



Σχολή Θετικών Επιστημών  
Χημική και Βιομοριακή Ανάλυση

Διπλωματική Εργασία

«ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΕΝΟΡΓΑΝΗΣ ΧΗΜΙΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΚΑΙ Η  
ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΟΥΣ ΣΤΗΝ ΕΓΚΛΗΜΑΤΟΛΟΓΙΑ»

Παλαμάρα Αγγελική

Επιβλέπων καθηγητής : Σκορίλας Ανδρέας

Πάτρα, Φεβρουάριος 2024



Σχολή Θετικών Επιστημών  
Χημική και Βιομοριακή Ανάλυση

Master thesis

TECHNIQUES OF INSTRUMENTAL CHEMICAL  
ANALYSIS AND THEIR APPLICATION IN FORENSICS

Palamara Aggeliki

Patra, February 2024

Παλαμάρα Αγγελική

Επιτροπή Επίβλεψης Πτυχιακής / Διπλωματικής Εργασίας

Επιβλέπων Καθηγητής  
«Σκορίλας Ανδρέας»

Συν-Επιβλέπων Καθηγητής  
Αυγέρης Μαργαρίτης»

Πάτρα, Φεβρουάριος 2024

Η παρούσα εργασία αποτελεί πνευματική ιδιοκτησία της φοιτήτριας («συγγραφέας/δημιουργός») που την εκπόνησε. Στο πλαίσιο της πολιτικής ανοικτής πρόσβασης ο 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. Ο συγγραφέας/δημιουργός διατηρεί το σύνολο των ηθικών και περιουσιακών του δικαιωμάτων

## Περιεχόμενα

|  |    |
|--|----|
| Περίληψη.....  | 6  |
| Abstract.....  | 7  |
| Συντομογραφίες/ακρωνύμια.....  | 8  |
| Κατάλογος εικόνων.....   | 9  |
| Κεφάλαιο 1   |    |
| 1.1 Η επιστήμη της εγκληματολογίας.....  | 10 |
| 1.2 Ο τύπος του εγκλήματος.....  | 11 |
| 1.2.1 Τα στάδια της ανάλυσης.....  | 15 |
| Κεφάλαιο 2: Χρωματογραφικές μέθοδοι  |    |
| 2.1 Αρχή μεθόδου.....  | 17 |
| 2.2 Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης σε δείγματα εδάφους.....  | 24 |
| 2.3 Εφαρμογή HPLC και UHPLC για τον εντοπισμό βενζοδιαζεπινών.....                                       | 26 |
| 2.4 UHPLC- MS/MS για την ανίχνευση ναρκωτικών σε μαλλιά.....   | 27 |
| 2.5 Ανάλυση υπολειμμάτων πυρκαγιάς με φασματομετρία μάζας συζευγμένη με αέρια χρωματογραφία (GC-MS)..... | 30 |
| Κεφάλαιο 3: Φασματοσκοπικές τεχνικές   |    |
| 3.1 Εισαγωγή.....  | 32 |
| 3.2 Φασματοσκοπία μοριακών μαζών MS.....   | 33 |
| 3.2.1 Αρχή μεθόδου.....  | 34 |
| 3.2.2 Διάκριση μελανιών από στυλό με αέρια χρωματογραφία συζευγμένη με φασματομετρία μάζας.....          | 42 |
| 3.2.3 Ανάλυση τρίχας με φασματομετρία μάζας.....   | 44 |
| 3.2.4 MALDI MS σε δακτυλικά αποτυπώματα για την ανίχνευση ναρκωτικών ουσιών.....                         | 46 |
| 3.2.5 Ανίχνευση αναβολικών ανδρογόνων στεροειδών με GC-MS.....   | 49 |
| 3.2.6 Αναγνώριση προφυλακτικού σε μολυσμένα με προφυλακτικά δακτυλικά.....                               | 50 |
| 3.3 Αρχή μεθόδου φασματομετρίας υπεριώδους ορατού.....   | 50 |
| 3.3.1 Οργανολογία.....   | 54 |
| 3.3.2 Εφαρμογή σε διάφορους τύπους χαρτιών.....  | 55 |
| 3.3.3 Εφαρμογή μικροφασματοφωτομετρίας υπ- <i>vis</i> σε ίνες βαμβακιού.....                             | 57 |
| 3.3.4 Εφαρμογή φασματομετρίας υπεριώδους σε μελάνια στυλό.....   | 58 |
| 3.4 Αρχή μεθόδου φασματοσκοπίας Raman.....   | 60 |
| Κεφάλαιο 4: Βαλλιστική και σύγχρονες προσεγγίσεις της  |    |
| 4.1 Γενικά στοιχεία.....   | 64 |
| 4.2 Η μέθοδος.....   | 65 |
| Κεφάλαιο 5 :   |    |
| 5.1 Πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός.....  | 67 |
| 5.2 Εφαρμογές στην εγκληματολογία.....   | 69 |
| Κεφάλαιο 6: Ανάλυση DNA από βιολογικά υλικά  |    |
| 6.1 Εισαγωγή.....  | 70 |
| 6.2 Το DNA και οι πολυμορφισμοί.....   | 71 |
| 6.3 Το μιτοχονδριακό DNA και το χρωμόσωμα.....   | 83 |
| 6.4 Ανάλυση SNPs.....  | 87 |
| 6.4.1 Σύγχρονες μέθοδοι ανάλυσης SNPs.....   | 90 |



## Περίληψη

Η Εγκληματολογία είναι η επιστήμη που μελετά το έγκλημα με πολύπλευρες προσεγγίσεις, κατά κύριο λόγο κοινωνικές και ψυχολογικές, μέσα από την έρευνα. Η έρευνα αυτή περιλαμβάνει τη συλλογή, ανάλυση και ερμηνεία αποδεικτικών στοιχείων από τον τόπο του εγκλήματος. Περιλαμβάνει κλάδους όπως η ιατροδικαστική χημεία, η ανάλυση DNA και η εγκληματολογική παθολογία. Οι εγκληματολόγοι προσπαθούν να διαλευκάνουν τα αίτια αλλά και τρόπους πρόληψης και της διόρθωσης των εγκλημάτων και των επιπτώσεων τους στην κοινωνία μέσω της ιατροδικαστικής έρευνας. Ιατροδικαστική είναι ένας κλάδος της ιατρικής επιστήμης που ασχολείται με την εφαρμογή ειδικών ιατρικών αλλά και άλλων σχετικών επιστημονικών γνώσεων στην υποβοήθηση του έργου της Δικαιοσύνης και άλλων δικωτικών αρχών.

Ο δρόμος λοιπόν που ακολουθείται προς την εξιχνίαση ενός εγκλήματος και τη απόδοσή του ή μη, στην δικαιοσύνη, είναι μακρύς και απαιτεί τη συνεργασία αρκετών επιστημών όπως η Βιολογία, η Χημεία, η Κοινωνιολογία και η Νομική. Ο τομέας της ενόργανης χημικής ανάλυσης μέσω των διαφόρων τεχνικών που περιλαμβάνει, συμβάλλει στην εξαγωγή των συμπερασμάτων αυτών. Στην παρούσα εργασία αναλύονται οι σύγχρονες τεχνικές που χρησιμοποιούνται προς την ανάλυση ευρημάτων σε έναν τόπο εγκλήματος και είναι ονομαστικά φασματοσκοπικές τεχνικές (φασματοσκοπία υπεριώδους-ορατού, υπερύθρου, Raman, πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού, μάζας) και χρωματογραφικές (υγρή χρωματογραφία, αέρια χρωματογραφία, ιοντανταλλαγής). Αναπόσπαστο κομμάτι μιας εγκληματολογικής έρευνας είναι η ανάλυση γενετικού υλικού (DNA) που απομονώνεται από διάφορα αντικείμενα και επιφάνειες μέσω δειγμάτων όπως αίμα, σάλια, ούρα, κομμάτια ιστού και άλλα. Πολυμορφισμοί του γενετικού υλικού που μελετώνται είναι οι πολυμορφισμοί μήκους θραύσματος εκ περιορισμού (RFLP), αλλά και με τη μορφή γενετικών δεικτών όπως σύντομων διαδοχικών επαναλήψεων (STR) ή μιτοχονδριακού DNA αλλά και ως προς φαινοτυπικά χαρακτηριστικά, προς ταυτοποίηση αγνώστων δειγμάτων γενετικού υλικού. Η συνεχής ανάπτυξη των επιστημών προσθέτει όλο και περισσότερα στοιχεία στις παραπάνω τεχνικές.

