση μονοχρωματικού φωτός. Χρησιμοποιείται στην αναλυτική χημεία, καθώς διαφορετικοί χημικοί δεσμοί έχουν χαρακτηριστικές δονητικές εξόδους, επιτρέποντας στα προκύπτοντα φάσματα να αναλυθούν για να προσδιοριστεί ποιοι χημικοί δεσμοί υπάρχουν σε ένα δείγμα. ⁽¹¹⁾

Τα τελευταία χρόνια, ιατροδικαστικοί αναλυτές και ερευνητές προσπάθησαν να επιλέξουν τη φασματοσκοπία Raman ως εργαλείο για την εγκληματολογική έρευνα. Η μέθοδος χρησιμοποιείται από τους εγκληματολόγους καθώς τα σωματικά υγρά που αναλύονται με φασματοσκοπία Raman εμφανίζουν τις δικές τους μοναδικές κορυφές, καθιστώντας τα αποτελέσματα σχετικά απλά στην ανάλυση συγκρίνοντάς τα με τις γνωστές φασματικές κορυφές διαφόρων βιολογικών ουσιών. Η φασματοσκοπία Raman είναι επίσης μια επιβεβαιωτική δοκιμή, καθώς η θέση των φασματικών κορυφών συνδέεται με συγκεκριμένα μόρια και επομένως είναι εξαιρετικά απίθανο να εμφανίσει ψευδώς θετικά αποτελέσματα. ⁽⁴⁴⁻⁴⁵⁾

Ένα άλλο πλεονέκτημα της φασματοσκοπίας Raman στον εγκληματολογικό τομέα είναι ότι δεν είναι καταστροφική για το δείγμα (καθώς δεν απαιτείται επαφή με το δείγμα) και δεν απαιτεί χρονοβόρα βήματα κατεργασίας του δείγματος. Τα τελευταία χρόνια έχουν

αναπτυχθεί αρκετές επιτόπιες συσκευές φασματοσκοπίας Raman, οι οποίες έχουν αποδειχθεί ότι λειτουργούν αποτελεσματικά στην επιτόπια ανίχνευση χημικών και βιολογικών δειγμάτων. Αυτές οι συσκευές είναι απλές στη χρήση και προσφέρουν γρήγορα αποτελέσματα. Η φορητή φασματοσκοπία Raman διαθέτει πολλές από τις «ιδανικές» επιτόπιες δοκιμές, αλλά είναι πιο δαπανηρή από την ανίχνευση που βασίζεται σε χημικά αντιδραστήρια και μπορεί να απαιτεί κάποια εκπαίδευση πριν από τη χρήση, προκειμένου να διασφαλιστεί ότι τα αποτελέσματα ερμηνεύονται σωστά. Καθώς η μόνη απαίτηση για τη φασματοσκοπία Raman είναι να υπάρχει μια οπτικά ορατή κηλίδα, δεν χρειάζεται να υπάρχουν αντιδραστήρια για την ανάλυση των αγνώστων λεκέδων. Αυτό σημαίνει ότι δεν υπάρχουν σχετικές απαιτήσεις αποθήκευσης ή ημερομηνία λήξης των οργάνων Raman, γεγονός που το καθιστά ιδανικό για χρήση σε αποκεντρωμένες τοποθεσίες. ⁽⁴⁴⁻⁴⁵⁾

3.5.1 Προσδιορισμός της σύστασης των μελανιών που χρησιμοποιούνται σ'ένα έγγραφο

Ένα «αμφισβητούμενο» έγγραφο μπορεί να είναι οποιοδήποτε γραπτό έγγραφο του οποίου η πηγή ή η αυθεντικότητα είναι αμφίβολη. Οι δικαστικοί εξεταστές εγγράφων (FDE) χειρίζονται διαφορετικούς τύπους αμφισβητούμενων εγγράφων, π.χ. επιστολές, επιταγές, έγγραφα ταυτότητας, συμβόλαια, διαθήκες, ασφαλιστικές αξιώσεις, αναφορές, απειλητικές επιστολές, σημειώματα αυτοκτονίας, λαχεία, τα οποία μπορούν να βρεθούν σε διάφορες ποινικές έρευνες. Οι εξετάσεις εγγράφων συνήθως ξεκινούν με την πρόβλεψη του τύπου της συσκευής που χρησιμοποιείται για την παραγωγή του εγγράφου (στυλό, μολύβια, φωτοτυπικά μηχανήματα, εκτυπωτές, σφραγίδες, σφραγίδες κ.λπ.) , ακολουθούμενη από φυσική και χημική ανάλυση μελανιών, όπου ζητείται από τον FDE να ελεγχθεί εάν τυχόν γραπτές καταχωρήσεις μπορεί να έχουν προστεθεί ή τροποποιηθεί, να συγκριθούν δύο ή περισσότερες συνεισφορές μελανιού και να καθορίσουν εάν αυτές παρουσιάζουν παρόμοια σύνθεση, να προσδιοριστεί η πιθανή πηγή του μελανιού, να προσδιοριστεί η χρονολογική σειρά δύο ή περισσότερων μελανιών που τέμνονται μεταξύ τους και τέλος να χρονολογήσουν τα μελάνια. ⁽⁹²⁻⁹³⁾

Προτιμώνται οι μη καταστροφικές εξετάσεις, καθώς είναι απλούστερες στην εκτέλεση, περιλαμβάνουν ελάχιστο ή καθόλου χειρισμό του εγγράφου και μπορούν να παρέχουν επαρκείς πληροφορίες χωρίς απώλεια της αποδεικτικής αξίας των εγγράφων. Αυτά περιλαμβάνουν οπτικές εξετάσεις χρησιμοποιώντας το μικροσκόπιο, φίλτρα που

ενισχύουν τη διαφορετική αντίθεση μεταξύ των μελανιών και την οπτική διέγερση κάτω από διάφορα μήκη κύματος φωτός. Ωστόσο, τέτοιες εξετάσεις είναι απλώς ποιοτικές και εξαρτώνται από την κρίση του FDE. Επιπλέον, αν και αυτές οι τεχνικές είναι πολύ ευαίσθητες σε μικρές ποσότητες μελανιού, η διακριτική ισχύς που επιτυγχάνεται με μελάνια που παρουσιάζουν παρόμοια φωταύγεια είναι περιορισμένη.⁽⁹²⁻⁹³⁾

Κατά συνέπεια, η ανάπτυξη πιο ενημερωτικών και αποτελεσματικών εργαλείων για εξετάσεις εγγράφων ερωτήσεων καθίσταται απαραίτητη και ταυτόχρονα αποτελεί πρόκληση, καθώς οι μέθοδοι παραποίησης και τροποποίησης εγγράφων γίνονται πιο εξελιγμένες. Η φασματοσκοπία Raman έχει αποκτήσει γρήγορα ενδιαφέρον για την ανάλυση μελάνης των αμφισβητούμενων εγγράφων επειδή παρέχει επίσης σχετικές χημικές πληροφορίες σχετικά με τη σύνθεση της μελάνης με ελάχιστες ή καθόλου συνεισφορές από το χαρτί. Επιπλέον, αυτή η τεχνική δόνησης εκτελεί τις αναλύσεις απευθείας στο έγγραφο, απαιτεί μόνο μικρή ποσότητα μελανιού, οι χρόνοι ανάλυσης είναι γρήγοροι και το πιο σημαντικό είναι μη καταστροφική. Οι πρόσφατες τεχνολογικές εξελίξεις με τα όργανα επέτρεψαν επίσης σε αυτήν την τεχνική να παρέχει ισχυρά και αναπαραγώγιμα αποτελέσματα.⁽⁹²⁻⁹³⁾

Η φασματοσκοπία Raman αποτελείται από δείγματα ακτινοβολίας με μονοχρωματική δέσμη λέιζερ που αλληλεπιδρά με τα μόρια που προέρχονται από ένα διάσπαρτο φως. Το φως που σκεδάζεται με διαφορετική συχνότητα από τα προσπίπτοντα φωτόνια (ανελαστική σκέδαση) καταγράφεται για να κατασκευάσει ένα φάσμα Raman που είναι χαρακτηριστικό για τη μοριακή δομή, επιτρέποντας την αναγνώρισή του. Δεδομένου του γεγονότος ότι τα μελάνια είναι πολύπλοκα μείγματα άγνωστων συστατικών, η μοριακή αναγνώριση όλων των συγκεκριμένων συστατικών μελανιού με χρήση της φασματοσκοπίας Raman μπορεί μερικές φορές να είναι δύσκολη υπόθεση. Αντίθετα, η σύγκριση φασματικών δακτυλικών αποτυπωμάτων χρησιμοποιείται κατά προτίμηση για τη διαφοροποίηση των μελανιών σε εγκληματολογικά πλαίσια. Η σύγκριση περιλαμβάνει την εξέταση του συνολικού σχεδίου των φασμάτων, καθώς και των διαφορών στις θέσεις της ζώνης (παρουσία ή απουσία σε συγκεκριμένες τιμές μετατόπισης), στις εντάσεις της ζώνης (ευρεία ή απότομη) και στις σχετικές εντάσεις των γειτονικών ζωνών. Οι απόλυτες εντάσεις των ζωνών δεν χρησιμοποιούνται επειδή εξαρτώνται από διάφορους παράγοντες όπως ο προσανατολισμός, η ισχύς λέιζερ και άλλα όργανα που δεν μπορούν να αναπαραχθούν με αξιοπιστία.⁽⁹²⁻⁹³⁾

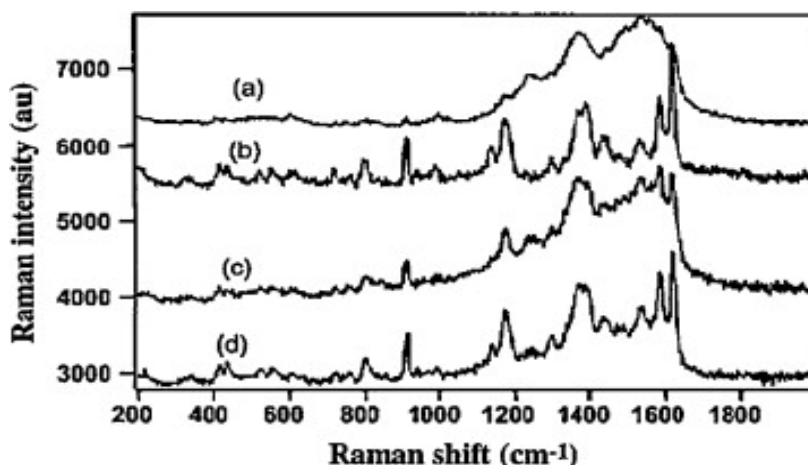
Υπάρχουν δύο κύρια μειονεκτήματα που σχετίζονται με αυτήν την τεχνική. Πρώτον, η χαμηλή ευαισθησία λόγω της φυσικά αδύναμης σκέδασης Raman και δεύτερον τα έντονα σήματα φθορισμού που παρουσιάζονται από πολλά μελάνια ή χαρτί, που καλύπτει τις επιθυμητές χημικές πληροφορίες. Η αύξηση της ευαισθησίας των οργάνων μπορεί να επιτευχθεί με την εκτέλεση φασματοσκοπίας συντονισμού Raman (*Resonance Raman Spectroscopy, RRS*). Το RRS αποτελείται από τη χρήση ενός μήκους κύματος λέιζερ παρόμοιο με τη μέγιστη απορρόφηση του χρωμοφόρου μελάνης για την πρόκληση ενός φαινομένου ηλεκτρονικού συντονισμού. Μια άλλη τεχνική που ενισχύει το σήμα σκέδασης και επίσης σβήνει τον φθορισμό είναι η φασματοσκοπία Raman ενισχυμένη επιφάνειας (*Surface-Enhanced Raman Spectroscopy, SERS*). Το SERS απαιτεί μια διεισδυτική προεπεξεργασία του δείγματος, χρησιμοποιώντας είτε μια επιφάνεια τραχυμένου μετάλλου σε νανοκλίμακα είτε κολλοειδή μετάλλων από χρυσό ή ασήμι, η οποία εμποδίζει τη φυσική εξέταση των εγγράφων. Υπάρχουν χημικές και ηλεκτρομαγνητικές επιδράσεις που προκαλούν την ενίσχυση. Ανάλογα με το μήκος κύματος διέγερσης, το ένα ή το άλλο μπορεί να κυριαρχεί στο φάσμα. Τελικά, ο συνδυασμός τεχνικών RRS και SERS (δηλ. φασματοσκοπία Raman ενισχυμένου συντονισμού επιφανείας (SERRS)) μπορεί να αυξήσει την ευαισθησία έως και δέκα τάξεις μεγέθους σε σύγκριση με τη φασματοσκοπία Raman.

Τα εγκληματολογικά εργαστήρια συναντούν συστηματικά στοιχεία μελάνης που προέρχονται από στυλό κατά τη διάρκεια των ερευνών τους. Τα μελάνια που εμπεριέχονται στα στυλό είναι παχύρρευστα υγρά κατασκευασμένα από ένα μείγμα πολλών χρωστικών και αυτών που παρέχουν το χρώμα, οργανικούς διαλύτες, ρητίνες που διατηρούν το σωστό ιξώδες και τις ιδιότητες πρόσφυσης, καθώς και άλλους παράγοντες όπως αντιοξειδωτικά, συντηρητικά και ιχνοστοιχεία. Η λεπτομερής σύνθεση των μελανιών των στυλό είναι αποκλειστική για κάθε μάρκα και κατασκευαστή και συνήθως κρατείται μυστική. Αυτό περιπλέκει τις έρευνες αφού οι ερευνητές πρέπει να αναλύσουν ένα δείγμα της εν λόγω μελάνης και να προσδιορίσουν τις συνθέσεις χρησιμοποιώντας τους δικούς τους πόρους.