### Λέξεις-κλειδιά

Εγκληματολογία, φασματοσκοπικές μέθοδοι, χρωματογραφίες, πολυμορφισμοί, ανάλυση DNA, DNA fingerprinting

## ABSTRACT

Criminology is the science that studies crime with multifaceted approaches, primarily social and psychological, through research. This investigation involves the collection, analysis and interpretation of evidence from the crime scene. It includes disciplines such as forensic chemistry, DNA analysis and forensic pathology. Criminologists try to elucidate the causes and ways of preventing and correcting crimes and their effects on society through forensic investigation. Forensics is a branch of medical science that deals with the application of specialized medical and other related scientific knowledge in assisting the work of the Justice and other prosecuting authorities. Therefore, the road followed towards the investigation of a crime and its performance or not, in justice, is long and requires the cooperation of several sciences such as Biology, Chemistry, Sociology and Law. The field of instrumental chemical analysis, through the various techniques it includes, contributes to the derivation of these conclusions.

This paper analyzes the modern techniques used to analyze findings at a crime scene and are nominally spectroscopic techniques (ultraviolet-visible, infrared, Raman, nuclear magnetic resonance, mass) and chromatographic (liquid chromatography, gas chromatography, ion exchange) techniques. An integral part of a forensic investigation is the analysis of genetic material (DNA) isolated from various objects and surfaces through samples such as blood, saliva, urine, pieces of tissue and others. Polymorphisms of the genetic material studied are restriction fragment length polymorphisms (RFLP), but also in the form of genetic markers such as short tandem repeats (STR) or mitochondrial DNA, but also in terms of phenotypic characteristics, to identify unknown samples of genetic material. The continuous development of the sciences adds more and more elements to the above techniques.

### Keywords

Criminology, spectroscopic methods, chromatographic methods, polymorphisms, DNA analysis, DNA fingerprinting

## Συντομογραφίες/Ακρωνύμια

|         |  |
|---------|--|
| DNA     | δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ                           |
| RNA     | ριβονουκλεϊκό οξύ                                |
| VNTR    | μεταβλητού αριθμού επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες |
| RFLP    | πολυμορφισμοί μήκους θραυσμάτων εκ περιορισμού   |
| STR     | μικρές επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες             |
| SNP     | πολυμορφισμός ενός νουκλεοτιδίου                 |
| PCR     | αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης                  |
| HPLC    | υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης               |
| UHPLC   | υγρή χρωματογραφία υπέρ-υψηλής απόδοσης          |
| GC      | αέρια χρωματογραφία                              |
| MS      | φασματοσκοπία μαζών                              |
| dNTP    | τριφωσφορικό δεοξυριβονουκλεοτίδιο               |
| AmpFLPs | ενισχυμένος πολυμορφισμός μήκους τμήματος        |
| MALDI   | ιονισμός εκρόφησης λέιζερ με υποβοηθούμενη μήτρα |
| TOF     | αναλυτές χρόνου πτήσης                           |
| UV-Vis  | υπεριώδες-ορατό                                  |
| NMR     | πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός                 |
| SEM-EDX | ανάλυση ακτίνων Χ διασποράς ενέργειας            |
| ESI     | ιονισμός ηλεκτροψεκασμού                         |



## Κατάλογος εικόνων

|  |    |
|--|----|
| Εικόνα 1 Αποκλεισμένη σκηνή εγκλήματος.....  | 13 |
| Εικόνα 2 Εμφάνιση κηλίδων αίματος με τη λουμινόλη.....   | 14 |
| Εικόνα 3 Κινητή και στατική φάση.....  | 16 |
| Εικόνα 4 Χρωματογραφία σε στήλη.....   | 17 |
| Εικόνα 5 Πλάκα λεπτής στιβάδας.....  | 18 |
| Εικόνα 6 Πλάκα με κηλίδα δείγματος στον θάλαμο ανάπτυξης.....  | 18 |
| Εικόνα 7 Μέρη αέριου χρωματογράφου.....  | 19 |
| Εικόνα 8 Χρωματογράφημα.....   | 21 |
| Εικόνα 9 Αναλυτική στήλη.....  | 23 |
| Εικόνα 10 Μέρη συστήματος HPLC.....  | 24 |
| Εικόνα 11 Αποκρίσεις οργάνου HPLC.....   | 26 |
| Εικόνα 12 Μεταβολισμός βενζοδιαζεπινών.....  | 27 |
| Εικόνα 13 Χημική δομή των αμφεταμινών.....   | 29 |
| Εικόνα 14 Χρωματογραφήματα αμφεταμινών.....  | 31 |
| Εικόνα 15 Το χρωματογράφημα της βενζίνης.....  | 32 |
| Εικόνα 16 Φάσμα ΗΜ ακτινοβολίας.....   | 34 |
| Εικόνα 18 Ηλεκτρονιοψεκασμός.....  | 37 |
| Εικόνα 19 Αναλυτής χρόνου πτήσης .....   | 38 |
| Εικόνα 20 Τετραπολικοί ανιχνευτές μαζών.....   | 39 |
| Εικόνα 21 Όργανο orbitrap μετασχηματισμού Fourier.....   | 41 |
| Εικόνα 22 Ηλεκτρονιοπολλαπλασιαστές συνεχούς ή διακριτών δυνοδών.....  | 42 |
| Εικόνα 23 Φαρανταϊκό κύπελλο .....   | 42 |
| Εικόνα 24: Φάσματα μάζας πλήρους σάρωσης τεσσάρων SC στο δείγμα εμποτισμένων μαλλιών με MALDI-FT ICR MS .....                  | 46 |
| Εικόνα 25 MALDI MSI διαδοχικών αραιώσεων των διαφορετικών κατηγοριών φαρμάκων που εντοπίζονται σε ένα δακτυλικό αποτύπωμα..... | 48 |
| Εικόνα 26 Οι τρεις κύριες κατηγορίες αναβολικών ανδρογόνων στεροειδών.....   | 49 |
| Εικόνα 27 Σ και π τροχιακά.....  | 52 |
| Εικόνα 28 Μεταπτώσεις σ, π και η τροχιακών και οι χρωμοφόρες ομάδες.....   | 53 |
| Εικόνα 29 Το φαινόμενο του φθορισμού.....  | 54 |
| Εικόνα 30 Φάσματα υπεριώδους μελανιών στυλό.....   | 60 |
| Εικόνα 31 Σκέδαση Raman και Rayleigh .....   | 62 |
| Εικόνα 32 Οι δονήσεις των μορίων.....  | 62 |
| Εικόνα 33 Φάσμα Raman ασπιρίνης.....   | 63 |
| Εικόνα 34 Πρόσθια (forward spatter) και οπίσθια (back spatter) πιτσιλίσματα.....   | 66 |
| Εικόνα 35 Αυτοπεριστροφή (spin) ενός ατόμου.....   | 69 |
| Εικόνα 36 Τμήματα φασματομέτρου NMR.....   | 69 |
| Εικόνα 37 Τα στάδια της μίτωσης.....   | 73 |
| Εικόνα 38 Καρυότυπος φυσιολογικού ατόμου γένους θηλυκού.....   | 74 |
| Εικόνα 39 Γενετικοί δείκτες ανάλυσης DNA.....  | 77 |
| Εικόνα 40 Ταυτοποίηση υπόπτου με ανάλυση STR.....  | 78 |
| Εικόνα 41 Οι μεταβλητές περιοχές του mtDNA που παρουσιάζουν ενδιαφέρον για τους εγκληματολόγους.....                           | 85 |
| Εικόνα 42 Αλληλούχιση μέσω της πλατφόρμας Illumina.....  | 86 |
| Εικόνα 43 Αλληλούχιση Ion Torrent.....   | 87 |
| Εικόνα 44 Βραχίονες p και q του χρωμοσώματος Y και οι ειδικές περιοχές του.....  | 88 |

## Κατάλογος πινάκων

|  |    |
|--|----|
| Πίνακας 1 Σχολές εγκληματολογικής επιστήμης .....  | 12 |
| Πίνακας 2 Παράμετροι HPLC και UHPLC.....   | 28 |
| Πίνακας 3 Οι πιο κοινά χρησιμοποιούμενοι διαλύτες και τα ελάχιστα μήκη κύματος στα οποία απορροφούν..... | 56 |
| Πίνακας 4 Τύποι πηγής λέιζερ.....  | 63 |
| Πίνακας 5 κατεργασία διαφόρων δειγμάτων για ανάλυση DNA.....   | 79 |

## Κεφάλαιο 1

### 1.1 Η επιστήμη της εγκληματολογίας

Εγκληματολογία είναι κλάδος της κοινωνιολογίας, που ασχολείται με τη συστηματική μελέτη του εγκλήματος ως κοινωνικού φαινομένου και των μέτρων που αφορούν την αντιμετώπισή του. Ειδικότερα το επιστημονικό αντικείμενό της αφορά τη μελέτη των χαρακτηριστικών της εγκληματικής πράξης καθώς και των πρωταγωνιστών της (του δράστη/εγκληματία και του θύματός του). Τα προβλήματα που έχει να αντιμετωπίσει είναι τα εξής:

1. Η ανίχνευση του παραβάτη του νόμου/του εγκληματία (αποτελεί έργο του αστυνομικού, του ιατροδικαστή, του χημικού/ερευνητή)
2. Η φύλαξη και η μεταχείρισης του παραβάτη από τη στιγμή που εντοπίζεται και κρίνεται ένοχος (αποτελεί έργο του ποινικολόγου αλλά και κοινωνιολόγων, ψυχολόγων, ψυχιάτρων, κοινωνικών λειτουργών)
3. Η εξήγηση του εγκλήματος και της συμπεριφοράς του εγκληματία (έργο ψυχολόγων, ψυχιάτρων, κοινωνιολόγων, ανθρωπολόγων, βιολόγων)

Παρατηρούμε λοιπόν πως η εγκληματολογία αποτελεί έναν διεπιστημονικό κλάδο και απαιτείται η "συνεργασία" πολλών επιστημών προς την εξιχνίαση ενός εγκλήματος και την απόδοση τους στην δικαιοσύνη προς τιμωρία.

#### Ιστορική αναδρομή

Οι πρωτοπόροι της εγκληματολογίας ταξινομούνται σε δυο σχολές. Την κλασσική που δημιουργήθηκε τον 18<sup>ο</sup> αιώνα από τους Bentham και Beccaria και την θετική που ιδρύθηκε τον 19<sup>ο</sup> αιώνα από τους Lombroso, Garofolo και Ferri. Οι δυο σχολές είχαν αρκετές διαφορές όπως βλέπουμε στον παρακάτω πίνακα (πίνακας 1). Γενικά η κλασσική σχολή υποστήριζε πως κανένα έγκλημα δεν πρέπει να υφίσταται χωρίς νόμο, ενώ η θετική σχολή εισάγει την έννοια του φυσικού εγκλήματος.<sup>1</sup> Ο Ιταλός γιατρός Cesare Lombroso θεωρείται ο πατέρας της εγκληματολογίας καθώς ήταν ο πρώτος άνθρωπος που ανέλυσε ένα έγκλημα με επιστημονική προσέγγιση και επικεντρώθηκε στον εγκληματία και όχι στο έγκλημα. Το συμπέρασμα του ήταν πως η εγκληματική τάση είναι κληρονομική και πως οι εγκληματίες έχουν συγκεκριμένα φυσικά χαρακτηριστικά. Η θεωρία του δεν έγινε αποδεκτή και προκάλεσε αντιδράσεις, έθεσε όμως παράλληλα τα θεμέλια για την ανάπτυξη της σύγχρονης εγκληματολογίας.<sup>2</sup>

Η σύγχρονη εγκληματολογία αναπτύχθηκε στις Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής από το 1900 ως το 2000, ενώ η επίσημη διδασκαλία της ως επιστήμη ξεκίνησε το 1920 από τον κοινωνιολόγο Maurice Parmelee. Η αμερικανική εγκληματολογική σκέψη βασίζεται στην θετική σχολή και ο εγκληματολόγος αναζητά τα αίτια του εγκλήματος σε συστήματα συμπεριφοράς (και όχι σε νομικά).<sup>1</sup>

Πίνακας 1: Σχολές εγκληματολογικής επιστήμης<sup>1</sup>

| Κλασσική σχολή   | Θετική σχολή  |
|--|---|
| Προστασία του κατηγορούμενου από την αυθαιρεσία της εξουσίας | Εφαρμογή επιστημονικών μεθόδων στην μελέτη του εγκλήματος   |
| Ορίζει το έγκλημα με νομικούς όρους                          | Απορρίπτει αυτό τον ορισμό  |
| Μελετά το έγκλημα ως νομική οντότητα                         | Εστιάζει στην πράξη ως ψυχολογική λογική οντότητα   |
| Τονίζει την ελεύθερη βούληση                                 | Υποστηρικτές του ντετερμινισμού*  |
| Θεωρεί πως η τιμωρία έχει αποτρεπτικό αποτέλεσμα             | Προτείνει αντικατάσταση της τιμωρίας με μια επιστημονική αντιμετώπιση των εγκλημάτων προς προστασία της κοινωνίας |

\*ντετερμινισμός<sup>4</sup> = θεωρία που υποστηρίζει πως ότι συμβαίνει στον κόσμο έχει κάποια αιτία που συνοδεύεται πάντα από ένα ίδιο αποτέλεσμα

## 1.2 Ο τόπος του εγκλήματος

Ο τόπος στον οποίο έχει διαδραματιστεί ένα έγκλημα ορίζεται ως ο τόπος του εγκλήματος και ερευνάται από εξειδικευμένο προσωπικό με προσοχή, προς την εύρεση αποδεικτικών στοιχείων. Εκτός από τον πρωτεύον τόπο, υπάρχει και ο δευτερεύον κτλ, χώροι δηλαδή που εντοπίζονται στοιχεία σχετικά με το συμβάν που ερευνάται. Είναι σημαντικό να αναφέρουμε τότε απαιτείται ιατροδικαστική έρευνα, έπειτα από εντολή εισαγγελέα ή αυτεπάγγελτα:<sup>2</sup>

- σε περιπτώσεις βίαιου ή/και ξαφνικού θανάτου εκ πρόθεσης ή εξ αμελείας, σε τροχαία ή εργατικά ατυχήματα, ατυχήματα στο οικιακό περιβάλλον, σε χώρους φαρμακείων, μετά από φαρμακευτικές δηλητηριάσεις ή αυτοκτονίες
- σε θανάτους εντός νοσοκομείων, οίκων ευγηρίας, γηροκομείων
- ατυχήματα που φαίνεται να σχετίζονται με παραβάσεις του νόμου περί ναρκωτικών ουσιών

Ο πρώτος αστυνομικός που καταφθάνει στον τόπο οφείλει να διατηρήσει την ακεραιότητά του, περιορίζοντας την πρόσβαση με ειδική ταινία και διασφαλίζοντας ότι όλα τα αποδεικτικά στοιχεία είναι ασφαλή από καιρικά φαινόμενα. Προτού μετακινηθεί ή αγγίξει οτιδήποτε, ολόκληρη η σκηνή πρέπει να τεκμηριωθεί πλήρως για να διασφαλιστεί ότι υπάρχει μόνιμο αρχείο της σκηνής στην κατάσταση στην οποία βρέθηκε. Αυτή η τεκμηρίωση μπορεί να περιλαμβάνει γραπτές σημειώσεις, φωτογραφίες, βίντεο ή σκίτσα. Θα πρέπει να ληφθούν εκτενείς φωτογραφίες όλων των περιοχών του τόπου του εγκλήματος και κάθε στοιχείου που συλλέγεται. Όταν ολοκληρωθεί η τεκμηρίωση, οι εγκληματολόγοι μπορούν να προχωρήσουν στη συλλογή φυσικών αποδεικτικών στοιχείων από τη σκηνή. Όλα τα φυσικά αποδεικτικά στοιχεία θα πρέπει να φέρουν ετικέτα με οποιεσδήποτε πληροφορίες ταυτοποίησης σχετικά με το αντικείμενο, καθώς και την τοποθεσία στην οποία βρέθηκε, το έγκλημα με το οποίο σχετίζεται και την ημερομηνία και την υπογραφή όλων των προσώπων που εμπλέκονται στην ανάκτησή του.<sup>116</sup> Οτιδήποτε υπάρχει σε έναν τόπο εγκλήματος αποτελεί αποδεικτικό στοιχείο της έρευνας.<sup>6</sup> Τα ίχνη αποδεικτικών στοιχείων είναι μικρές ποσότητες ανακτήσιμου υλικού, υπολειμμάτων, αποτυπωμάτων ή σημάτων που χρησιμοποιούνται στις ιατροδικαστικές αυτές έρευνες. Τα αποδεικτικά στοιχεία πρέπει να ταυτοποιούνται, να συλλέγονται, να συσκευάζονται, να ασφαρίζονται και

να διατηρούνται σωστά. Η ανάλυση αυτών των μορφών αποδεικτικών στοιχείων ποικίλλει ανάλογα με τον τύπο του ίχνους.<sup>6</sup>