Σήμερα, σχεδόν όλα τα γραφεία και τα νοικοκυριά είναι εξοπλισμένα με εκτυπωτή. Τα μελάνια εκτύπωσης αποτελούνται γενικά από τέσσερα βασικά συστατικά: χρωστικές ουσίες, ρητίνες, διαλύτες και πρόσθετα. Ενώ οι εκτυπωτές του τύπου inkjet χρησιμοποιούν φυσίγγια υγρών όξινων χρωστικών τεσσάρων διαφορετικών χρωμάτων (κυανό, ματζέντα, κίτρινο και μαύρο) που συνδυάζονται για να σχηματίσουν τα υπόλοιπα χρώματα, οι εκτυπωτές λέιζερ χρησιμοποιούν τόνερ υγρών ή ξηρών ρητινωδών σωματιδίων μελανιού. Πολλές από τις ιατροδικαστικές εξετάσεις των αμφισβητούμενων εγγράφων

περιλαμβάνουν έντυπα έγγραφα και ο FDE αμφισβητείται με τη μεγάλη ποικιλία εκτυπωτών, καθώς είναι οι τύποι εκτυπωτών που συναντώνται πιο συχνά με laser και inkjet. Επιπλέον, η διάκριση των μελανιών των εκτυπωτών με βάση τη χημική ανάλυση γίνεται δυσκολότερη δεδομένου του γεγονότος ότι τα δοχεία μπορούν να είναι μιας χρήσης και να ξαναγεμίζονται με μελάνι από προμηθευτές διαφορετικούς από τον κατασκευαστή του εκτυπωτή, τα οποία είναι συχνά λιγότερο ακριβά και περιέχουν διαφορετική χημική σύνθεση.⁽⁹²⁻⁹³⁾

Πολύ συχνά ζητείται από το FDE να καθορίσει εάν ένα έγγραφο έχει τροποποιηθεί ή όχι σε μεταγενέστερο στάδιο ή εάν η υπογραφή που εμφανίζεται σε μια σύμβαση έχει γίνει σε μια κενή σελίδα. Αυτό συνήθως απαιτεί να εξετάζονται οι περιοχές όπου τέμνονται οι γραμμές και να καθοριστεί ποια γραμμή γράφτηκε τελευταία. Ενώ οι περισσότερες από τις διασταυρώσεις περιλαμβάνουν μελάνια γραφής, μπορεί επίσης να περιλαμβάνουν γραφομηχανή, τυπωμένο σε υπολογιστή κείμενο, πτυχώσεις χαρτιού και εσοχές. Κατ' αρχήν, δύο γραμμές που προέρχονται από διαφορετικά μελάνια που τέμνονται μεταξύ τους θα δείχνουν διαφορετικά φάσματα Raman (Εικόνα 19). Επομένως, είναι απλό εάν και τα δύο μελάνια σχηματίζουν ένα ξεχωριστό στρώμα το ένα πάνω στο άλλο: στο σημείο τομής, το φάσμα Raman στην επιφάνεια θα εμφανίζει περισσότερα χαρακτηριστικά του μελανιού από πάνω και το φάσμα Raman σε ένα βαθύτερο στρώμα θα δείχνει περισσότερα χαρακτηριστικά του μελανιού από κάτω. Ωστόσο, όταν δύο μελάνια διαχέονται μερικώς ή ακόμη και πλήρως το ένα στο άλλο, ο FDE έχει μεγάλη δυσκολία να διακρίνει τη σειρά των δύο μελανιών. Επιπλέον, τα πιο σκούρα χρώματα προκαλούν την οπτική ψευδαίσθηση ότι βρίσκονται πάνω από τα πιο ανοιχτόχρωμα, είτε αυτό συμβαίνει στην πραγματικότητα είτε όχι.⁽⁹²⁻⁹³⁾



Εικόνα 19: Φάσματα Raman διάφορων μελανιών που υπάρχουν σ' ένα υπό ανάλυση έγγραφο.⁽⁹³⁾

4. Μοριακές εργαστηριακές τεχνικές

Μία από τις παλαιότερες μορφές βιολογικής εγκληματολογικής ανάλυσης είναι η αναγνώριση σωματικών υγρών όπως το αίμα, το σάλιο και το σπέρμα που αφήνονται πίσω σε έναν τόπο εγκλήματος. Ο Πίνακας 2 παρέχει μια επισκόπηση των πιο κοινών καθιερωμένων μοριακών εγκληματολογικών δοκιμών που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση και την ταυτοποίηση βιολογικού υλικού. Μια πιο εμπεριστατωμένη επισκόπηση των μηχανισμών των τυπικών μεθόδων ανίχνευσης και ταυτοποίησης σωματικών υγρών είναι διαθέσιμη παρακάτω.

Πίνακας 2: Μοριακές τεχνικές για τη ταυτοποίηση βιολογικών υλικών.

Μέθοδος	Δείγμα	Μοριακός στόχος
RSID	Ακατέργαστο δείγμα	GPA/α-αμυλάση/σεμενογελίνη
ELISA	Ακατέργαστο δείγμα	Αιμοσφαιρίνη/PSA, SVSA/α-αμυλάση
PCR	Καθαρό DNA	Ολόκληρο γονιδίωμα

4.1 Ανοσολογικές τεχνικές

Η αύξηση της ευαισθησίας και της ειδικότητας των μεθόδων συχνά απαιτεί τη χρήση πιο περίπλοκης δοκιμής και την τεχνογνωσία που απαιτείται για τη χρήση και την ερμηνεία του αποτελέσματος. Οι ανοσοδοκιμασίες είναι βιομοριακές τεχνικές για την ανίχνευση ή την ποσοτική μέτρηση των επιπέδων των βιοδεικτών σε ένα υγρό δείγμα χρησιμοποιώντας μια αλληλεπίδραση αντισώματος-αντιγόνου. Οι ανοσοδοκιμασίες στο εργαστήριο, όπως η ενζυμική ανοσοπροσροφητική δοκιμασία (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA*) είναι καθιερωμένες και έχουν πολύ υψηλή ειδικότητα και ευαισθησία, και τα τελευταία χρόνια έχει γίνει προσπάθεια να εφαρμοστεί αυτή η τεχνολογία εκτός εργαστηρίου. ⁽⁴⁶⁻⁴⁷⁾

Η ενζυμική ανοσοπροσροφητική δοκιμασία (ELISA) είναι μια ετερογενής τεχνική που χρησιμοποιείται σε κλινικές αναλύσεις. Σε αυτόν τον τύπο ανάλυσης, ένα από τα συστατικά της αντίδρασης προσροφάται μη ειδικά ή ομοιοπολικά, δεσμεύεται στην επιφάνεια μιας στερεάς φάσης, όπως ένα φρεάτιο μικροτιτλοδότησης, ένα μαγνητικό σωματίδιο ή ένα πλαστικό σφαιρίδιο. Αυτή η προσάρτηση διευκολύνει τον διαχωρισμό δεσμευμένων και ελεύθερα επισημασμένων αντιδραστηρίων. Στην πιο κοινή προσέγγιση για τη χρήση της τεχνικής ELISA, ένα κλάσμα δείγματος ή βαθμονομητή που περιέχει το

αντιγόνο (Ag) που πρόκειται να ποσοτικοποιηθεί προστίθεται και αφήνεται να συνδεθεί με ένα αντίσωμα στερεάς φάσης (Ab). Μετά το πλύσιμο, προστίθεται ένα σημασμένο με ένζυμο αντίσωμα και σχηματίζει ένα «σύμπλεγμα σάντουιτς» ενζύμου στερεάς φάσης Ab-Ag-Ab. Το μη δεσμευμένο αντίσωμα στη συνέχεια ξεπλένεται και προστίθεται το ενζυμικό υπόστρωμα. Η ποσότητα του παραγόμενου προϊόντος είναι ανάλογη με την ποσότητα του αντιγόνου στο δείγμα. ⁽⁴⁶⁻⁴⁷⁾

Τα ειδικά αντισώματα σε ένα δείγμα μπορούν επίσης να ποσοτικοποιηθούν χρησιμοποιώντας μια διαδικασία ELISA στην οποία αντιγόνο αντί για αντίσωμα δεσμεύεται σε μια στερεά φάση. Το δεύτερο αντιδραστήριο είναι ένα σημασμένο με ένζυμο αντίσωμα ειδικό για το αντίσωμα της αναλυόμενης ουσίας. Επιπλέον, οι αναλύσεις ELISA έχουν χρησιμοποιηθεί εκτενώς για την ανίχνευση αντισωμάτων σε ιούς και αυτοαντιγόνα στον ορό ή το πλήρες αίμα. Επιπλέον, συζεύγματα ενζύμων σε συνδυασμό με υποστρώματα που παράγουν ορατά προϊόντα έχουν χρησιμοποιηθεί για την ανάπτυξη αναλύσεων τύπου ELISA με αποτελέσματα που μπορούν να ερμηνευτούν οπτικά. Τέτοιες αναλύσεις είναι πολύ χρήσιμες σε εφαρμογές προσυμπτωματικού ελέγχου, σημείου φροντίδας και δοκιμών στο σπίτι. ⁽⁴⁶⁻⁴⁷⁾

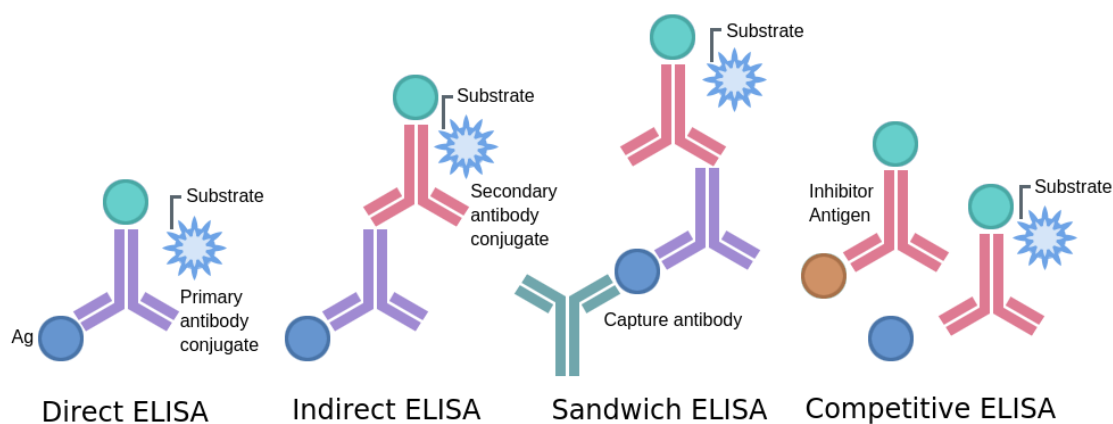
Υπάρχουν τρία βασικά βήματα για την επιτυχή ολοκλήρωση της τεχνικής ELISA. Αυτά τα βήματα περιλαμβάνουν την επικάλυψη (είτε με αντιγόνο είτε με αντίσωμα), τον αποκλεισμό (συνήθως με την προσθήκη BSA) και την ανίχνευση. Η ELISA εκτελείται σε πλάκες πολυστυρενίου, συνήθως πλάκες 96 φρεατίων επικαλυμμένες για να δεσμεύουν ισχυρά την πρωτεΐνη. Ανάλογα με τον τύπο ELISA, η δοκιμή απαιτεί πρωτογενές και/ή δευτερογενές αντίσωμα ανίχνευσης, αναλύτη/αντιγόνο, αντίσωμα/αντιγόνο επικάλυψης, ρυθμιστικό διάλυμα, έκπλυση και υπόστρωμα/χρωμογόνο. Το πρωτεύον αντίσωμα ανίχνευσης είναι ένα ειδικό αντίσωμα που συνδέεται μόνο με την πρωτεΐνη ενδιαφέροντος. Αντίθετα, ένα δευτερεύον αντίσωμα ανίχνευσης είναι ένα δεύτερο συζευγμένο με ένζυμο αντίσωμα που συνδέεται με ένα πρωτογενές αντίσωμα που δεν είναι συζευγμένο με ένζυμο. ⁽⁴⁶⁻⁴⁷⁾

Σε κάθε σκηνή εγκλήματος συλλέγονται διάφορα βιολογικά υλικά. Αυτά πρέπει να κατεργαστούν με μία συγκεκριμένη διαδικασία πριν αναλυθούν με τη μέθοδο ELISA. Πιο συγκεκριμένα, όλα τα υγρά δείγματα σάλιου και σπέρματος καταψύχονται στους -20 °C πριν από τη χρήση. Το δείγμα αποψύχεται και περίπου 1 mL μεταφέρεται σε σωληνάριο Eppendorf και φυγοκεντρείται για 5 λεπτά στις 12000 στροφές/λεπτό. Το υπερκείμενο είτε αναλύεται αμέσως είτε αποθηκεύεται στους -20°C για μετέπειτα δοκιμή. Ακόμη, οι λεκέδες

από σάλιο γίνονται με την επάλειψη σάλιου σε 25 mm x 25 mm ενός τετραγώνου από πλυμένο βαμβακερό ύφασμα. Αυτά ξηραίνονται σε θερμοκρασία δωματίου όλη τη νύχτα πριν την αποθήκευση σε πλαστικές σακούλες. Για την ανάλυση χρησιμοποιείται ένα μικρό κομμάτι βαμβακερού φύλλου 5 mm x 5 mm. Σε δείγματα περιπτώσεων όπου ο λεκές είναι σε λεπτότερο υλικό όπως καλσόν ή πιο χοντρό υλικό όπως μαλλί, λαμβάνεται περίπου ισοδύναμη ποσότητα λεκιασμένου υφάσματος. Το κομμάτι υφάσματος εκχυλίζεται με το αντιγόνο για 1 ώρα στους 52°C. Στη συνέχεια αφαιρείται το ύφασμα και το δείγμα φυγοκεντρείται για 5 λεπτά στις 12000 στροφές/λεπτό. Το υπερκείμενο αναλύεται σύμφωνα με το πρωτόκολλο της μεθόδου. Τα επιχρίσματα εκχυλίζονται πρώτα με 1 mL απεσταγμένου νερού. (48-49)

Υπάρχουν τέσσερις τύποι της ELISA (Εικόνα 20):

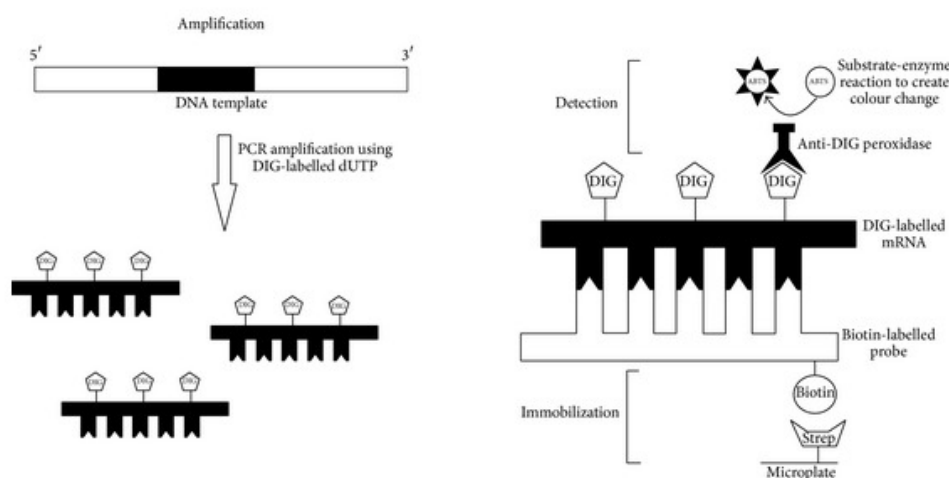
1. Άμεση ELISA (επικάλυψη με αντιγόνο και αντίσωμα διαλογής).
2. Έμμεση ELISA (επικάλυψη με αντιγόνο και αντιγόνο/αντίσωμα διαλογής).
3. ELISA σάντουιτς (επικάλυψη με αντίσωμα και αντιγόνο διαλογής).
4. Ανταγωνιστική ELISA (αντίσωμα προσυμπτωματικού ελέγχου).