Εικόνα 1: αποκλεισμένη σκηνή εγκλήματος<sup>7</sup>

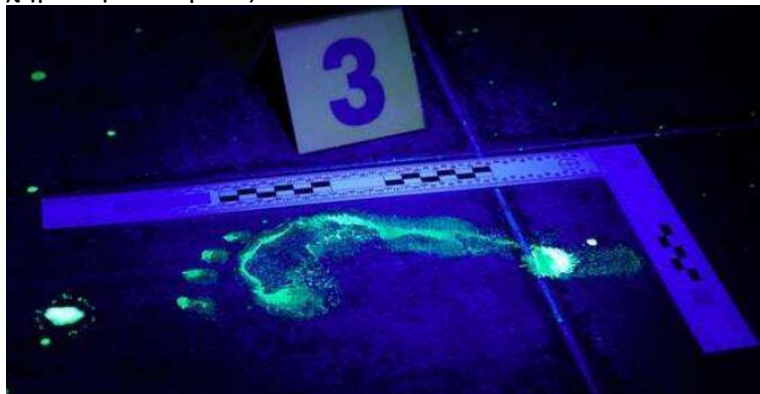
Τα συχνότερα δείγματα που μπορεί να ληφθούν από έναν τόπο εγκλήματος και να αποτελέσουν αποδεικτικά στοιχεία χωρίζονται στις παρακάτω τέσσερις κατηγορίες και είναι:<sup>5</sup>

1. χημικά δείγματα (ναρκωτικά, αλκοόλ, άλλα φάρμακα, δηλητήρια, δείγματα εμπρησμού, εκρηκτικά)
2. βιολογικά δείγματα (σωματικά υγρά όπως αίμα, σπέρμα, κολπικά υγρά, σάλια, ούρα ή/και σωματικά υλικά όπως τρίχες, δόντια, νύχια, οστά, κομμάτια δέρματος)
3. φυσικά δείγματα (αποτυπώματα, ίχνη, χειρόγραφα έγγραφα, βαλλιστικά δείγματα, γυαλιά, ίνες, κομμάτια ρούχων και άλλων υφασμάτων, παπούτσια)

Επίσης πρόσφατες έρευνες εστιάζουν ακόμα και στην συλλογή δειγμάτων από κραγιόν ή από άλλα καλλυντικά (κυρίως foundation) τα οποία αφήνουν ίχνη και μπορεί να συνδέσουν θύματα ή δράστες σε ένα έγκλημα.<sup>8</sup>

Η συλλογή των αποδεικτικών στοιχείων πρέπει να γίνεται υπό αυστηρά πρωτόκολλα προς αποφυγή της επιμόλυνσής τους ή της καταστροφής τους. Η συσκευασία και η αποθήκευση των φυσικών αποδεικτικών στοιχείων εξαρτάται από τη φύση των αποδεικτικών στοιχείων. Συνήθως το αίμα και άλλα βιολογικά υγρά όπως ούρα, πτύελα και εμετός συλλέγονται με βαμβακοφόρο στείλεό ή αποστειρωμένες γάζες, ενώ όλα αποθηκεύονται σε ειδικά αποστειρωμένα δοχεία με την απαραίτητη ετικέτα προς μεταφορά στο εργαστήριο. Αν το αίμα είναι αποξηραμένο, ξύνεται προσεκτικά με αποστειρωμένο εργαλείο και τα ξέσματα αποθηκεύονται σε αποστειρωμένο δοχείο. Αν υπάρχει μεγάλη ποσότητα αίματος μπορεί να συλλεχθεί με πιπέτες ή σύριγγες. Στις περιπτώσεις που έχει γίνει προσπάθεια καθαρισμού/ απόκρυψης του αίματος από τον εγκληματία απαιτείται ειδική διαδικασία. Η λουμινόλη είναι μια ένωση χημειοφωταύγειας και αποτελεί το κατάλληλο αντιδραστήριο για την ανίχνευση αόρατων ενδείξεων και δεν λειτουργεί ανασταλτικά στην PCR που ακολουθεί για την ανάλυση DNA. Κίτρινοι κρύσταλλοι λουμινόλης αναμιγνύονται σε διάλυμα με υπεροξείδιο του υδρογόνου και μια βάση. Σε ένα σκοτεινό δωμάτιο, το αντιδραστήριο εφαρμόζεται με ψεκασμό σε ένα λεκέ. Ένα αποτέλεσμα θεωρείται

θετικό όταν παρατηρείται αμέσως φωταύγεια. Αυτό συμβαίνει λόγω ότι ο σίδηρος της αίμης της αιμοσφαιρίνης του αίματος λειτουργεί ως καταλύτης της αντίδρασης χημειοφωταύγειας.



Εικόνα 2: εμφάνιση κηλίδων αίματος με τη λουμινόλη, <https://greek.vacutaineradditives.com/news/luminol-and-blood-85765.html>

Για να εξασφαλιστεί η αξιοπιστία του αποτελέσματος, θα είναι παρόντες δύο παρατηρητές οι οποίοι θα ελέγξουν αν υπάρχει ή όχι αντίδραση, άμεσα καθώς διαρκεί μόλις λίγα δευτερόλεπτα. Μετά τη δοκιμή, ο λεκές αφήνεται να στεγνώσει σε θερμοκρασία δωματίου. Αυτή η διαδικασία (δοκιμή πλύσης-στεγνώματος-λουμινόλης) θα επαναληφθεί μέχρι να ληφθεί αρνητικό αποτέλεσμα της δοκιμής λουμινόλης.<sup>114</sup> Οι ιστοί συλλέγονται με μικρή αποστειρωμένη λαβίδα, αποθηκεύονται σε αποστειρωμένο γυάλινο δοχείο ή δοκιμαστικό σωλήνα και οι τρίχες με μικρή λαβίδα, αποθηκεύονται σε αποστειρωμένο δοχείο, είτε σε διπλωμένο χαρτί. Σε όπλα, σφαίρες ή άλλα αντικείμενα ελέγχεται η ύπαρξη δακτυλικών αποτυπωμάτων και στην συνέχεια αποθηκεύονται σε κουτιά ή μικρότερες συσκευασίες. Συλλέγεται κάθε στοιχείο και αντικείμενο στον τόπο του εγκλήματος καθώς αποτελεί πειστήριο και ενδέχεται να φέρει αποτυπώματα και γενετικό υλικό του δράστη.<sup>8</sup>

Τα δακτυλικά αποτυπώματα είναι μοναδικά για κάθε άνθρωπο και μπορούν να "προδώσουν" τον δράστη. Σχηματίζονται από ιδρώτα εξερχόμενο από τους πόρους των θηλοειδών γραμμών κατά την επαφή με μια επιφάνεια. Η εικόνα που σχηματίζεται στην επιφάνεια επηρεάζεται από το σχήμα των πόρων των θηλοειδών γραμμών και από την ποσότητα του ιδρώτα. Η ποιότητα των αποτυπωμάτων εξαρτάται από τη διάρκεια επαφής με την επιφάνεια, το είδος της επιφάνειας που ακούμπησε ο δράστης και την ψυχολογική κατάσταση του. Τα ορατά αποτυπώματα απλώς φωτογραφίζονται και συμπεριλαμβάνονται στο αρχείο της υπόθεσης. Συχνά στον τόπο του εγκλήματος όμως εντοπίζονται τα λανθάνοντα αποτυπώματα, τα οποία δεν είναι εύκολα ορατά. Επιλέγεται λοιπόν κάποια τεχνική για την εμφάνιση και την συλλογή τους ανάλογα με την επιφάνεια εντοπισμού τους. Αν εντοπίζονται σε μη απορροφητική επιφάνεια, απλώνεται μια σκόνη στο σημείο που υποψιαζόμαστε ότι υπάρχουν αποτυπώματα και απλώνεται με ένα βουρτσάκι, μέχρι να είναι ευδιάκριτα. Για τις πορώδεις επιφάνειες που απορροφούν τα υγρά, χρησιμοποιούν χημικές δοκιμασίες όπως η νινυδρίνη, ο νιτρικός άργυρος ή ο κυανοακρυλικός εστέρας. Στη συνέχεια όλα τα αποτυπώματα φωτογραφίζονται και μεταφέρονται με ασφάλεια στο εργαστήριο.<sup>115</sup>

### 1.2.1 Τα στάδια της ανάλυσης

Σε όλα τα πρωτόκολλα μιας ενόργανης ανάλυσης εντοπίζονται 5 βασικά βήματα:

1. δειγματοληψία (τοποθεσίες λήψεως δειγμάτων αλλά και η διαδικασία λήψης τους)
2. μεταφορά και αποθήκευση (υλικά, χρόνοι, θερμοκρασίες και αντιδραστήρια που ενδεχομένως απαιτούνται)
3. προετοιμασία δείγματος (μέθοδοι εξαγωγής και εισαγωγή στο αναλυτικό όργανο)
4. ενόργανη ανάλυση
5. λήψη και ανάλυση δεδομένων

Στην περίπτωση μιας εγκληματολογικής έρευνας, ακολουθείται συνήθως και ένα επιπλέον βήμα, αυτό της σύνταξης μιας σαφούς αναφοράς που θα παρουσιαστεί στο δικαστήριο και στους ενόρκους.