Εικόνα 20: Οι τέσσερις τύποι ELISA. (46)

Η PCR-ELISA (Εικόνα 21) είναι μια ανοσολογική μέθοδος για τον ποσοτικό προσδιορισμό του προϊόντος PCR απευθείας μετά την ακινητοποίηση του βιοτινυλιωμένου DNA σε μια μικροπλάκα. Η όλη μέθοδος περιλαμβάνει 3 βήματα: ενίσχυση, ακινητοποίηση και ανίχνευση. Στην αρχή της μεθόδου, το γονίδιο ενδιαφέροντος θα ενισχυθεί μέσω PCR παρουσία διγοξιγενίνης-11-dUTP (DIG-dUTP). Τα σημασμένα με DIG προϊόντα PCR θα συνδεθούν στη συνέχεια σε συγκεκριμένους ολιγονουκλεοτιδικούς ανιχνευτές, σημασμένους με βιοτίνη στο 5' άκρο τους. Το επόμενο βήμα περιλαμβάνει την

ακινητοποίηση του γονιδίου που μας ενδιαφέρει στη μικροπλάκα. Αυτό είναι εφικτό με την παρουσία στρεπταβιδίνης επικαλυμμένης σε μικροπλάκες και βιοτίνης στο άκρο 5' του σχηματιζόμενου υβριδίου. Η ισχυρή συγγένεια αλληλεπίδρασης αβιδίνης-βιοτίνης σχηματίζει το σύμπλεγμα αβιδίνης-βιοτίνης, δεσμεύοντας έτσι μόνο τα προϊόντα PCR με το συγκεκριμένο γονίδιο που ενδιαφέρει στη μικροπλάκα. Όλα τα άλλα μη ειδικά προϊόντα θα ξεπλυθούν. Μετά την ακινητοποίηση, απαιτείται ανίχνευση βιοτινυλιωμένου DNA καθώς ο σχηματισμός αυτών των συμπλεγμάτων δεν μπορεί να ανιχνευθεί με γυμνά μάτια. Για να γίνει αυτό, τα αμπλικόνια μπορούν να ανιχνευθούν χρησιμοποιώντας ένα συζυγές αντι-DIG-υπεροξειδάσης μέσω του υποστρώματος 2,2'-αζινο-δι-3-αιθυλοβενζοθειαζολίνης σουλφονικής (ABTS). Αυτά θα αναπτύξουν μια μπλε-πράσινη χρωματική αντίδραση που είναι και ορατή και μετρημένη χρησιμοποιώντας ένα φασματοφωτόμετρο. Μια άλλη μέθοδος ανίχνευσης PCR-ELISA περιλαμβάνει τη χρήση ανιχνευτή φλουορεσκεΐνης όπου η ανίχνευση περιλαμβάνει τη χρήση αντισωμάτων αντιφλουορεσκεΐνης συζευγμένων με υπεροξειδάση χρένου για την ανίχνευση του υβριδισμένου ολιγονουκλεοτιδικού ανιχνευτή σηματοδοτούμενο με φλουορεσκεΐνη.⁽⁴⁸⁾



Εικόνα 21: Η PCR-ELISA.⁽⁴⁸⁾

Διάφορες ανοσοδοκιμασίες είναι διαθέσιμες για ιατροδικαστική χρήση, όπως η ELISA που περιγράφηκε εκτενώς παραπάνω. Άλλα παραδείγματα είναι τα κιτ ταχείας αναγνώρισης λεκέδων (RSID), που είναι ανοσοδοκιμασίες πλευρικής ροής. Τα κιτ RSID έχουν αναπτυχθεί για την ταχεία επιτόπια ανίχνευση αίματος, σάλιου και σπέρματος. Η ευαισθησία και η ειδικότητα όλων αυτών των δοκιμών βρέθηκε να είναι μεγαλύτερη από τις αντίστοιχες υποτιθέμενες χημικές δοκιμές τους. Οι ανοσοδοκιμασίες είναι ελπιδοφόρες εναλλακτικές λύσεις αντί των χημικών μεθόδων για σωματικά υγρά λόγω της ευκολίας

χρήσης, της ταχείας δράσης, των αξιόπιστων αποτελεσμάτων και της επιβεβαιωτικής φύσης τους. Το κόστος αυτών των ανοσολογικών τεχνικών είναι πολύ χαμηλό. Επιπλέον, παρουσιάζουν παρατεταμένη διάρκεια ζωής μεταξύ 12-24 μηνών, παρέχοντάς τους συγκρίσιμη σταθερότητα με τις περισσότερες διαθέσιμες χημικές δοκιμές. Ποσοτικές ανοσολογικές αναλύσεις για μη ανθρώπινους δείκτες, όπως το τεστ κατακρημνίσεως, είναι διαθέσιμες εδώ και έναν αιώνα και έχουν χρησιμοποιηθεί από τους ειδικούς επιστήμονες για τον εντοπισμό υπολειμμάτων συγκεκριμένων ζώων που προστατεύονται από το νόμο π.χ. μεγάλα θηράματα. ⁽⁴⁹⁾

4.2 Ανάλυση μεταγραφώματος

4.2.1 Αλληλούχηση κατά Sanger

Το 1977, ο Frederick Sanger ανέπτυξε τη μεθοδολογία για την αλληλουχία Sanger. Τρία χρόνια μετά, τιμήθηκε με το Βραβείο «Νόμπελ Χημείας». Η συγκεκριμένη μέθοδος είναι γνωστή ως αλληλούχηση πρώτης γενιάς, είναι μάλλον παρόμοια με την PCR. Για την εφαρμογή της τεχνικής αυτής, απαιτείται ένα εκμαγείο ssDNA, ένας εκκινητής, η DNA πολυμεράση και δεοξυνουκλεοτιδοτριφωσφορικά (dNTPs). Επιπρόσθετα, τα δι-δεοξυνουκλεοτιδοτριφωσφορικά άλατα (ddNTPs) που χρειάζονται, μπορούν να ενσωματωθούν στον νεοσυντιθέμενο κλώνο DNA, όπως και τα κανονικά dNTPs, αλλά τερματίζουν τη διαδικασία της επιμήκυνσης. Συνεπώς, αυτή η μέθοδος είναι επίσης γνωστή ως μέθοδος τερματισμού αλυσίδας. Η αντίδραση πραγματοποιείται συνολικά τέσσερις φορές. Σε κάθε σωλήνα (εκτός από τα κανονικά dNTPs) και σε σχετικά χαμηλή συγκέντρωση γίνεται και η προσθήκη ενός από τα τέσσερα επισημασμένα ddNTPs. Στη σημερινή εποχή, η αλληλούχηση με τη παρούσα μέθοδο, μπορεί να προσδιοριστεί με ddNTPs σηματοδοτημένα και τριχοειδή (πηκτή) ηλεκτροφόρηση. ^{(47),(50)}

Η αλληλουχία κατά Sanger όχι μόνο αποτελεί τη βάση για τις νεότερες και αυτοματοποιημένες προσεγγίσεις, αλλά εξακολουθεί να είναι η πιο κοινή προσέγγιση αλληλουχίας που χρησιμοποιείται σε VDL για επαλήθευση αλληλουχίας, παρακολούθηση δοκιμασιών και ως βάση για πολλές φυλογενετικές αναλύσεις. Εκτός από το ότι χρησιμεύει ως επιβεβαιωτική δοκιμασία υψηλής διαγνωστικής εξειδίκευσης, ο προσδιορισμός των αλληλουχιών νουκλεϊκών οξέων είναι κρίσιμης σημασίας για την αρχική ανάπτυξη μοριακής ανάλυσης, την παρακολούθηση της αποτελεσματικότητας των προσδιορισμών που βασίζονται σε μοριακή βάση και τα βασικά τους συστατικά, τις ιατροδικαστικές έρευνες για την πηγή ενός παράγοντα ή και για τον προσδιορισμό γονότυπου. ^{(47),(50)}

4.2.2 Αλληλούχηση επόμενης γενιάς

Η μαζική παράλληλη αλληλουχία (*Massive Parallel Sequencing, MPS*) έχει κερδίσει μεγάλη προσοχή την τελευταία δεκαετία. Μια τεχνική MPS ορίζεται ως «μια μέθοδος υψηλής απόδοσης που χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό ενός τμήματος της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του γονιδιώματος ενός ατόμου. Αυτή η τεχνική χρησιμοποιεί τεχνολογίες προσδιορισμού αλληλουχίας DNA που είναι ικανές να επεξεργάζονται πολλαπλές αλληλουχίες DNA παράλληλα. Η αλληλούχηση επόμενης γενιάς (*Next-generation sequencing, NGS*) είναι υποκατηγορία της MPS, και έχει ως σκοπό τη διάκριση των καινούργιων τεχνικών από τις προηγούμενες μεθόδους προσδιορισμού αλληλουχίας DNA. Με τις μεθόδους δεύτερης γενιάς τα μεμονωμένα μόρια αναλύονται σε σύντομο χρονικό διάστημα. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, αυτού του είδους δοκιμασίες να είναι πολύ πιο γρήγορες και δημιουργούνται μεγαλύτερες αναγνώσεις σε σχέση με τις προηγούμενες γενιές αλληλούχησης.^{(47), (51-53)}

Η τεχνολογία NGS αναφέρεται σε τεχνολογία προσδιορισμού αλληλουχίας DNA υψηλής απόδοσης που δεν βασίζεται στο Sanger. Εκατομμύρια ή δισεκατομμύρια μόρια DNA μπορούν να αλληλουχηθούν παράλληλα, αυξάνοντας έτσι σημαντικά την απόδοση και ελαχιστοποιώντας την ανάγκη για τη μέθοδο κλωνοποίησης θραυσμάτων που χρησιμοποιείται συχνά στον προσδιορισμό αλληλουχίας κατά Sanger. Περιλαμβάνει τεχνολογία προσδιορισμού αλληλουχίας δεύτερης γενιάς που βασίζεται σε αλληλουχία διάταξης βρόχου, η οποία μπορεί να αναλύσει μεγάλο αριθμό δειγμάτων ταυτόχρονα.^{(47), (51-53)}

Οι νέες μέθοδοι αλληλούχησης έχουν οδηγήσει σε τρεις σημαντικές βελτιώσεις από τις συμβατικές τεχνολογίες. Πρώτον, αυτές οι τεχνολογίες δεν απαιτούν βακτηριακή κλωνοποίηση θραυσμάτων DNA. Αντίθετα, βασίζονται στην προετοιμασία βιβλιοθηκών NGS σε ένα σύστημα χωρίς κυψέλες. Δεύτερον, αντί για εκατοντάδες αντιδράσεις αλληλουχίας, μπορούν να παραλληλισθούν χιλιάδες έως πολλά εκατομμύρια αντιδράσεις αλληλουχίας ταυτόχρονα. Τρίτον, η αλληλουχίας στόχος ανιχνεύεται άμεσα χωρίς να χρειάζεται ηλεκτροφόρηση. Ο τεράστιος αριθμός αναγνώσεων που παρήχθη από το NGS επέτρεψε την αλληλουχία ολόκληρων γονιδιωμάτων με πρωτοφανή ταχύτητα και έτσι έφτασε να χρησιμοποιείται ευρέως σε διάφορους τομείς των βιοεπιστημών. Επιπλέον, η τεχνολογία NGS μπορεί επίσης να έχει πιθανές εφαρμογές σε πολλές άλλες πτυχές της έρευνας. Αυτά περιλαμβάνουν την κατασκευή βάσης δεδομένων DNA, την καταγωγή και το φαινοτυπικό συμπέρασμα, τις μονοζυγωτικές μελέτες διδύμων, την ταυτοποίηση

σωματικών υγρών και ειδών και ιατροδικαστικές αναλύσεις ζώων, φυτών και μικροβιολογικών στοιχείων. ^{(47), (51-53)}

Η NGS είναι μια νέα τεχνολογία για τον προσδιορισμό αλληλουχίας του DNA. Αυτή η τεχνολογία συνδυάζει τα πλεονεκτήματα της μοναδικής χημικής αλληλουχίας, των διαφορετικών μητρών προσδιορισμού αλληλουχίας και της τεχνολογίας βιοπληροφορικής. Ένας τέτοιος συνδυασμός επιτρέπει μια μαζική παράλληλη αλληλουχία διαφόρων μηκών αλληλουχιών DNA ή RNA ή ακόμα και ολόκληρου του γονιδιώματος σε σχετικά σύντομο χρονικό διάστημα. Είναι μια επαναστατική τεχνολογία που εφαρμόζεται μετά την αλληλούχηση κατά Sanger. Η NGS περιλαμβάνει πολλά σημαντικά βήματα. Περιλαμβάνει το κατακερματισμό DNA, τη προετοιμασία βιβλιοθήκης, τη μαζική παράλληλη αλληλούχηση, την ανάλυση με τη βοήθεια της βιοπληροφορικής καθώς και ερμηνεία από τον εκάστοτε επιστήμονα. ^{(47), (51-53)}