Για την επιλογή της καταλληλότερης τεχνικής, παράγοντες που εξετάζονται περιλαμβάνουν την ποσότητα του διαθέσιμου δείγματος, τις διαθέσιμες τεχνικές, την ιατροδικαστική ερώτηση που τίθεται και τη σοβαρότητα του (δυννητικού) αδικήματος, το οποίο σχετίζεται και με τον διαθέσιμο προϋπολογισμό και το χρονοδιάγραμμα. Η ποιοτική ανάλυση θα δώσει πληροφορίες για τα χαρακτηριστικά του δείγματος που μπορεί να χρησιμοποιηθούν για σύγκριση μεταξύ αποδεικτικών στοιχείων που ανακτήθηκαν. Η ποσοτική ανάλυση θα παρέχει πληροφορίες σχετικά με την ποσότητα μιας ή περισσότερων ενώσεων που υπάρχουν στο δείγμα, οι οποίες μπορεί να είναι σημαντικές για τον προσδιορισμό του τι έχει συμβεί (π.χ αν έγινε χρήση ναρκωτικών εις γνώση του ατόμου ή εν αγνοία του). Τέλος υπάρχει και η δομική ανάλυση, η οποία παρέχει πιο λεπτομερείς πληροφορίες για το τι είναι ένα δείγμα και ποια είναι η δομή των μορίων του, τα οποία μπορούν να βοηθήσουν στην οριστική ταυτοποίηση του δείγματος σε περιπτώσεις όπου το αδίκημα σχετίζεται με μια συγκεκριμένη ένωση ή ομάδα ενώσεων (π.χ. εκρηκτικά).<sup>9</sup> Η προετοιμασία του δείγματος γίνεται κυρίως για την απομάκρυνση άλλων συστατικών του δείγματος και την απομόνωση της αναλυόμενης ουσίας και την αύξηση της συγκέντρωσης της ουσίας που υποβάλλεται για ενόργανη ανάλυση, έτσι ώστε να μπορεί να ανιχνευθεί η αναλυόμενη ουσία. Επίσης για να διασφαλιστεί ότι το κλάσμα ενός δείγματος που αναλύεται είναι αντιπροσωπευτικό ολόκληρου του δείγματος. Στην εγκληματολογική επιστήμη, δεν είναι επιθυμητό να καταστραφεί ολόκληρο το δείγμα κατά τη διάρκεια της ανάλυσης καθώς αν το δείγμα έχει καταστραφεί, έχουν καταστραφεί και τυχόν άλλα πιθανά στοιχεία. Δεν είναι επιθυμητή λοιπόν η καταστροφή των αποδεικτικών στοιχείων.<sup>10</sup>

Ο όρος αλυσίδα επιμέλειας (CoC) αναφέρεται στην χρονολογική τεκμηρίωση που καταγράφει την έντυπη διαδρομή, τη φύλαξη, τον έλεγχο, τη μεταφορά, την ανάλυση και τη διάθεση φυσικών ή ηλεκτρονικών αποδεικτικών στοιχείων. Στο πλαίσιο της εγκληματολογικής επιστήμης, αυτό θα μπορούσε να περιλαμβάνει μια σειρά αποδεικτικών στοιχείων, συμπεριλαμβανομένων ναρκωτικών, βιολογικών δειγμάτων και διαφόρων τύπων περιβαλλοντικών δειγμάτων που σχετίζονται με ένα έγκλημα ή έναν τόπο εγκλήματος. Η σωστή καταγραφή του CoC είναι ζωτικής σημασίας για τη διατήρηση της ακεραιότητας των αποδεικτικών στοιχείων. Επιπλέον, θα πρέπει να αποδεικνύει ότι ελαχιστοποιείται η πιθανότητα αλλοίωσης ή μόλυνσης των αποδεικτικών στοιχείων. Στην πράξη, ένα συγκεκριμένο άτομο πρέπει να είναι



υπεύθυνο για τα αποδεικτικά στοιχεία ανά πάσα στιγμή και κάθε μετακίνηση των αποδεικτικών στοιχείων (ή τμήματός τους) να τεκμηριώνεται.<sup>11</sup>

## Κεφάλαιο

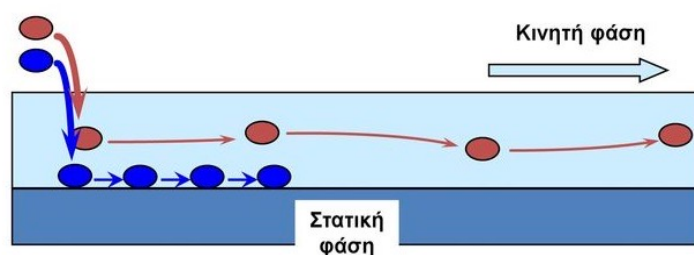
2

### Χρωματογραφικές μέθοδοι

Η τεχνική της χρωματογραφίας ανακαλύφθηκε το 1898 και παρουσιάστηκε στις αρχές του 1900 από τον Mikhail Tswett, ο οποίος διαχώρισε με επιτυχία τις φυτικές χρωστικές ουσίες της Χλωροφύλλης, περνώντας εκχυλίσματα διαλύτη των φύλλων μέσω μιας γυάλινης στήλης γεμάτη με λεπτά διαιρεμένα σωματίδια διαφόρων ροφητών συμπεριλαμβανομένου του ανθρακικού ασβεστίου, του υδροξειδίου του αργιλίου, και της ζάχαρη και οστά κάρβουνο. Οι χρωματιστές ζώνες που προέκυψαν οδήγησαν στην ονομασία της τεχνικής της χρωματογραφίας. Επίσης, υπέθεσε ότι από τη σωστή επιλογή των διαλυτών και των προσροφητικών, θα μπορούσε να αναπτύξει μια γενική μέθοδο διαχωρισμού διαφόρων φυτικών χρωστικών.<sup>12</sup>

#### 2.1 Αρχή μεθόδου

Η χρωματογραφία είναι μέθοδος διαχωρισμού ουσιών με παρόμοιες χημικές ιδιότητες, σε ένα σύνθετο μίγμα ουσιών. Βασίζεται στο ότι οι ουσίες αυτές κατανέμονται διαφορετικά μεταξύ των δυο φάσεων, της στατικής (ακίνητης) και της κινητής (που διαπερνά την στατική). Αυτή η διαφορετική κατανομή οφείλεται στην κατακράτηση της ουσίας από την στατική φάση. Τα συστατικά τα οποία κατακρατούνται ισχυρότερα από τη στατική φάση κινούνται αργά κατά τη ροή της κινητής φάσης. Αντίθετα, τα συστατικά τα οποία κατακρατούνται ασθενέστερα από τη στατική φάση, κινούνται ταχύτερα. Η κινητή φάση μπορεί να είναι ένα υγρό (υγρή χρωματογραφία) ή ένα αέριο (αέρια χρωματογραφία) ή ένα υπερκρίσιμο ρευστό (υπερκρίσιμη χρωματογραφία υγρού).



Εικόνα 3: κινητή και στατική φάση, Χρωματογραφία, Ελευθερίου Α. <https://slideplayer.gr/slide/12043896/>

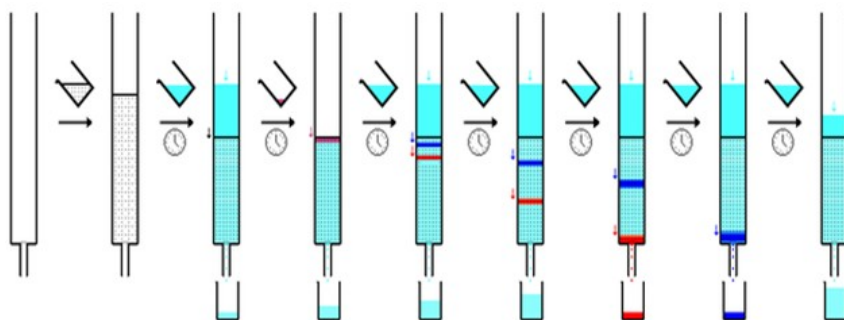
Ο διαχωρισμός μεταξύ των δυο φάσεων βασίζεται στην πτητικότητα, την πολικότητα, τα ηλεκτρικά φορτία και το μέγεθος των μορίων. Ως αποτέλεσμα, δημιουργούνται διαφορετικές ζώνες (μπάντες) για καθεμία από τις ουσίες.<sup>12</sup>

- Ανάλογα με τον μηχανισμό διαχωρισμού, η χρωματογραφία διακρίνεται σε χρωματογραφία προσρόφησης, κατανομής, ιονανταλλαγής, μοριακού αποκλεισμού και χημικής συγγένειας.
- Ανάλογα του μέσου στο οποίο τοποθετείται η στατική φάση η χρωματογραφία διακρίνεται σε επίπεδη χρωματογραφία (χάρτου ή λεπτής



στιβάδας) και σε χρωματογραφία στήλης (πληρωμένων στηλών ή ανοιχτών τριχοειδικών στηλών).