Ο κατακερματισμός του DNA χρησιμοποιείται για να σπάσει το στοχευόμενο DNA σε πολλά μικρά τμήματα, συνήθως μήκους 100–300 bp. Για να επιτευχθεί αυτό μπορούν να χρησιμοποιηθούν διάφορες μέθοδοι. Το DNA μπορεί να κατακερματιστεί χρησιμοποιώντας μηχανικές μεθόδους, ενζυματική πέψη ή άλλες μεθόδους. Για παράδειγμα, η υπερήχηση μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να σπάσει το DNA σε μικρά τμήματα. Τα μικρά τμήματα που σχετίζονται με τις στοχευόμενες αλληλουχίες DNA εξάγονται χρησιμοποιώντας ειδικούς συμπληρωματικούς ανιχνευτές διαφορετικών σχεδίων. Αυτή η μέθοδος αναφέρεται συνήθως ως δοκιμασία σύλληψης υβριδισμού. Μια άλλη μέθοδος περιλαμβάνει την ενίσχυση της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR). Σε αυτή τη μέθοδο, πολλά ζεύγη εκκινητών χρησιμοποιούνται για την ενίσχυση των στοχευόμενων τμημάτων DNA χρησιμοποιώντας PCR. Τα προϊόντα PCR χρησιμεύουν ως μικρά τμήματα στοχευμένου DNA. Αυτή η μέθοδος συνήθως ονομάζεται ανάλυση αμπλικονίου. Τα τμήματα DNA χρησιμοποιούνται στη συνέχεια για προετοιμασία βιβλιοθήκης. ^{(47), (51-53)}

Η προετοιμασία της βιβλιοθήκης είναι μια διαδικασία με την οποία τα τμήματα DNA τροποποιούνται έτσι ώστε κάθε δείγμα DNA να μπορεί να έχει έναν ειδικό δείκτη όπως η αναγνώριση δείγματος που βοηθά στην αναγνώριση του ασθενούς από τον οποίο πραγματοποιήθηκε η αλληλουχία DNA. Αυτή η διαδικασία επιτρέπει επίσης στους προσαρμογείς προσδιορισμού αλληλουχίας να προστεθούν στα τμήματα DNA. Μια τέτοια τροποποίηση επιτρέπει στους εκκινητές προσδιορισμού αλληλουχίας να δεσμεύονται σε όλα τα τμήματα DNA και επιτρέπει τη μαζική παράλληλη αλληλούχηση αργότερα. ^{(47), (51-53)}

Εκτελείται μαζική παράλληλη αλληλουχία με τη χρήση ενός NGS sequencer. Η βιβλιοθήκη μεταφορτώνεται σε έναν πίνακα αλληλουχίας σε ένα συγκεκριμένο πρόγραμμα αλληλουχίας. Διαφορετικοί προσδιοριστές αλληλουχίας έχουν διαφορετικούς πίνακες αλληλουχίας. Για παράδειγμα, το Illumina NGS sequencer χρησιμοποιεί κελιά ροής και το Ion Torrent NGS sequencer χρησιμοποιεί τσιπ αλληλούχησης. Ωστόσο, ο στόχος του είναι ο ίδιος, που είναι να επιτρέψει μαζική παράλληλη αλληλουχία όλων των τμημάτων DNA ταυτόχρονα. Οι πληροφορίες αλληλουχίας που παράγονται από μια τέτοια μαζική παράλληλη αλληλουχία αναλύονται χρησιμοποιώντας λογισμικό βιοπληροφορικής.^{(47), (51-53)}

Η ανάλυση βιοπληροφορικής είναι μια διαδικασία που περιλαμβάνει αναγνώριση βάσης, στοίχιση ανάγνωσης, αναγνώριση παραλλαγής και σχολιασμό παραλλαγής. Κατά τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας, οι πληροφορίες αλληλουχίας συγκρίνονται με μια αλληλουχία αναφοράς ανθρώπινου γονιδιώματος για να προσδιοριστεί εάν υπάρχουν παραλλαγές/μεταλλάξεις στις στοχευμένες αλληλουχίες. Όλες οι πληροφορίες από κάθε τμήμα αλληλουχίας συγκεντρώνονται για τη δημιουργία τελικών αποτελεσμάτων αλληλουχίας για όλο το μήκος του στοχευμένου DNA. Τα τελικά αποτελέσματα της αλληλουχίας αποστέλλονται πίσω στον χρήστη για ερμηνεία.^{(47), (51-53)}

4.2.3 Αλληλούχηση τρίτης γενιάς

Τα τελευταία χρόνια, η τεχνολογία των νανοπόρων έχει γίνει ολοένα και πιο σημαντική στον τομέα της βιοεπιστήμης και της βιοϊατρικής έρευνας. Η διαδικασία προσδιορισμού αλληλουχίας νανοπόρων βασίζεται στη διέλευση ενός μορίου DNA μέσω ενός νανοσκοπικού πόρου και από τη δεκαετία του '90 θεωρείται ως μία από τις πιο υποσχόμενες προσεγγίσεις για την ανίχνευση νουκλεϊκών οξέων. Όπως και η NGS, έτσι και η αλληλούχηση με τη χρήση νανοπόρων αποτελούν υποκατηγορίες της μαζικής παράλληλης αλληλούχησης (MPS).^{(47), (95)}

Η διαδικασία της αλληλούχησης με τη χρήση νανοπόρων περιλαμβάνει τη μεταβολή του ιοντικού ρεύμα των νανοπόρων όταν το DNA διέρχεται από αυτούς. Το σχήμα, το μέγεθος και το μήκος της αλληλουχίας παίζουν σημαντικό ρόλο στη μεταβολή του ιοντικού ρεύματος. Κάθε τύπος νουκλεοτιδίου εμποδίζει τη ροή των ιόντων μέσω του πόρου για μια διαφορετική χρονική περίοδο. Η συγκεκριμένη τεχνολογία αλληλούχησης πραγματοποιείται σε πραγματικό χρόνο και δεν απαιτούνται τροποποιημένα νουκλεοτίδια. Αξίζει να σημειωθεί ότι η τεχνική αυτή βασίζεται σε προηγούμενες μελέτες, οι οποίες

απέδειξαν ότι DNA ή RNA μπορεί μέσω της ηλεκτροφόρησης να διαπεράσει μια λιπιδική μεμβράνη. ^{(47),(95)}

Υπάρχουν δύο μορφές αυτής της μεθοδολογίας, η αλληλούχηση στερεάς κατάστασης και η αλληλούχηση των νανοπόρων βασισμένη στις πρωτεΐνες. Η χρήση συνθετικών υλικών στην αλληλούχηση στερεάς κατάστασης, όπως το Si_3N_4 και το Al_2O_3 , προτιμάται λόγω της υψηλότερης μηχανικής ικανότητας και χημικής σταθερότητας που τη χαρακτηρίζει. Απαραίτητη προϋπόθεση για την εφαρμογή αυτής της μεθοδολογίας είναι η μέθοδος κατασκευής καθώς η συστοιχία των νανοπόρων δύναται να περιέχει πόρους με διαμέτρους μικρότερες από 8 nm. Αντίθετα, το δεύτερο είδος αλληλούχησης χρησιμοποιεί μεμβρανικά πρωτεϊνικά σύμπλοκα. Χαρακτηριστικά παραδείγματα είναι η α -αιμολυσίνη και η MspA (Mycobacterium smegmatis porin A). Αυτά τα σύμπλοκα έχουν την ικανότητα να διακρίνουν τα νουκλεοτίδια μεταξύ τους, ανά σειρά, μέσα σε μια ομάδα νουκλεοτιδίων. ^{(47),(95)}

Τα μόρια του DNA ή RNA απελευθερώνουν ένα ιοντικό ρεύμα, καθώς διακινούνται διαμέσου του πόρου. Οι πόροι περιέχουν μία περιοχή ανίχνευσης, που μπορεί να αναγνωρίσει διαφορετικές βάσεις. Κάθε βάση παράγει διαφορετικά σήματα, τα οποία αντιστοιχούν στον χρόνο που χρειάστηκε η βάση να διασχίσει το πόρο. Πλέον, χρησιμοποιούνται χρωστικές που επιτρέπουν τη βέλτιστη απόδοση και απεριόριστη ικανότητα αλληλουχίας. Ειδικότερα, η επίστροφή των μορίων DNA και των εκκινήτων γίνονται πάνω σε μια ειδική επιφάνεια και στη συνέχεια ενισχύονται με τη πολυμεράση. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να δημιουργούνται τοπικά μονοκλωνικές συναθροίσεις DNA (DNA clusters). Για τον προσδιορισμό της αλληλουχίας στόχος, προστίθονται και τα 4 είδη ανάστροφων βάσεων τερματισμού, ενώ τα μη ενσωματωμένα νουκλεοτίδια ξεπλένονται. Έπειτα, πραγματοποιείται η λήψη εικόνων των φθοριοσημασμένων νουκλεοτιδίων από ειδική κάμερα. Η έναρξη του επόμενου κύκλου επιτυγχάνεται όταν αφαιρείται χημικά η χρωστική ουσία μαζί με το τερματικό 3 'blocker. Συνεπώς, οι αλυσίδες DNA επεκτείνονται κατά ένα νουκλεοτίδιο τη φορά και η εικόνα μπορεί να εμφανιστεί σε καθυστερημένη στιγμή. ^{(47),(95)}

4.3 Ανάλυση STR

Η ανάλυση STR (*Short Tandem Repeat*) είναι πιθανό να παραμείνει η πιο σημαντική και ευρέως χρησιμοποιούμενη γενετική τεχνική στην εγκληματολογική επιστήμη για το άμεσο μέλλον. Παρουσιάζει πολλαπλά πλεονεκτήματα, όπως γρήγορο και ακριβή προσδιορισμό αλληλόμορφων, χαμηλή απαίτηση προτύπου DNA, πολλαπλή ενίσχυση και ανίχνευση με βάση τον φθορισμό, ψηφιοποιημένα αποτελέσματα και χρήση του άφθονου γονιδιωματικού στοιχείου. Επί του παρόντος, περισσότερες από 60 χώρες παγκοσμίως έχουν δημιουργήσει βάσεις δεδομένων εγκληματολογικού DNA που βασίζονται σε STR, και αυτές οι βάσεις δεδομένων συνεχίζουν να αναπτύσσονται γρήγορα. Για παράδειγμα, η Κίνα έχει τώρα περισσότερες από 27 εκατομμύρια εγγραφές στη βάση δεδομένων της εγκληματολογίας. Η πιθανότητα τυχαίας αντιστοίχισης μεταξύ άσχετων ατόμων θα αυξηθεί εάν οι στατιστικές αναλύσεις βασίζονταν μόνο στους 13 δείκτες STR που χρησιμοποιούνται συνήθως στο Σύστημα Δείκτης Συνδυασμένου DNA (CODIS).⁽⁵⁴⁻⁵⁵⁾

Όταν η τεχνολογία NGS εισήχθη για πρώτη φορά στη γονιδιωματική, δεν ήταν κατάλληλη για δοκιμή STR επειδή το μήκος ανάγνωσης ήταν γενικά πολύ μικρό. Με τις τεχνολογικές εξελίξεις, το μέσο μήκος ανάγνωσης αυξάνεται συνεχώς. Δεδομένου ότι τα αλληλόμορφα με παρόμοιο μήκος μπορούν εύκολα να διακριθούν χρησιμοποιώντας την τεχνολογία NGS και η ψηφιακή μέτρηση ανάγνωσης θα μπορούσε να διευκολύνει σημαντικά την ταυτοποίηση μικτών δειγμάτων DNA και την ανάλυση περίπλοκων περιπτώσεων πατρότητας, ορισμένοι ερευνητές άρχισαν πρόσφατα να χρησιμοποιούν την τεχνολογία NGS για δοκιμές STR.^{(54),(55),(94)}

Η τεχνολογία NGS έχει πολλά πιθανά πλεονεκτήματα για την ανάλυση STR. Αυτά περιλαμβάνουν υψηλή απόδοση, χαμηλό κόστος, ταυτόχρονη ανίχνευση μεγάλου αριθμού τόπων STR τόσο στα αυτοσώματα όσο και στα φυλετικά χρωμοσώματα και την ικανότητα διάκρισης αλληλόμορφων με παρόμοιο μήκος ή ψηφιακή μέτρηση ανάγνωσης. Συνεπώς, η τεχνολογία NGS θα διευκόλυνε σημαντικά τον εντοπισμό μικτών δειγμάτων DNA και την ανάλυση περίπλοκων υποθέσεων πατρότητας και, τελικά, θα αυξήσει σημαντικά την αποτελεσματικότητα και τη σχέση κόστους-αποτελεσματικότητας των νομικών υποθέσεων.^{(54),(55),(94)}

Η ανάλυση που περιλαμβάνει την ανάλυση STR ακολουθεί μια γενική μεθοδολογία προφίλ DNA. Ωστόσο, η μεθοδολογία για την τυποποίηση STR βασίζεται στις τυπικές διαδικασίες λειτουργίας που παρέχονται από τους κατασκευαστές του εμπορικού kit για

χρήση σε εγκληματολογικό εργαστήριο. Η ανάλυση STR περιλαμβάνει τα γενικά βήματα για τη δημιουργία προφίλ DNA με την ακόλουθη σειρά: απομόνωση DNA με μια διαδικασία που ονομάζεται εξαγωγή DNA, ποσοτικοποίηση του DNA στο δείγμα, ενίσχυση των τόπων STR, διαχωρισμός των αμπλικονίων PCR σε γενετικό αναλυτή με χρήση της βιοπληροφορικής. Η απομόνωση του DNA μπορεί να γίνει είτε με χρήση οργανικών διαλυτών είτε με εκχύλιση στερεάς φάσης (SPE). Στην πρώτη περίπτωση, χρησιμοποιούνται οι διαλύτες χλωροφόρμιο και φαινόλη. Σε δείγμα DNA που έχει παρθεί από τη σκηνή ενός εγκλήματος προστίθενται SDS και η πρωτεΐνάση K ώστε να διασπαστεί η κυτταρική μεμβράνη. Έπειτα, το δείγμα επωάζεται και δημιουργείται ένα αιώρημα, στο οποίο βρίσκονται όλα τα συστατικά του κυττάρου. Στο αιώρημα προστίθενται οι οργανικοί διαλύτες και έπειτα από φυγοκέντρηση στην υδατική φάση βρίσκεται το DNA. Τέλος, το DNA εκχυλίζεται από την υδατική φάση χρησιμοποιώντας αιθανόλη. Κατά την εκχύλιση στερεάς φάσης, χρησιμοποιούνται σωματίδια πυριτικής βάσης. Αυτά παρουσιάζουν μεγάλη συγγένεια με τα πρωτεϊνικά στοιχεία του DNA, αλλά όχι με το ίδιο το DNA. Φέρουν αρνητικό φορτίο και έλκουν τις πρωτεΐνες που έχουν θετικό φορτίο. Τα σωματίδια αυτά είναι πακεταρισμένα σε στήλη μέσα από την οποία περνά το δείγμα και προσδένονται οι πρωτεΐνες. Με την αλλαγή του pH, τα μόρια του DNA παρασύρονται μαζί με το διαλύτη και συλλέγονται σε δοκιμαστικό σωλήνα. ^{(54),(55),(94)}

Τα δεδομένα που προκύπτουν συγκρίνονται με αυτά που υπάρχουν στις βάσεις δεδομένων και φιλοξενούν σύνολα STR που είχαν δημιουργηθεί προηγουμένως. Οι επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες DNA με ποικίλο αριθμό επαναλήψεων, που αναφέρονται ως τόποι STR, ενισχύονται χρησιμοποιώντας εκκινητές με διαφορετικές φθορίζουσες χρωστικές και αυτά τα αμπλικόνια διακρίνονται τόσο από το μέγεθος όσο και από το χρώμα. Επιπροσθέτως, κατά την εκτέλεση ανάλυσης STR, πρέπει να προσδιοριστούν οι αμετάβλητες πλευρικές περιοχές που περιβάλλουν τις επαναλήψεις και μόλις γίνουν γνωστές οι πλευρικές αλληλουχίες, τότε μπορούν να σχεδιαστούν εκκινητές PCR και η περιοχή επανάληψης να ενισχυθεί για ανάλυση. Υπάρχουν δύο συνήθεις τρόποι αναγνώρισης των STR. Αυτές περιλαμβάνουν είτε την αναζήτηση στις βάσεις δεδομένων αλληλουχιών DNA όπως το CODIS ή την GenBank για περιοχές με περισσότερες από έξι γειτονικές επαναλαμβανόμενες μονάδες είτε την εκτέλεση μεθόδων απομόνωσης μοριακής βιολογίας. ^{(54),(55),(94)}

Τα STR είναι εξαιρετικά πολυμορφικά και τα αλληλόμορφα των τόπων STR διαφοροποιούνται από τον αριθμό των αντιγράφων της επαναλαμβανόμενης αλληλουχίας

εντός καθενός από τους τόπους STR. Τα ευρήματα της έρευνας έχουν δείξει ότι όσο περισσότεροι τόποι STR χρησιμοποιούνται για την ανάλυση, τόσο μεγαλύτερη είναι η τιμή διάκρισης, δεδομένου ότι η πιθανότητα δύο άτομα που λαμβάνονται από έναν τυχαίο πληθυσμό έχουν ακριβώς τον ίδιο αριθμό μονάδων επαναλήψεων για όλα τα STR αναλύεται, είναι εξαιρετικά σπάνιο. Μπορεί να διαφέρουν σε μέγεθος από άτομο σε άτομο χωρίς να επηρεάζουν τη γενετική υγεία του ατόμου. ^{(54),(55),(94)}

4.4 Ανάλυση μιτοχονδριακού γονιδιώματος

Το mtDNA έχει αποδειχθεί χρήσιμο ιατροδικαστικό εργαλείο σε περιπτώσεις που αφορούν χαμηλές ποσότητες DNA ή όπου η μητρική καταγωγή πρέπει να διερευνηθεί, λόγω των χαρακτηριστικών του μικρού μεγέθους, πολλαπλών αντιγράφων, μητρικής κληρονομικότητας, υψηλού ποσοστού μετάλλαξης και έλλειψης ανασυνδυασμού. Επί του παρόντος, οι ιατροδικαστικές αναλύσεις mtDNA συνήθως ανιχνεύουν μόνο πολυμορφισμούς μέσα σε μια υπερμεταβλητή περιοχή. Ωστόσο, για να χρησιμοποιηθεί το mtDNA ως δείκτης γενετικού απλότυπου, απαιτούνται επιπλέον πολυμορφικοί τόποι για να αυξηθεί η διακριτική ικανότητα αναγνώρισης. Ως εκ τούτου, η τεχνολογία NGS έχει τη δυνατότητα να βοηθήσει σημαντικά στην ανάλυση ολόκληρων μιτοχονδριακών αλληλουχιών. ⁽⁵⁶⁻⁵⁷⁾

Η ετεροπλασία του ανθρώπινου mtDNA είναι κοινή και έχει επίσης παρατηρηθεί ετεροπλασία κυττάρων από διαφορετικούς ιστούς σε ένα άτομο. Η ετεροπλασία mtDNA είναι ένας από τους παράγοντες που επηρεάζουν την απόδοση της εγκληματολογικής μιτοχονδριακής ανάλυσης. Η ανίχνευση της ετεροπλασίας σε ολόκληρο το επίπεδο του μιτοχονδριακού γονιδιώματος έχει αναφερθεί, υποστηρίζοντας τα πλεονεκτήματα της χρήσης NGS για την ανίχνευση της μιτοχονδριακής ετεροπλασίας, όπως η υψηλή ακρίβεια και ευαισθησία, η υψηλή απόδοση, το χαμηλό κόστος και η απλή λειτουργία. ⁽⁵⁶⁻⁵⁷⁾

4.5 Ισόθερμη ενίσχυση με μεσολάβηση βρόχου

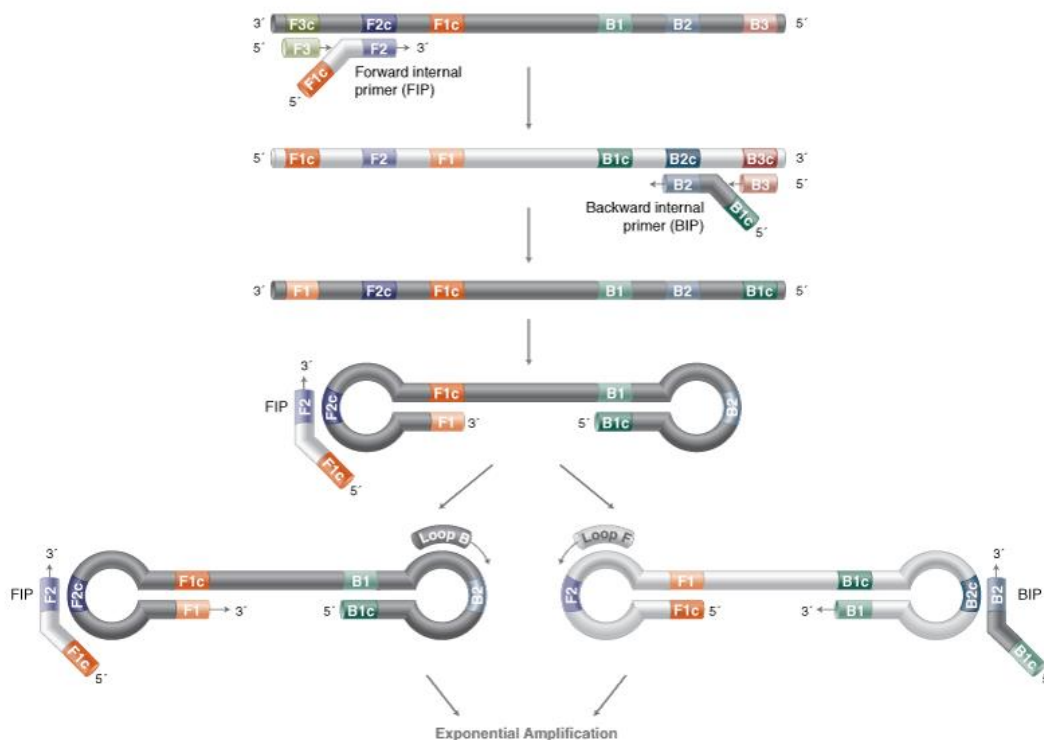
Η ανάπτυξη αξιόπιστης και ταχείας ισοθερμικής PCR θα είχε μεγάλο όφελος για την επιτόπια ιατροδικαστική ανάλυση, καθώς θα μεταφέρει μια από τις πιο σημαντικές εργαστηριακές ιατροδικαστικές τεχνικές στο πεδίο, αυξάνοντας σημαντικά τις δυνατότητες επιτόπιας έρευνας. Η ισοθερμική ενίσχυση με τη μεσολάβηση βρόχου (*Loop-Mediated*

Isothermal Amplification, LAMP) είναι μια μέθοδος PCR που μπορεί να πραγματοποιηθεί σε σχετικά χαμηλές θερμοκρασίες (60–65°C) καθιστώντας το κατάλληλο για επιτόπια εργασία όταν συνδυάζεται με φορητό θερμαντήρα που λειτουργεί με μπαταρία. Η LAMP διαφέρει από τη συμβατική PCR στο ότι χρησιμοποιεί πολλαπλά σετ εκκινητών, τα οποία σχηματίζουν βρόχους στον συντιθέμενο κλώνο DNA που διευκολύνουν περαιτέρω γύρους ενίσχυσης χωρίς την ανάγκη θερμικού κυκλοποιητή τοποθετημένου σε πάγκο. Η LAMP έχει χρησιμοποιηθεί στο παρελθόν εκτενώς στην κλινική επιστήμη για την ανίχνευση επιβλαβών βακτηρίων σε πολύπλοκα βιολογικά δείγματα, όπως το αίμα, και θα μπορούσε να εφαρμοστεί στην ανίχνευση βιοδεικτών εγκληματολογικής σημασίας. ⁽⁵⁸⁻⁶⁰⁾

Πολύ πρόσφατα, αναπτύχθηκαν αρκετές γρήγορες επιτόπιες δοκιμασίες LAMP για την ανίχνευση φαρμάκων και την ταυτοποίηση ειδών, οι οποίες έχουν δείξει πολλά υποσχόμενα αποτελέσματα με συγκρίσιμη αποτελεσματικότητα με τη μεθοδολογία που βασίζεται στο εργαστήριο, ενώ μειώνουν σημαντικά το κόστος που κανονικά θα προέκυπτε από τη χρήση οποιουδήποτε εξειδικευμένου εξοπλισμού. Αυτό υπογραμμίζει τις δυνατότητες της LAMP για εγκληματολογική χρήση και δικαιολογεί περαιτέρω ανάπτυξη για την παραγωγή μιας εμπορευματοποιημένης ανάλυσης LAMP. Υπάρχουν πολλά οφέλη από τη χρήση της LAMP έναντι άλλων μεθόδων PCR. Πρώτον, το προϊόν ενίσχυσης είναι πολύ πιο εύκολο να απεικονιστεί με LAMP από την τυπική PCR, χρησιμοποιώντας φωτομετρία για τη μέτρηση της θολότητας του δείγματος μετά την ενίσχυση. Αν και η LAMP χρησιμοποιείται για την ανίχνευση του DNA, είναι δυνατό να συνδυαστεί η τεχνική με ένα βήμα αντίστροφης μεταγραφής (RT-LAMP) για να καταστεί δυνατή η ανίχνευση RNA. ⁽⁵⁸⁻⁶⁰⁾

Τα σύνθετα βιολογικά δείγματα όπως το αίμα περιέχουν αναστολείς (π.χ. Ανοσοσφαιρίνη G) που επηρεάζουν την αντίδραση PCR και είναι μια κοινή αιτία αποτυχίας ενίσχυσης. Η LAMP είναι πιο ανθεκτική σε αυτούς τους αναστολείς από την τυπική PCR, γεγονός που θα καθιστούσε τη LAMP μια πιο ιδανική μέθοδο για την ανίχνευση DNA σε δείγματα σωματικών υγρών και θα απαιτούσε λιγότερη προηγούμενη προετοιμασία δειγμάτων όπως η εξαγωγή DNA/RNA. Ωστόσο, η χρήση της LAMP περιορίζεται από τον δύσκολο σχεδιασμό των εκκινητών, που απαιτούν τη χρήση λογισμικού, καθώς και ότι είναι πιο περιορισμένη στο φάσμα των σχεδίων του σε σύγκριση με τους συμβατικούς δείκτες PCR. Αυτό είναι ιδιαίτερα ανησυχητικό για εγκληματολογικές εφαρμογές, καθώς ορισμένοι βιοδείκτες μπορεί να έχουν μεταγραφικές παραλλαγές, όπου ο σχεδιασμός των εκκινητών θα πρέπει να επικεντρώνεται γύρω από μια κοινή ακολουθία. Ένα άλλο ζήτημα με τη LAMP

είναι ότι λόγω του αυξημένου αριθμού των σετ εκκινητών που απαιτούνται σε σύγκριση με την τυπική PCR, αυξάνει την πιθανότητα δημιουργίας διμερών εκκινητών σε μια αντίδραση πολυπλεξίας (Εικόνα 22). Ως εκ τούτου, η LAMP είναι συνήθως δεσμευμένη για ανίχνευση ενός στόχου. Είναι δυνατή η χρήση LAMP σε μια δοκιμασία ανίχνευσης πολυπλεξίας, αλλά αυτό θα απαιτούσε πολύπλοκη επεξεργασία που θα ήταν δύσκολο να μεταφερθεί στην επιτόπια πρακτική. (58-60)



Εικόνα 22: Η μέθοδος LAMP. (58)

4.6 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου – ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αгарόζης

Η χρήση της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (*Polymerase Chain Reaction, PCR*) στη μοριακή διάγνωση έχει αυξηθεί σε σημείο που γίνεται πλέον αποδεκτή ως το χρυσό πρότυπο για την ανίχνευση νουκλεϊκών οξέων από διάφορες προελεύσεις και έχει γίνει βασικό εργαλείο στην εγκληματολογία. Η παρακολούθηση του συσσωρευμένου αμплиονίου σε πραγματικό χρόνο κατέστη δυνατή με την επισημάνση εκκινητών, ανιχνευτών ή αμплиονίου με φθορίζοντα μόρια. Ο λόγος που η PCR σε πραγματικό χρόνο είναι γρηγορότερη είναι ότι οι κύκλοι (Ct) είναι μειωμένοι, φέροντας το επιθυμητό αποτέλεσμα, στην αφαίρεση των διαδικασιών ανίχνευσης μετά την PCR και στη χρήση

φθορίζουσων ουσιών και ευαίσθητων μεθόδων ανίχνευσης των εκπομπών τους. Τα μειονεκτήματα της χρήσης PCR πραγματικού χρόνου σε σύγκριση με τη συμβατική PCR περιλαμβάνουν την αδυναμία παρακολούθησης του μεγέθους του αμπλικονίου χωρίς άνοιγμα του συστήματος, την ασυμβατότητα ορισμένων πλατφορμών με ορισμένες φθορίζουσες χημικές ουσίες και τις σχετικά περιορισμένες δυνατότητες πολυπλεξίας των τρεχουσών εφαρμογών. Επίσης, το κόστος της PCR σε πραγματικό χρόνο μπορεί να είναι απαγορευτικό όταν χρησιμοποιείται από εργαστήρια χαμηλής απόδοσης. ⁽⁶¹⁻⁶²⁾