- Ανάλογα με τον μηχανισμό κατανομής κατηγοριοποιείται σε κανονικής φάσης (η στατική φάση είναι πολικότερη της κινητής) και σε αντίστροφης φάσης (κινητή φάση πολικότερη της στατικής).
- Τέλος ανάλογα με τον τύπο της κινητής φάσης έχουμε την υγρή (LC) και την αέρια χρωματογραφία (GC).



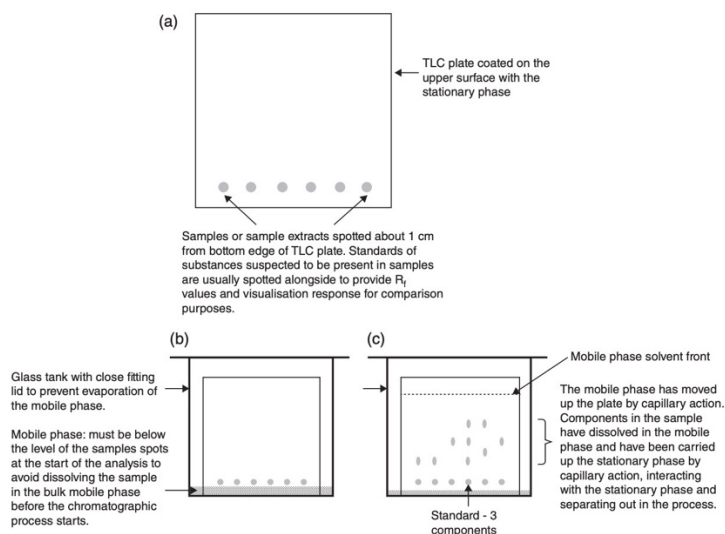
Εικόνα 4: Χρωματογραφία σε στήλη., <https://slideplayer.gr/slide/2698026>

Στην εγκληματολογική έρευνα εφαρμογή βρίσκουν κυρίως η υγρή χρωματογραφία υψηλής και υπερυψηλής απόδοσης, η αέρια χρωματογραφία και η χρωματογραφία λεπτής στιβάδας. Πολύ συχνά στην έξοδο της στήλης τοποθετείται ένας ανιχνευτής για ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό των συστατικών. Σε αυτούς τους τύπους χρωματογραφίας που θα συζητήσουμε παρακάτω, η κινητή φάση κινείται σε μια κατεύθυνση μέσω του χρωματογραφικού συστήματος και η στατική φάση είτε επικαλύπτεται σε επίπεδη επιφάνεια (επίπεδη χρωματογραφία) ή συγκρατημένη σε στήλη (χρωματογραφία στήλης). Ο συνδυασμός της LC ή της GC με την φασματοσκοπία μαζών ή φασματοσκοπία υπεριώδους- ορατού είναι οι καλύτεροι ίσως συνδυασμοί για διαχωρισμό και ευαίσθητη ανίχνευση.<sup>12</sup>

#### ▪ Επίπεδη χρωματογραφία

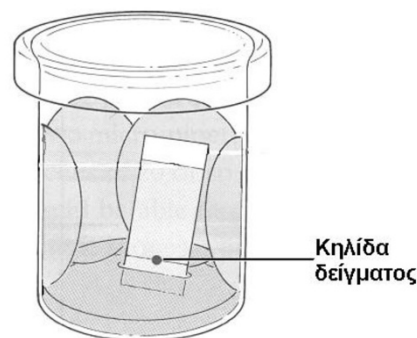
Στην επίπεδη χρωματογραφία η στατική φάση είναι παρούσα ως ένα λεπτό επίπεδο στρώμα το οποίο αυτοστηρίζεται ή στηρίζεται πάνω σε μια άλλη επιφάνεια υάλου, πλαστικού ή μετάλλου. Το επίπεδο αυτό μπορεί να είναι ένα χαρτί (χρωματογραφία χάρτου) ή ένα στρώμα στερεών σωματιδίων απλωμένο σε ένα στήριγμα, π.χ. ένα γυάλινο πιάτο (χρωματογραφία λεπτής στιβάδας, TLC). Η κινητή φάση διαπερνά την στατική με τριχοειδή φαινόμενα. Η TLC είναι η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη μορφή επίπεδης χρωματογραφίας στην εγκληματολογική επιστήμη και η πιο κοινή μορφή για το επίπεδο είναι ένα τετράγωνο ή ένα ορθογώνιο από λεπτό φύλλο αλουμινίου ή σπανιότερα από γυαλί, με τη στατική φάση επικαλυμμένη σε μία επιφάνεια. Έχει καλύτερη διαχωριστική ικανότητα και είναι πιο ευαίσθητη. Το μίγμα του δείγματος, σε διάλυμα, εφαρμόζεται στη στατική φάση κοντά στη μια άκρη της πλάκας ως κηλίδα ή ταινία (Εικόνα 3α) και στη συνέχεια η πλάκα στέκεται κατακόρυφα με το κάτω άκρο σε ένα ρηχό στρώμα της κινητής φάσης (Εικόνα 3β). Η κινητή φάση κινείται προς τα

πάνω και διαμέσου της στατικής φάσης με τριχοειδή δράση μεταφέροντας με αυτό τα συστατικά του δείγματος που είναι διαλυτά στην κινητή φάση (Εικόνα 3γ).<sup>13</sup>



Εικόνα 5: πλάκα λεπτής στιβάδας <https://eclass.uowm.gr/modules/document/file.php/CHEMENG201/Χρωματογραφία.pdf>

Για την παραγωγή μιας πλάκας λεπτής στιβάδας απλώνουμε ένα πηκτό υδατικό εναιώρημα λεπτοκονιοποιημένου στερεού πάνω σε μια καθαρή επιφάνεια, γυάλινη, πλαστική ή πάνω σε ένα πλακίδιο. Χρησιμοποιείται συνήθως και κάποια συνδετική ουσία στο εναιώρημα. Στην συνέχεια η πλάκα αφήνεται μέχρι το στρώμα να προσκολληθεί στην επιφάνεια και ενδεχομένως να χρειαστεί θέρμανση σε φούρνο. Κατά την τοποθέτηση του δείγματος στην πλάκα χρησιμοποιούνται σταγόνες του διαλύματος 0,01% ως 0,1% σε απόσταση 1 ως 2 cm από το άκρο της πλάκας. Η ανάπτυξη της πλάκας είναι η διαδικασία κατά την οποία το δείγμα μεταφέρεται με μια κινητή φάση μέσα από τη στατική φάση (αντίστοιχο της έκλουσης στην υγρή χρωματογραφία).



Εικόνα 6: πλάκα με κηλίδα δείγματος στον θάλαμο ανάπτυξης, <https://eclass.uowm.gr/modules/document/file.php/CHEMENG201/Χρωματογραφία.pdf>

Το ένα άκρο της πλάκας βυθίζεται στον διαλύτη ανάπτυξης και αφού διασχίσει το μισό ή λίγο παραπάνω αφαιρείται από το δοχείο ανάπτυξης και ξηραίνεται. Στη συνέχεια προσδιορίζεται η θέση των συστατικών του δείγματος. Δυο μέθοδοι προσδιορισμού της θέσης των συστατικών του δείγματος: ψεκασμός με διάλυμα θεικού οξέος ή τοποθέτηση της πλάκας σε θάλαμο που περιέχει κρυστάλλους ιωδίου. Και οι δυο μέθοδοι δίνουν σκουρόχρωμα προϊόντα. Μια άλλη λιγότερο χρησιμοποιούμενη μέθοδος βασίζεται στην ενσωμάτωση μιας φθορίζουσας χρωστικής στη στατική φάση και εξετάζεται με υπεριώδες φως. Τα συστατικά του δείγματος αποσβένουν στα σημεία της πλάκας που βρίσκονται και έτσι εντοπίζονται.<sup>13</sup>

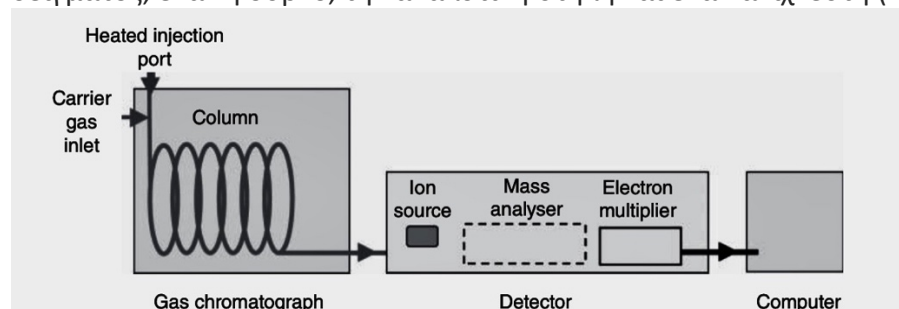
Όπου χρησιμοποιείται υγρή στατική φάση, σε αυτή γίνεται και ο διαχωρισμός των