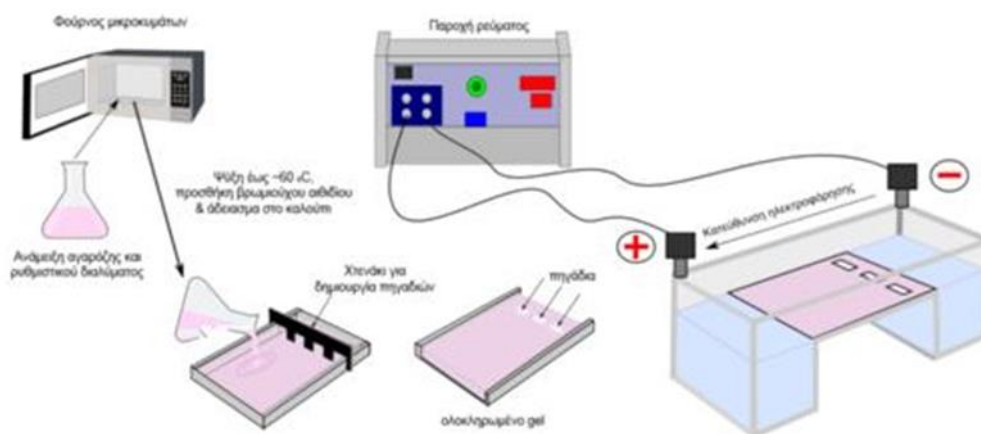
Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) χρησιμοποιείται ευρέως για την αναγνώριση παθογόνων από κλινικά δείγματα. Η PCR πραγματικού χρόνου μπορεί να χρησιμοποιηθεί τόσο για τον ακριβή ποσοτικό προσδιορισμό του μικροβιακού DNA όσο και για την αναγνώριση ειδών παθογόνου με τη χρήση ειδικών εκκινητών. Αρκετές μελέτες περιγράφουν συστήματα PCR σε πραγματικό χρόνο ικανά να προσδιορίζουν βακτηριακό ή μυκητιακό DNA που είναι οι πιο συχνοί αιτιολογικοί παράγοντες της σήψης. ⁽⁶¹⁻⁶²⁾

Το προφίλ DNA (τύπος DNA, γενετικό δακτυλικό αποτύπωμα, τεστ DNA) είναι μια τεχνική που χρησιμοποιείται από τους εγκληματολόγους για να αναγνωρίσουν κάποιον με βάση το DNA του. Η Real Time PCR μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως εργαλείο στη γενετική λήψη δακτυλικών αποτυπωμάτων. Αυτή η τεχνολογία μπορεί να αναγνωρίσει οποιοδήποτε άτομο από εκατομμύρια άλλους. Για παράδειγμα, μικροσκοπικά δείγματα DNA που απομονώνονται από έναν τόπο εγκλήματος μπορούν να συγκριθούν με το DNA από υπόπτους ή να συγκριθούν με μια βάση δεδομένων DNA. Τέτοιες διαδικασίες μπορούν να εντοπίσουν ή να αποκλείσουν υπόπτους κατά τη διάρκεια της αστυνομικής έρευνας. Τα δακτυλικά αποτυπώματα με βάση την PCR μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν σε γονικές δοκιμές κατά τις οποίες ένα άτομο συγκρίνεται με τους στενούς συγγενείς του και μπορεί να επιβεβαιωθεί ή να αποκλειστεί ο πραγματικός βιολογικός πατέρας ενός παιδιού. Το τεστ DNA μπορεί επίσης να επιβεβαιώσει τους βιολογικούς γονείς ενός υιοθετημένου παιδιού. Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου, που βασίζεται στο φθορισμό, έχει γίνει η τεχνολογία αναφοράς για την ανίχνευση νουκλεϊκών οξέων σε κάθε τομέα της μικροβιολογίας, της βιοϊατρικής έρευνας, της βιοτεχνολογίας και των εγκληματολογικών εφαρμογών. ⁽⁶¹⁻⁶²⁾

Μετά την ενίσχυση του προϊόντος με τη μέθοδο PCR, η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης είναι ο πιο αποτελεσματικός τρόπος διαχωρισμού θραυσμάτων DNA διαφορετικών μεγεθών. Μετά τον διαχωρισμό, τα μόρια DNA μπορούν να οραματιστούν

υπό υπεριώδες φως μετά από χρώση με κατάλληλη χρωστική. Τα βήματα που ακολουθούμε για να πραγματοποιηθεί η τεχνική είναι τα ακόλουθα (Εικόνα 23):

1. Ζυγίζουμε τη κατάλληλη μάζα αγαρόζης, ανάλογα με το καλούπι που θέλουμε να φτιάξουμε.
2. Προσθέτουμε το ρυθμιστικό διάλυμα και θερμαίνουμε το μίγμα σε φούρνο μικροκυμάτων.
3. Ανακινούμε τη κωνική φιάλη μέχρι να διαλυθεί όλη η αγαρόζη.
4. Αφήνουμε την αγαρόζη να κρυώσει είτε στον πάγκο είτε σε υδατόλουτρο 65 °C.
5. Τοποθετούμε το δίσκο γέλης στη συσκευή χύτευσης.
6. Τοποθετούμε μια κατάλληλη χτένα στο καλούπι gel για να δημιουργήσουμε τα φρεάτια.
7. Ρίχνουμε τη λιωμένη αγαρόζη στη φόρμα γέλης. Αφήνουμε την αγαρόζη να πήξει σε θερμοκρασία δωματίου και μετά αφαιρούμε τη χτένα.
8. Προσθέτουμε τη χρωστική φόρτωσης στα δείγματα DNA που πρόκειται να διαχωριστούν.
9. Προγραμματίζουμε την παροχή ρεύματος στην επιθυμητή τάση.
10. Προσθέτουμε αρκετό ρυθμιστικό για να καλύψουμε την επιφάνεια του gel.
11. Φορτώνουμε αργά και προσεκτικά τα δείγματα DNA στο πήκτωμα.
12. Επανατοποθετούμε το καπάκι στο κουτί γέλης. Η κάθοδος (μαύρα καλώδια) πρέπει να είναι πιο κοντά στα φρεάτια από την άνοδο (κόκκινα καλώδια).
13. Ενεργοποιούμε το ρεύμα. Τρέχουμε το gel έως ότου η βαφή έχει μετακινηθεί σε κατάλληλη απόσταση.



Εικόνα 23: Προετοιμασία ενός πηκτώματος αγαρόζης για ηλεκτροφόρηση DNA.⁽⁶³⁾

Οι βαφές φόρτωσης που χρησιμοποιούνται στην ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα εξυπηρετούν τρεις κύριους σκοπούς. Πρώτα προσθέτουν πυκνότητα στο δείγμα, επιτρέποντάς του να βυθιστεί στο πήκτωμα. Δεύτερον, οι βαφές παρέχουν χρώμα και απλοποιούν τη διαδικασία φόρτωσης. Τέλος, οι χρωστικές κινούνται με τυπικούς ρυθμούς μέσω της γέλης, επιτρέποντας την εκτίμηση της απόστασης που έχουν μεταναστεύσει τα θραύσματα DNA. Η SYBR gold και η SYBR green είναι και οι δύο εξαιρετικά ευαίσθητες, εξαρτώμενα από την υπεριώδη ακτινοβολία χρωστικές με χαμηλότερη τοξικότητα από το EtBr. Τα ακριβή μεγέθη των διαχωρισμένων θραυσμάτων DNA μπορούν να προσδιοριστούν σχεδιάζοντας το μοριακό βάρος για τις διαφορετικές ζώνες ενός προτύπου DNA σε σχέση με την απόσταση που διανύει κάθε ζώνη. Το πρότυπο DNA περιέχει ένα μείγμα θραυσμάτων DNA προκαθορισμένων μεγεθών που μπορούν να συγκριθούν με τα άγνωστα δείγματα DNA. Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι διαφορετικές μορφές DNA κινούνται μέσω της γέλης με διαφορετικούς ρυθμούς. Το υπερτυλιγμένο πλασμιδικό DNA, λόγω της συμπαγούς διαμόρφωσης του, κινείται μέσω της γέλης ταχύτερα, ακολουθούμενο από ένα γραμμικό θραύσμα DNA του ίδιου μεγέθους, με την ανοιχτή κυκλική μορφή να ταξιδεύει πιο αργά. ⁽⁶³⁾

Τα δείγματα που έχουν προσδιοριστεί χρησιμοποιούνται για τη δημιουργία προφίλ DNA και την καταγραφή του DNA στη βάση δεδομένων. Το σύστημα CODIS (Combined DNA Index System) αναφέρεται στο λογισμικό του Ομοσπονδιακού Γραφείου Ερευνών (FBI) που σχετίζεται με βάσεις δεδομένων εγκληματολογικού DNA που διατηρούνται σε τοπικό, πολιτειακό και ομοσπονδιακό επίπεδο. Το CODIS διαθέτει τρεις κύριες βάσεις δεδομένων: τον δράστη, τους αγνοούμενους και τις βάσεις δεδομένων εγκληματολογικών υποθέσεων. Η βάση δεδομένων αναφοράς παραβατών αποτελείται από προφίλ που ανήκουν σε καταδικασμένα άτομα και συλληφθέντες ανάλογα με την τοπική και ομοσπονδιακή νομοθεσία. Όταν ασχολούμαστε με ένα προφίλ δράστη, υπάρχουν δύο βασικοί τρόποι με τους οποίους γίνεται η ταυτοποίηση. Πρώτον, το προφίλ ενός άγνωστου δράστη αναζητείται σε σχέση με τη βάση δεδομένων του δράστη/συλλαμβανόμενου CODIS είτε για τον εντοπισμό ενός υπόπτου από γνωστούς δράστες είτε για τη σύνδεση μεταξύ εγκλημάτων και δεύτερον δημιουργώντας μια τυχαία πιθανότητα αντιστοίχισης, την πιθανότητα ένα τυχαίο άτομο από έναν δεδομένο πληθυσμό να εμφανίζει τον συγκεκριμένο συνδυασμό αλληλόμορφων που εμφανίζει ένα γνωστό, ύποπτο άτομο. Επειδή ορισμένα αλληλόμορφα και συνδυασμοί αλληλόμορφων έχουν υψηλότερη συχνότητα σε ορισμένους

πληθυσμούς από ό,τι σε άλλους, απαιτούνται ξεχωριστές βάσεις δεδομένων για τους διαφορετικούς πληθυσμούς για να λάβουν υπόψη τις συχνότητες αλληλόμορφων για συγκεκριμένο πληθυσμό κατά την εκτίμηση των πιθανοτήτων τυχαίας αντιστοίχισης. Η απόκτηση της πιθανότητας τυχαίας αντιστοίχισης για ένα ύποπτο ατομικό προφίλ σε καθεμία από τις διαφορετικές εθνικές βάσεις δεδομένων παρέχει ένα πιο πλήρες και ακριβές αποτέλεσμα από αυτό για τη συνδυασμένη βάση δεδομένων. Το Εθνικό Συμβούλιο Έρευνας συνιστά η γενετική διαφοροποίηση μεταξύ των υποομάδων (δηλαδή της γενετικής υποδιαίρεσης) τέτοιων βάσεων δεδομένων να είναι χαμηλότερη από το 3% της συνολικής γενετικής διαφοροποίησης εντός αυτής της βάσης δεδομένων για να παρέχει αξιόπιστες τυχαίες πιθανότητες αντιστοίχισης. ⁽⁶⁴⁻⁶⁵⁾

5. Συμπεράσματα

Ο τομέας της εγκληματολογίας περιλαμβάνει και άλλους κλάδους. Σ' αυτό εμπεριέχονται η Κοινωνιολογία, η Ψυχολογία, η Νομική, η Βιολογία και η Χημεία. Η μελέτη της εγκληματολογίας σαν επιστήμη ξεκινά από το 1700. ο πατέρας της σύγχρονης εγκληματολογίας, Cesare Lombroso, θέλησε να προσπαθήσει να μάθει τα αίτια που οδήγησαν κάποιον στο έγκλημα. Η εξέλιξη της εγκληματολογίας πραγματοποιήθηκε τον προηγούμενο αιώνα. Στη σημερινή εποχή, με τη βοήθεια και άλλων επιστημών (Βιολογία, Χημεία) είναι πιο εύκολο οι εγκληματολόγοι να λύσουν ποινικές υποθέσεις και να προσδιορίσουν τα αίτια, τους δράστες, τις συνθήκες του εγκλήματος.

Για να είναι έγκυρο ένα αποτέλεσμα και να μην υπάρχει καμία αμφιβολία για την αληθότητά του, υπάρχουν κάποιοι παράγοντες που παίζουν καθοριστικό ρόλο. Η εκτίμηση του χρόνου θανάτου του ανθρώπου είναι ένα κομβικό σημείο της έρευνας στον εγκληματολογικό τομέα. Υπάρχουν πολλοί τρόποι για να υπολογίσουμε το χρόνο θανάτου. Ο πιο απλός τρόπος είναι η παρατήρηση του σώματος. Επιπλέον, η μέτρηση των ιόντων καλίου στο υγρό του υαλοειδούς σώματος των οφθαλμών και το φαινόμενο «livor mortis» είναι διαφορετικοί τρόποι οι επιστήμονες να εκτιμήσουν το χρόνο θανάτου.

Σε κάθε έγκλημα συλλέγονται διάφορα δείγματα. Αυτά τα δείγματα πρέπει να παρθούν σύμφωνα με κάποιες προδιαγραφές ώστε να μην αλλοιωθούν πριν φτάσουν στο εργαστήριο. Κάθε δείγμα λαμβάνει ένα μοναδικό κωδικό που καθορίζεται από το άτομο που το συλλέγει. Στη συνέχεια τα δείγματα κατηγοριοποιούνται ανάλογα με τη φύση τους. Τα βιολογικά δείγματα είναι αυτά που θα παίζουν καθοριστικό ρόλο στην εξέλιξη της έρευνας. Το αίμα, το σάλιο, το σπέρμα, τα οστά, οι ίνες ρούχων είναι μερικά παραδείγματα βιολογικών υλικών.

Το ανθρώπινο αίμα αποτελείται από το πλάσμα και τα κύτταρά του. Υπάρχουν πολλές τεχνικές για την ύπαρξη ή μη αίματος στη σκηνή του εγκλήματος. Αναλυτικότερα, η Kastle-Mayer, το τεστ λουμινόλης, η μέθοδος Adler ή βενζιδίνης εφαρμόζονται στα εγκληματολογικά εργαστήρια. Η ύπαρξη του σάλιου στο μέρος που διεπράχθει το έγκλημα μπορεί να προσδιοριστεί με την ανοσολογική μέθοδο RSID και η πλήρης ταυτοποίησή του να γίνει με χρήση της φασματομετρίας μάζας ή Real Time PCR. Ακόμη, τα οστά μπορούν να συμβάλλουν στο προσδιορισμό του χρόνου θανάτου με χρήση της φασματοσκοπίας υπερύθρου. Οι ερευνητές εντοπίζουν τρίχες στη σκηνή του εγκλήματος και μέσα από την ανάλυση του DNA γίνεται η αξιολόγησή τους. Οι τεχνικές που χρησιμοποιούνται για την

ανάλυση των τριχών είναι ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης, χρωματογραφικές μεθόδους (TLC, HPLC) και φασματοσκοπία υπερύθρου. Πέρα από τις παραπάνω μεθόδους που χρησιμοποιούνται και για την ανάλυση ινών στα ρούχα, η φασματοσκοπία ορατού – υπεριώδους βοηθά στη ταυτοποίηση των ινών.

Στη παρούσα εργασία παρουσιάστηκαν οι εξής τεχνικές: αέρια χρωματογραφία, υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης, χρωματογραφία λεπτής στοιβάδα, φασματοσκοπία υπερύθρου και Raman, φασματομετρία μάζας, περίθλαση ακτίνων X, αλληλούχηση κατά Sanger, δεύτερης και τρίτης γενιάς, ισόθερμη ενίσχυση μέσω βρόχου, ELISA, Real Time PCR και ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης. Στις παραπάνω τεχνικές περιγράφηκε η αρχή της κάθε μεθόδου και τονίστηκαν οι εφαρμογές τους στο τομέα της εργαστηριακής εγκληματολογίας. Τέλος, έγινε και αναφορά σε νέες τεχνικές που θα παίζουν καθοριστικό ρόλο στην εξέλιξη του τομέα στο μέλλον.

Συνεπώς, είναι σημαντικό να τονιστεί ότι η εργαστηριακή εγκληματολογία αποτελεί πόλος έλξης για πολλούς ερευνητές και τα ευρήματα των ερευνών έχουν επιδείξει την αποτελεσματικότητά της. Περαιτέρω μελλοντικές έρευνες σχετικά με το θέμα αυτό θα βοηθήσουν στην αυτοβελτίωση του σε όλους τους επιστημονικούς τομείς.

Βιβλιογραφία

- (1) J. Braithwaite, The New Regulatory State and the Transformation of Criminology, *The British Journal of Criminology*, Volume 40, Issue 2, March 2000, p. 222–238.
- (2) E. Mistek, M.A. Fikiet , S. R Khandasammy, I.K. Lednev, Toward Locard's Exchange Principle: Recent Developments in Forensic Trace Evidence Analysis, *Anal. Chem.*, Volume 91, Issue 1, p. 637-654.
- (3) C. Henssge, B. Madea, Estimation of the time since death, *Forensic Sci. Int.*, Volume 165, 2007, p. 182–184.
- (4) M.J. Buchan, G.S. Anderson, Time since death: A review of the current status of methods used in the later postmortem interval, *J. Can. Soc. Forensic Sci.*, Volume 34, 2001, p. 1–22.
- (5) A. De Matteis, Z. Del Fante, P. Santoro, Forensic pathology: past, present and future, *Clin Ter.*, Volume 171, Issue 4, Jul-Aug 2020, p. 302- 303.
- (6) A. Mathur, Y.K. Agrawal, An overview of methods used for estimation of time since death, *Australian Journal of Forensic Sciences*, Volume 43, 2011, p. 275-285.
- (7) Bao-Li Zhu, Zhi-Peng Cao, Application of Postmortem Biochemistry Analysis in Forensic Medicine, *Fa Yi Xue Za Zhi*, Volume 37, Issue 6, Dec 2021, p. 859-866.
- (8) Z. Kotzé, S. Aimar, J. Amendt, G.S. Anderson, L. Bourguignon, M.J.R. Hall, J.K. Tomberlin, The Forensic Entomology Case Report-A Global Perspective, *Insects.*, Volume 12, Issue 4, Mar 2021, p. 283.
- (9) R. A. Wickenheiser, Proactive crime scene response optimizes crime investigation, *Forensic Sci Int Synerg.*, Volume 15, Issue 6, Mar 2023, p. 100325.
- (10) J. Burrill, B. Daniel, N. Frascione, A Review of Trace “Touch DNA” Deposits: Variability Factors and an Exploration of Cellular Composition. *Forensic Sci. Int. Genet.*. Volume 39, 2019, p. 8–18.
- (11) D.A. Skoog, F.J. Holler, S.R. Crouch, Αρχές Ενόργανης Ανάλυσης (Απόδοση στα ελληνικά: Μ.Ι. Καραγιάννης & Κ.Η. Ευσταθίου), 2007, Αθήνα: Εκδόσεις Κωσταράκη, 6η έκδοση.
- (12) A.F. Machado Botelho, A. M. Donato Machado, R.H. Santana da Silva, A. C. Faria, L. S. Machado, H. Santos, Sandro de Melo Braga, B. B. Junta Torres, M.P. Miguel, A. R. Chaves, M.M. Melo, Fatal metaldehyde poisoning in a dog confirmed by gas chromatography, *BMC Vet Res.*, Volume 16, 2020, p. 139.

- (13) C. Ribeiro, C. Santos, V. Gonçalves, A. Ramos, C. Afonso, M. E. Tiritan, Chiral Drug Analysis in Forensic Chemistry: An Overview, *Molecules*, Volume 23, Issue 2, Feb 2018, p. 262.
- (14) B. Jain, R. Jain, A. Kabir, S. Sharma, Rapid Determination of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs in Urine Samples after In-Matrix Derivatization and Fabric Phase Sorptive Extraction-Gas Chromatography-Mass Spectrometry Analysis, *Molecules*, Volume 25, Issue 21, Nov. 2022, p. 7188.
- (15) G. Heide, G. Hoiseth, G. Middelkoop, A.M.L. Oiestad, Blood Concentrations of Designer Benzodiazepines: Relation to Impairment and Findings in Forensic Cases, *J. Anal. Toxicol.*, Volume 44, Issue 8, Dec. 2020, p. 905-914.
- (16) A. Stroud, A. Gamblin, P. Birchall, SallyAnn Harbison, S. Opperman, A comprehensive study into false positive rates for 'other' biological samples using common presumptive testing methods, *Sci Justice*, Volume 63, Issue 3, May 2023, p. 414-420.
- (17) A. Gressner, O. Gressner, Pyramidon-Test, Jan 2018, ISBN: 978-3-662-49054-9.
- (18) J. Sloots, W. Lalonde, B. Reid, J. Millman, Kastle-Meyer blood test reagents are deleterious to DNA, *Forensic Sci Int.*, Volume 281, Dec 2017, p. 141-146.
- (19) J. Hietpas, J. Buscaglia, A. H. Richard, S. Shaw, H.S. Castillo, J. Donfack, Microscopical characterization of known postmortem root bands using light and scanning electron microscopy, *Forensic Sci Int.*, Volume 267, Oct 2016, p. 7-15.
- (20) M. Poetzsch, M. R. Baumgartner, A. E. Steuer, T. Kraemer, Segmental hair analysis for differentiation of tilidine intake from external contamination using LC-ESI-MS/MS and MALDI-MS/MS imaging, *Drug Test Anal.*, Volume 7, Issue 2, Feb 2015, p. 143-149.
- (21) S. Chatterjee, Saliva as a forensic tool, *J. Forensic Dent Sci.*, Volume 11, Issue 1, 2019, p. 1-4.
- (22) L. Bianchi, P. Liò, Forensic DNA and bioinformatics, *Brief Bioinform.*, Volume 8, 2007, p. 117-128.
- (23) D. H. Ubelaker, C. Thomas, J. E. Olson, The impact of age at death on the lag time of radiocarbon values in human bone, *Forensic Sci Int.*, Volume 251, Jun 2015, p. 56-60.

- (24) M. Piglionica, A. De Donno, S. L. Baldassarra, V. Santoro, A. Scorca, F. Introna, A. Dell' Erba, Extraction of DNA from bones in cases where expectations for success are low, *Am J Forensic Med Pathol.*, Volume 33, Issue 4, Dec 2012, p. 322-327.
- (25) A. Carfora, C. P. Campobasso, P. Cassandro, R. Petrella, R. Borriello, Long-Term Detection in Hair of Zolpidem, Oxazepam and Flunitrazepam in a Case of Drug-Facilitated Sexual Assault, *J. Anal. Toxicol.*, Volume 46, Issue 1, Feb 2022, p. 16-20.
- (26) V. Causin, C. Marega, G. Guzzini, A. Marigo, Forensic analysis of poly(ethylene terephthalate) fibers by infrared spectroscopy, *Appl Spectrosc.*, Volume 58, Issue 11, Nov 2004, p. 1272-1276.
- (27) J.V. Goodpaster, E. A. Liszewski, Forensic analysis of dyed textile fibers, *Anal Bioanal Chem*, Volume 394, Issue 8, Aug 2009, p. 2009-2018.
- (28) B. Behnoush, A. Sheikhezadi, E. Bazmi, A. Fattahi, E. Sheikhezadi, S. Hossein S. Anary, Comparison of UHPLC and HPLC in Benzodiazepines Analysis of Postmortem Samples, *Medicine (Baltimore)*, Volume 94, Issue 14, Apr 2015, p. 640.
- (29) K. Alkhuder, Attenuated total reflection-Fourier transform infrared spectroscopy: a universal analytical technique with promising applications in forensic analyses, *Int. J. Legal Med.*, Volume 136, Issue 6, 2022, p. 1717–1736.
- (30) A. Aljannahi, R. A. Alblooshi, R.H. Alremeithi, I. Karamitsos, N. A. Ahli, A. M. Askar, I. M. Albastaki, M.M. Ahli, S. Modak, Forensic Analysis of Textile Synthetic Fibers Using a FT-IR Spectroscopy Approach, *Molecules*, Volume 27, Issue 13, Jul 2022, p. 4281.
- (31) A. Takamura, K. Watanabe, T. Akutsu, T. Ozawa, Soft and robust identification of body fluid using Fourier transform infrared spectroscopy and chemometric strategies for forensic analysis, *Sci Rep.*, Volume 8, 2018, p. 8459–8462.
- (32) K.M. Elkins, Rapid presumptive "fingerprinting" of body fluids and materials by ATR FT-IR spectroscopy, *J. Forensic Sci.*, Volume 56, 2011, p. 1580–1587.

- (33) H.H. Maurer, Mass spectrometry for research and application in therapeutic drug monitoring or clinical and forensic toxicology, *Ther Drug Monit.*, Volume 40, 2018, p. 389–393.
- (34) M. Fagiola, Current and future directions of high resolution and tandem mass spectrometry in postmortem and human performance toxicology, *Leg Med (Tokyo)*, Volume 37, 2019, p. 86–94.
- (35) H. H. Maurer, Hyphenated high-resolution mass spectrometry—the “all-in-one” device in analytical toxicology?, *Anal Bioanal Chem.*, Volume 413, Issue 9, 2021, p. 2303–2309.
- (36) M. Carson, S. Kerrigan, Quantification of suvorexant in urine using gas chromatography/mass spectrometry, *Journal of Chromatography B.*, Volume 1040, 2017, p. 289–294.
- (37) N. G. Salazar Mogollón, C.D. Quiroz-Moreno, P.S. Prata, J. R. de Almeida, A. S. Cevallos, R. T. Guiérrez, F. Augusto, New Advances in Toxicological Forensic Analysis Using Mass Spectrometry Techniques, *J Anal Methods Chem.*, 2018, p. 4142527.
- (38) J. Thunig, L. Flo, S. Pedersen-Bjergaard, S.H. Hansen, C. Janfelt, Liquid-phase microextraction and desorption electrospray ionization mass spectrometry for identification and quantification of basic drugs in human urine, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, Volume 26, Issue 2, 2012, p. 133–140.
- (39) T.J. Kauppila, A. Flink, M. Haapala, et al., Desorption atmospheric pressure photoionization–mass spectrometry in routine analysis of confiscated drugs. *Forensic Science International*, *Forensic Science International*, Volume 210, 2011, p. 206–212.
- (40) A. H. Grange, G. W. Sovocool, Detection of illicit drugs on surfaces using direct analysis in real time (DART) time-of-flight mass spectrometry, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, Volume 25, Issue 9, 2011, p. 1271–1281.
- (41) J. A. Michely, M. R. Meyer, H. H. Maurer, Paper spray ionization coupled to high resolution tandem mass spectrometry for comprehensive urine drug testing in comparison to liquid chromatography-coupled techniques after urine precipitation or dried urine spot workup, *Anal Chem.*, Volume 89, Issue 21, 2017, p. 11779–11786.

- (42) W.H. Müller, A. Verdin, E. De Pauw, C. Malherbe, G. Eppe, Surface-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry imaging: A review, *Mass Spectrom Rev.*, Volume 41, Issue 3, May 2022, p. 373-420.
- (43) L. Rubio, J. Suárez, S. Martin-de-las-Heras, S. C. Zapico, Partners in Postmortem Interval Estimation: X-ray Diffraction and Fourier Transform Spectroscopy, *Int. J. Mol. Sci.*, Volume 24, Issue 7, Apr 2023, p. 6793.
- (44) K. Virkler, I.K. Lednev, Analysis of body fluids for forensic purposes: from laboratory testing to non-destructive rapid confirmatory identification at a crime scene, *Forensic Sci. Int.*, Volume 188, Issue 1, 2009, p. 1-17.
- (45) J. Fujihara, Y. Fujita, T. Yamamoto, N. Nishimoto, K. Kimura-Kataoka, S. Kurata, T. Takinami, T. Yasuda, H. Takeshita, Blood identification and discrimination between human and nonhuman blood using portable Raman spectroscopy, *Int. J. Leg. Med.*, 2016, p. 1-4.
- (46) M. S. Tabatabaei, M. Ahmed, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA), *Methods Mol Biol*, Volume 2508, 2022, p. 115-134.
- (47) Ανδρέας Σκορίλας, Κλινική Βιοχημεία και Μοριακή Διαγνωστική, Βασικές Αρχές και Σύγχρονες Προσεγγίσεις, 2020, Εκδόσεις Π. Χ. Πασχαλίδης και Broken Hill Publishers Ltd, ISBN: 978-9925-576-64-7.
- (48) M.J. Sue, S. K. Yeap, A.R. Omar, S.W. Tan, Application of PCR-ELISA in Molecular Diagnosis, *Biomed Res Int.*, 2014, p. 653014.
- (49) J. Old, B.A. Schweers, P.W. Boonlayangoor, B. Fischer, K.W.P. Miller, K. Reich, Development validation of RSID™-Semen: a lateral flow immunochromatographic strip test for the forensic detection of semen, *J. Forensic Sci.*, Volume 57, 2011, p. 489-499.
- (50) B. M. Crossley, J. Bai, A. Glaser, R. Maes, E. Porter, M. L. Killian, T. Clement, K. Toohey-Kurth, Guidelines for Sanger sequencing and molecular assay monitoring, *J. Vet Diagn Invest.*, Volume 36, Issue 6, Nov 2020, p. 767-775.
- (51) B. Bruijns, R. Tiggelaar, H. Gardeniers, Massively parallel sequencing techniques for forensics: A review, *Electrophoresis*, Volume 39, Issue 21, Nov 2018, p. 2642-2654.
- (52) Y. Yang, B. Xie, J. Yan, Application of Next-generation Sequencing Technology in Forensic Science, *Genomics Proteomics Bioinformatics*, Volume 12, Issue 5, Oct 2014, p. 190-197.