συστατικών του δείγματος. Στην περίπτωση ενεργών, στερεών στατικών φάσεων, λαμβάνουν χώρα αλληλεπιδράσεις προσρόφησης/εκρρόφησης μεταξύ των συστατικών του δείγματος και ενεργών θέσεων στη στατική φάση. Η διαδικασία ανίχνευσης είναι διαφορετική από την GC και την HPLC επειδή ο ανιχνευτής δεν τοποθετείται στο τέλος της πλάκας καθώς με αυτό τον τρόπο δεν προκύπτει χρωματογράφημα. Αντίθετα, η ανίχνευση πραγματοποιείται μετά τη διακοπή της χρωματογραφικής διαδικασίας (αφαιρείται η πλάκα TLC από την επαφή με την κινητή φάση) και στη συνέχεια ανιχνεύεται η θέση των ενώσεων στην πλάκα επί τόπου. Αυτό μπορεί να γίνει μέσω οπτικής παρατήρησης για έγχρωμες ενώσεις με απόκριση σε μια πηγή φωτός (π.χ. φθορισμός) ή με αντίδραση με ένα ή περισσότερα αντιδραστήρια που ψεκάζονται στην πλάκα για την παραγωγή ενός έγχρωμου ή φθορίζοντος προϊόντος επί τόπου.<sup>14</sup>

Μια τεχνική υγρής χρωματογραφίας πολύτιμη για την ανάλυση παράνομων ναρκωτικών είναι η χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC). Το TLC χρησιμοποιείται συνήθως για την αναγνώριση διαφορετικών συστατικών των παράνομων ναρκωτικών. Ωστόσο, για την παροχή πλήρους και επαρκούς προφίλ φαρμάκου, η TLC συνήθως συνδυάζεται με άλλες τεχνικές. Τα δείγματα ηρωίνης αναλύθηκαν χρησιμοποιώντας διαφορετικές τεχνικές, συμπεριλαμβανομένης της TLC για τον εντοπισμό διαφόρων συστατικών των δειγμάτων. Χρησιμοποιώντας TLC, εντοπίστηκε καφεΐνη σε δείγματα ηρωίνης, υποδηλώνοντας ότι τα δείγματα ηρωίνης είναι πιθανότατα από τη Νοτιοδυτική Ασία.<sup>14</sup>

#### ▪ Αέρια χρωματογραφία

Υπάρχουν δυο είδη αέριας χρωματογραφίας: η χρωματογραφία αέριου-στερεού (GSC) και η χρωματογραφία αέριου-υγρού (GLC). Ωστόσο αυτή που χρησιμοποιείται σχεδόν σε όλες τις περιπτώσεις δειγμάτων είναι η αέριο-υγρού που αναφέρεται ως αεριοχρωματογραφία (GC). Η γενική αρχή της αέριας χρωματογραφίας είναι η κατανομή του αναλύτη μεταξύ μιας υγρής στατικής φάσης και μιας αέριας κινητής φάσης. Η υγρή φάση είναι ακινητοποιημένη σε ένα αδρανές αέριο ή στα τοιχώματα ενός τριχοειδούς σωλήνα. Η κινητή φάση αποτελείται από κάποιο χημικά αδρανές αέριο που ονομάζεται φέρον (carrier gas). Συνήθως χρησιμοποιείται ήλιο αλλά σε κάποιες περιπτώσεις αντικαθίσταται από αργό, υδρογόνο ή άζωτο. Τα αέρια συνήθως αγοράζονται σε δεξαμενές υπό πίεση με σχετικούς ρυθμιστές, δείκτες και μετρητές ροής για τον έλεγχο της ροής αέριο στο σύστημα. Εάν το υδρογόνο χρησιμοποιείται ως φέρον αέριο, πολλά εργαστήρια προτιμούν να το χρησιμοποιούν μια γεννήτρια υδρογόνου. Ένας αέριος χρωματογράφος αποτελείται από ένα σύστημα έγχυσης δείγματος, έναν φούρνο, την αναλυτική στήλη και έναν ανιχνευτή (Εικόνα 7).



Εικόνα 7: Μέρη αέριου χρωματογράφου<sup>15</sup>

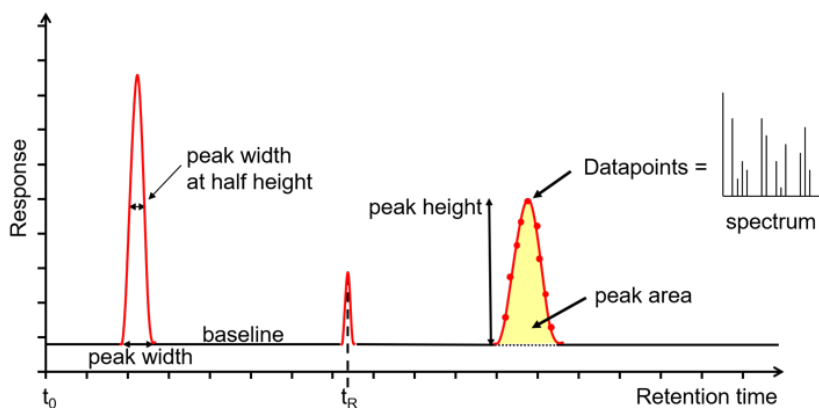
Το δείγμα εγχέεται και εξατμίζεται στη θερμαινόμενη θυρίδα έγχυσης και μεταφέρεται στη στήλη στην κινητή φάση. Οι στήλες είναι δυο ειδών: ανοιχτού σωλήνα και πληρωμένες στήλες. Οι πρώτες είναι αρκετά αποδοτικότερες και συχνότερα χρησιμοποιούνται οι στήλες ανοιχτού σωλήνα πυρίτιδας. Οι πληρωμένες στήλες κατασκευάζονται από γυάλινους ή μεταλλικούς (ανοξειδωτου χάλυβα, αλουμίνιου, χαλκού) σωλήνες. Πληρούνται με λεπτό πληρωτικό υλικό το οποίο καλύπτεται με λεπτό στρώμα στατικής φάσης.

Κατά την προετοιμασία του δείγματος, αυτά αραιώνονται ή διαλύονται και στη συνέχεια τοποθετούνται στη θύρα εισόδου. Εκεί εξατμίζεται και μετατρέπεται σε αέριο. Το δείγμα στη συνέχεια εισάγεται από έναν αυτόματο δειγματολήπτη και γίνεται έγχυση του στη στήλη που περιέχει τη στατική φάση, με τη βοήθεια του αερίου.<sup>15</sup>

Το σύστημα έγχυσης δείγματος θα πρέπει να επιτρέπει την ταχεία έγχυση αερίων ή υγρών στο ρεύμα του φέροντος αερίου. Ο πιο κοινός εγχυτήρας είναι ο εγχυτήρας εξάτμισης. Τα δείγματα εγχέονται στο σύστημα GC χρησιμοποιώντας ένα βαθμονομημένο μικροσύριγγα. Η βελόνα της σύριγγας ωθείται μέσα από ένα διάφραγμα από καουτσούκ ή σιλικόνη για να επιτραπεί το δείγμα που θα εγχυθεί απευθείας στον θάλαμο εξάτμισης ο οποίος τυπικά περιέχει έναν γυάλινο σωλήνα χαλαζία που αναφέρεται ως «επένδυση». Η βαλβίδα ρυθμίζεται αρχικά στη θέση δειγματοληψίας και το αέριο αφήνεται να ρέει μέσω βρόχου γνωστού όγκου. Εφόσον η βαλβίδα γυρίσει στη θέση ανάλυσης, το αέριο στον βρόχο μεταφέρεται στη στήλη GC από το φέρον αέριο.