- (53) E. Rizzi, M. Lari, E. Gigli, G. De Bellis, D. Caramelli, Ancient DNA studies: new views on old samples, *Genet Sel Evol.*, Volume 44, 2012, p. 21.
- (54) D.M. Bornman, M.E. Hester, J.M. Schuetter, M.D. Kasoji, A. Minard-Smith, C.A. Barden, Short-read, high-throughput sequencing technology for STR genotyping, *Biotechniques*, 2012, p. 1–6.
- (55) D.H. Warshauer, D. Lin, K. Hari, R. Jain, C. Davis, B. LaRue, STRait Razor: a length-based forensic STR allele-calling tool for use with second generation sequencing ,data, *Forensic Sci Int Genet.*, Volume 7, 2013, p. 409–417.
- (56) H. Kim, H. A. Erlich,. C. D. Calloway, Analysis of mixtures using next generation sequencing of mitochondrial DNA hypervariable regions, *Croat Med J.*, Volume 56, Issue 3, Jun 2015, p. 208–217.
- (57) T. Melton, C. Holland, M. Holland, Forensic mitochondrial DNA analysis: current practices and future potentials, *Forensic Science Review*, 2012, p. 101-122.
- (58) C. Torres, E.A. Vitalis, B.R. Baker, S.N. Gardner, M.W. Torres, J.M. Dzenitis, LAVA: an open-source approach to designing LAMP (loop-mediated isothermal amplification) DNA signatures, *BMC Bioinform.*, Volume 12, 2011, p. 240.
- (59) S.Y. Lee, M.J. Kim, Y. Hong, H.Y. Kim, Development of a rapid on-site detection method for pork in processed meat products using real-time loop-mediated isothermal amplification, *Food Control*, Volume 66, 2016, p. 53-61.
- (60) L.C. Tsai, C.W. Su, J.C. Lee, Y.S. Lu, H.C. Chen, Y.C. Lin, A. Linacre, H.M. Hsieh, The detection and identification of saliva in forensic samples by RT-LAMP, *Forensic Sci Med Pathol.*, Volume 14, Issue 4, Dec 2018, p. 469-477.
- (61) H. Fukumoto, Y.Sato, H. Hasegawa, H. Saeki, H. Katano, Development of a new real-time PCR system for simultaneous detection of bacteria and fungi in pathological samples, *Int J Clin Exp Pathol.*, Volume 8, Issue 11, 2015, p. 15479–15488.
- (62) H. Zhu, H. Zhang, Y. Xu, S. Laššáková, M. Korabečná, P. Neužil, PCR past, present and future, *Biotechniques*, Jul 2020.
- (63) P.Y. Lee, J. Costumbrado, H. Chih-Yuan, Y. H. Kim, Agarose Gel Electrophoresis for the Separation of DNA Fragments, *J Vis Exp.*, Volume 62, 2012, p. 3923.

- (64) C.A. Crouse, L. Bauer, T. Sessa, A. Looper, J. Sikorsky, D.T. Yeatman, Combined DNA Index System (CODIS)-Based analysis of untested sexual assault evidence in Palm Beach County Florida, *Forensic Sci Int Synerg.*, Volume 1, Sep 2019, p. 253-270.
- (65) J.A. Weise, J. Ng, R.F. Oldt, J. Viray, K.L. McCulloh, D.G. Smith, S. Kanthaswamy, Genetic differentiation between and within Northern Native American language groups: an argument for the expansion of the Native American CODIS database, *Forensic Sci Res*, Volume 7, Issue 4, Sep 2021, p. 662-672.
- (66) M. L. Smith, E. Shimomura, B. D. Paul, Urinary Excretion of Ecgonine and Five Other Cocaine Metabolites Following Controlled Oral, Intravenous, Intranasal, and Smoked Administration of Cocaine, *J. Anal Toxicol.*, Volume 34, Issue 2, Mar 2010, p. 57-63.
- (67) R.R. Bravo, A. C. Faria, A. M. Brito-da-Costa, P. Mladenka, D. Dias da Silva, F. Remiao, Cocaine: An Updated Overview on Chemistry, Detection, Biokinetics, and Pharmacotoxicological Aspects including Abuse Pattern, *Toxins (Basel)*, Volume 14, Issue 4, Apr 2022, p. 278.
- (68) B. Brunet, A. Barnes, K.B. Scheidweiler, P. Mura, M. A. Huestis, Development and validation of a solid-phase extraction gas chromatography-mass spectrometry method for the simultaneous quantification of methadone, heroin, cocaine and metabolites in sweat, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, Volume 392, August 2008, p. 115-127.
- (69) R. Mandrioli, L. Mercolini, M. Protti, Blood and Plasma Volumetric Absorptive Microsampling (VAMS) Coupled to LC-MS/MS for the Forensic Assessment of Cocaine Consumption, *Molecules*, Volume 5, Issue 5, Feb 2020, p. 1046.
- (70) E.L. Menzies, J.R.H. Archer, P.I. Dargan, M.C. Parkin, T. Yamamoto, D.M. Wood, R.A. Braithwaite, S.P. Elliott, A.T. Kicman, Detection of cocaine and its metabolites in whole blood and plasma following a single dose, controlled administration of intranasal cocaine, *Drug Test Anal.*, Volume 11, Issue 9, Sep 2019, p. 1419-1430.
- (71) M.C. Rotolo, R. Pacifici, M. Pellegrini, S. Cardullo, L.J. Gómez Pérez, D. Cuppone, L. Gallimberti, G. Madeo, Hair Testing for Classic Drugs of Abuse to Monitor Cocaine Use Disorder in Patients Following Transcranial Magnetic

- Stimulation Protocol Treatment, *Biology (Basel)*, Volume 10, Issue 5, May 2021, p. 403.
- (72) M. Nishida, A. Namera, M. Yashiki, T. Kojima, On-column derivatization for determination of amphetamine and methamphetamine in human blood by gas chromatography–mass spectrometry, *Forensic Science International*, Volume 125, Issues 2–3, Feb 2002, p. 156-162.
- (73) K. Watanabe, N. Okamoto, I. Yamagishi, H. Nozawa, A. Ishii, O. Suzuki, Simple Analysis of Amphetamines in Human Whole Blood and Urine by Headspace Capillary Gas Chromatography with Large Volume Injection, *Chromatographia*, Volume 58, Oct 2003, p. 455–458.
- (74) C. Hasegawa, T. Kumazawa, Xiao-Pen Lee, A. Marumo, N. Shinmen, H. Seno, K. Sato, Pipette tip solid-phase extraction and gas chromatography - mass spectrometry for the determination of methamphetamine and amphetamine in human whole blood, *Anal Bioanal Chem*, Volume 389, Issue 2, Sep 2007, p.563-570.
- (75) P. Li, H. Han, X. Zhai, W. He, L. Sun, J. Hou, Simultaneous HPLC-UV determination of ketamine, xylazine, and midazolam in canine plasma, *J. Chromatogr Sci.*, Volume 50, Issue 2, Feb 2012, p. 108-113.
- (76) J. Y. K. Cheng, V. K. K. Mok, Rapid determination of ketamine in urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry for a high throughput laboratory, *Forensic Sci Int.*, Volume 142, Issue 2, May 2004, p. 9-15.
- (77) Chu-An Yang, Hsiu-Chuan Liu, Dong-Liang Lin, R. H. Liu, You-Zung Hsieh, Shu-Pao Wu, Simultaneous Quantitation of Methamphetamine, Ketamine, Opiates and their Metabolites in Urine by SPE and LC-MS-MS, *J. Anal. Toxicol.*, Volume 41, Issue 8, Oct 2017, p. 679-687.
- (78) M. Roberts, N. Petraco, M. Gittings, Novel method for the detection of nitroglycerin in smokeless powders, *Science & Justice*, Volume 55, Issue 6, Dec 2015, p. 467-471.
- (79) Aikaterini S. Chajistamatiou, Evangelos B. Bakeas, A rapid method for the identification of nitrocellulose in high explosives and smokeless powders using GC–EI–MS, *Talanta*, Volume 151, May 2016, p. 192-201.
- (80) W. Pawlowski, L. Matyjasek, K. Cieslak, M. Karpinska, Contamination with explosives in analytical laboratory procedure, *Forensic Sci Int.*, Volume 281, Dec 2017, p. 13-17.

- (81) Y. Zhuo, P. Xiang, J. Wu, X. Wangb, Segmental hair analysis for flunitrazepam and 7-aminoflunitrazepam in users: a comparison to existing literature, *Forensic Sci Res.*, Volume 7, Issue 2, Oct 2020, p. 299–307.
- (82) J. Kim, H. Yum, M. Jang, et al., A comprehensive and sensitive method for hair analysis in drug-facilitated crimes and incorporation of zolazepam and tiletamine into hair after a single exposure, *Anal Bioanal Chem.*, Volume 408, 2016, p. 251–263.
- (83) P. Xiang, Q. Sun, B. Shen, et al., Segmental hair analysis using liquid chromatography-tandem mass spectrometry after a single dose of benzodiazepines, *Forensic Sci Int*, Volume 204, 2011, p. 19–26.
- (84) C. Muehlethaler, G. Massonnet, P. Buzzini, Influence of the shaking time on the forensic analysis of FTIR and Raman spectra of spray paints, *Forensic Sci. Int.*, Volume 237, April 2014, p. 78-85.
- (85) C. Muehlethaler, G. Massonnet, P. Esseiva, The application of chemometrics on infrared and Raman spectra as a tool for the forensic analysis of paints, *Forensic Sci. Int.*, Volume 209, 2011, p. 173-182.
- (86) S. Sharma, R. Chophi, C. Kaur, R. Singh, Chemometric analysis on ATR-FT-IR spectra of spray paint samples for forensic purposes, *J Forensic Sci*, Volume 66, Issue 6, Nov 2021, p. 2190-2200.
- (87) J.P. Goullé, L. Mahieu, J. Castermant, N. Neveu, L. Bonneau, G. Lainé, D. Bouige, C. Lacroix, Metal and metalloid multi-elementary ICP-MS validation in whole blood, plasma, urine and hair: Reference values, *Forensic Sci. Int.*, Volume 153, Issue 1, Oct 2005, p. 39-44.
- (88) V. Vacchina, V. Huin, S. Hulo, D. Cuny, F. Broly, G. Renom, Jean-Marc Perini, Use of dried blood spots and inductively coupled plasma mass spectrometry for multi-element determination in blood, *J. Trace Elements in Medicine and Biology*, Volume 28, Issue 3, July 2014, p. 255-259.
- (89) M. Alrobaian, H. Arida, Assessment of Heavy and Toxic Metals in the Blood and Hair of Saudi Arabia Smokers Using Modern Analytical Techniques, *Int J Anal Chem.*, Jun 2019, p. 7125210.
- (90) H. Guo, Y. Yao, Y. Li, P. Wang, C. Hu, M. Yuan, H. Mei, J. Zhu, A case study in forensic soil comparison, *Journal of Forensic Sciences*, Volume 67, Issue 2, March 2022, p. 766-774.

- (91) C. Hu, H. Mei, H. Guo, P. Wang, J. Zhu, The analysis of soil evidence to associate criminal tool and location, *Forensic Sci. Int.*, Volume 309, April 2020, p. 110231.
- (92) L. Heudt, D. Debois, T.A. Zimmerman, L. Köhler, F. Bano, F. Partouche, A.S. Duwez, B. Gilbert, E. Pauw, Raman spectroscopy and laser desorption mass spectrometry for minimal destructive forensic analysis of black and color inkjet printed documents, *Forensic Sci. Int.*, Volume 219, Jan 2012, p. 64-75.
- (93) A. Braz, M. Lopez, C. García-Ruiz, Raman spectroscopy for forensic analysis of inks in questioned documents, *Forensic Sci. Int.*, Volume 232, Issues 1–3, Oct 2013, p. 206-212.
- (94) U. N. Stanley, A. M. Khadija, A. T. Bukola, I. O. Precious, E. A. Davidson, Forensic DNA Profiling: Autosomal Short Tandem Repeat as a Prominent Marker in Crime Investigation, *Malays J Med Sci.*, Volume 27, Issue 4, Jul 2020, p. 22–35.
- (95) Bo Lin, Jianan Hui, Hongju Mao¹, Nanopore Technology and Its Applications in Gene Sequencing, *Biosensors (Basel)*, Volume 11, Issue 7, Jul 2021, p. 214.

Υπεύθυνη Δήλωση Συγγραφέα:

Δηλώνω ρητά ότι, σύμφωνα με το άρθρο 8 του Ν.1599/1986, η παρούσα εργασία αποτελεί αποκλειστικά προϊόν προσωπικής μου εργασίας, δεν προσβάλλει κάθε μορφής δικαιώματα διανοητικής ιδιοκτησίας, προσωπικότητας και προσωπικών δεδομένων τρίτων, δεν περιέχει έργα/εισφορές τρίτων για τα οποία απαιτείται άδεια των δημιουργών/δικαιούχων και δεν είναι προϊόν μερικής ή ολικής αντιγραφής, οι πηγές δε που χρησιμοποιήθηκαν περιορίζονται στις βιβλιογραφικές αναφορές και μόνον και πληρούν τους κανόνες της επιστημονικής παράθεσης.