Οι ρυθμοί ροής για μια τριχοειδή στήλη θα πρέπει να προσδιορίζονται πειραματικά αλλά οι βέλτιστες τιμές είναι συνήθως περίπου 1 ml/min για στήλη εσωτερικής διαμέτρου 0,25 μm. Οι πιέσεις εισόδου είναι τυπικά στην περιοχή από 0,68–3,45 bar και υποθέτοντας ότι παραμένουν σταθερά, θα εξασφαλίζουν σταθερό ρυθμό ροής εντός του συστήματος. Η αναλυτική στήλη διατηρείται στον κλίβανο στήλης ο οποίος θερμαίνεται κατά τη διάρκεια της ανάλυσης για να εκλουσθούν τα λιγότερο πτητικά συστατικά.<sup>15</sup>

Τέλος οι ενώσεις που διαχωρίζονται εξέρχονται της στήλης η μία μετά την άλλη και εισέρχονται σε έναν ανιχνευτή. Δημιουργείται ένα χρωματογράφημα με κορυφές, κάθε μια από τις οποίες είναι μια ένωση που διαχωρίστηκε και το ύψος της κορυφής είναι ανάλογο της ποσότητας της ουσίας στο δείγμα μας (εικόνα 8). Ο άξονας x είναι ο χρόνος κατακράτησης (λαμβάνεται από τη στιγμή που το δείγμα εγχύθηκε στο GC έως το τέλος της ανάλυσης). Ο άξονας y είναι η μετρούμενη απόκριση της κορυφής της αναλυόμενης ουσίας στον ανιχνευτή. Η γραμμή βάσης δείχνει το σήμα από τον ανιχνευτή όταν δεν εκλύεται αναλύτης από τη στήλη ή όταν η ποσότητα του αναλύτη που εκλύεται είναι μικρότερη από το όριο ανίχνευσης. Όταν μια ένωση εκλύεται από τη στήλη και ανιχνεύεται από τον ανιχνευτή, το χρωματογράφημα δείχνει μια άνοδο από την βασική τιμή σε μια μέγιστη τιμή (μέγιστο κορυφής) που αντιπροσωπεύει το σημείο στο οποίο ο μέγιστος αριθμός μορίων του η ένωση εκλύεται και ανιχνεύεται. Μετά από αυτό το σημείο, ο αριθμός των μορίων που εκλύονται μειώνεται και ως εκ τούτου το σήμα του ανιχνευτή μειώνεται και (εκτός εάν εκλύεται άλλη ένωση) αυτό θα μειωθεί ξανά στην βασική τιμή. Έτσι μπορούμε να επιβεβαιώσουμε την παρουσία ή μη κάποιων ουσιών σε ένα δείγμα.<sup>16</sup>



Εικόνα 8: χρωματογράφημα <https://www.technologynetworks.com/analysis/articles/gas-chromatography-how-a-gas-chromatography-machine-works-how-to-read-a-chromatograph-and-qcxc-335168>

Τα αέρια δείγματα είναι ιδανικά για ανάλυση GC λόγω της μορφής της αναλυόμενης ουσίας. Σε μέτριες έως υψηλές συγκεντρώσεις, τα δείγματα αερίου μπορούν να εγχυθούν απευθείας στη στήλη περνώντας τα δείγματα μέσω αεροστεγής βαλβίδα (γνωστή και ως βαλβίδα δειγματοληψίας αερίου). Τα περισσότερα δείγματα θα έχουν υποβληθεί σε κάποιο είδος διαδικασίας εκχύλισης πριν από την GC ανάλυση, τέτοια ώστε το δείγμα που εγχέεται να αποτελείται από χαμηλή συγκέντρωση των ενώσεων ενδιαφέροντος διαλυμένη σε διαλύτη. Ωστόσο, δείγματα όπως τα επιταχυντικά εμπρησμού μπορούν να αναλυθούν απευθείας επειδή είναι ένα μείγμα συνδιαλυτών οργανικών ενώσεων. Ο συνδυασμός της GC ή της LC με την φασματοσκοπία μαζών είναι ο καλύτερος ίσως συνδυασμός για διαχωρισμό και ανίχνευση.<sup>17</sup>

Στην έξοδο της στήλης τοποθετείται ένας ανιχνευτής μαζών. Στην περίπτωση της αέριας χρωματογραφίας όμως το διάλυμα που λαμβάνεται από την στήλη περιλαμβάνει τον αναλύτη αραιωμένο σε έναν διαλύτη. Πρέπει να απομακρυνθεί ο διαλύτης και ο αναλύτης να μετατραπεί σε αέριο. Αυτό επιτυγχάνεται αρχικά με εξάτμιση. Γενικά για να αναλυθούν δείγματα με GC, πρέπει αρχικά το δείγμα να μεταφερθεί στη φάση ατμού προκειμένου να γίνει χρωματογραφικός διαχωρισμός.<sup>17</sup>

Αυτό απαιτεί οι αναλυόμενες ουσίες του δείγματος να είναι επαρκώς πτητικές εντός του εύρους θερμοκρασίας του οργάνου (έως 350 °C ανάλογα με τη στατική φάση της στήλης). Η πτητικότητα μιας ένωσης υπαγορεύεται από την τάση ατμών της και το σημείο βρασμού της. Οι πολύ πτητικές ενώσεις έχουν υψηλές πιέσεις ατμών και χαμηλά σημεία βρασμού που τα καθιστούν ιδανικά για διαχωρισμό με χρήση GC. Μια ένωση με μοριακή μάζα μεγαλύτερη από 600 g/mol θα έχει επίπεδο μεταβλητότητας κάτω από αυτό που θεωρείται ικανοποιητικό για το GC. Εάν η ένωση έχει σημείο βρασμού κάτω από 500 °C σε 1 atm, αυτό θα πρέπει να είναι επαρκώς πτητικό για ανάλυση με GC. Σε περίπτωση αμφιβολίας, μπορεί να γίνει έγχυση δείγματος στη στήλη για να προσδιοριστεί εάν η ένωση εκλύεται σε εύλογο χρόνο. Εκτός από την πτητικότητα, η αναλυόμενη ουσία πρέπει επίσης να είναι θερμικά σταθερή και να μην είναι επιρρεπής στις μεταβολές της θερμότητας. Μια ασταθής αναλυόμενη ουσία μπορεί να αποικοδομηθεί κάτω από τις υψηλότερες θερμοκρασίες που χρησιμοποιούνται στη θύρα ή στη στήλη έγχυσης. Η θερμική

υποβάθμιση μπορεί να ελαχιστοποιηθεί με διαφοροποίηση της τεχνικής έγχυσης δείγματος ή με παραγωγοποίηση των αναλυτών.<sup>18</sup> Η χρησιμότητα της αεριοχρωματογραφίας στα εγκληματολογικά εργαστήρια έγκειται στην ανάλυση υπολειμμάτων πυρκαγιάς, ναρκωτικά αλλά και άλλων τοξικολογικών στοιχείων. Μέχρι πρόσφατα, το GC-FID θεωρήθηκε αποδεκτή τεχνική για την ανάλυση υπολειμμάτων πυρκαγιάς και ακόμη και σήμερα, ορισμένα εργαστήρια εξακολουθούν να την χρησιμοποιούν. Επιταχυντές υδρογονανθράκων/αναφλέξιμα υγρά, όπως η βενζίνη, η κηροζίνη, το ντίζελ και το μαζούτ, είναι σύνθετα δείγματα που περιέχουν εκατοντάδες συστατικά. Το προκύπτον χρωματογράφημα θα είναι ένα μοτίβο χαρακτηριστικών κορυφών για συγκεκριμένο τύπο εύφλεκτου υγρού. Ωστόσο αυτή η μέθοδος δεν επιτρέπει συγκεκριμένα στοιχεία που πρέπει να προσδιοριστούν. Τέτοιες πληροφορίες είναι ιδιαίτερα χρήσιμες για τον προσδιορισμό του κατασκευαστή ενός εύφλεκτου υγρού ή για σύγκριση με ένα γνωστό δείγμα. Για αυτό τον λόγο, το GC-MS είναι πλέον η προτιμώμενη τεχνική για την ανάλυση συντριμμιών πυρκαγιάς καθώς επιτρέπει σε μεμονωμένα άτομα συστατικά που πρέπει να αναγνωρίζονται, ακόμη και μεταξύ των ρύπων υποβάθρου ή μέσα σε μείγματα των εύφλεκτων υγρών. Τα συντρίμια που ανακτώνται από τη σκηνή της πυρκαγιάς είναι συχνά υγρά και καίγονται και μπορεί να αποτελούνται από υλικά όπως ξύλο, χαλί, επένδυση χαλιού, πλακάκι και άλλα συνθετικά υλικά, τα οποία όλα μπορούν να συμβάλλουν στην παρεμβολή των πτητικών προϊόντων πυρόλυσης που μπορεί να κάνει δύσκολη την αναγνώριση των επιταχυντών. Η απώλεια της επιτάχυνσης μέσω της προσρόφησης στα συντρίμια, της εξάτμισης από τη θερμότητα της φλόγας και η παρουσία νερού όλα συμβάλλουν στην αναγνώριση των επιταχυντών ένα δύσκολο έργο. Το GC μπορεί να είναι ένα ισχυρό εργαλείο στην ανάλυση για τον διαχωρισμό και προσδιορίστε τον επιταχυντή παρουσία αυτών των παρεμβολών.<sup>18</sup> Να τονίσουμε σε αυτό το σημείο πως στις αναλύσεις εκτός από την ανάλυση των δειγμάτων πρέπει να υπάρχουν τυφλά δείγματα, δείγματα ελέγχου, αναφοράς και πρότυπα διαλύματα τα οποία αναλύονται μαζί με το δείγμα για τη διατήρηση του ποιοτικού ελέγχου και της διασφάλισης ποιότητας της μεθόδου, του οργάνου, του αναλυτή/επιστήμονας και του εργαστηρίου.

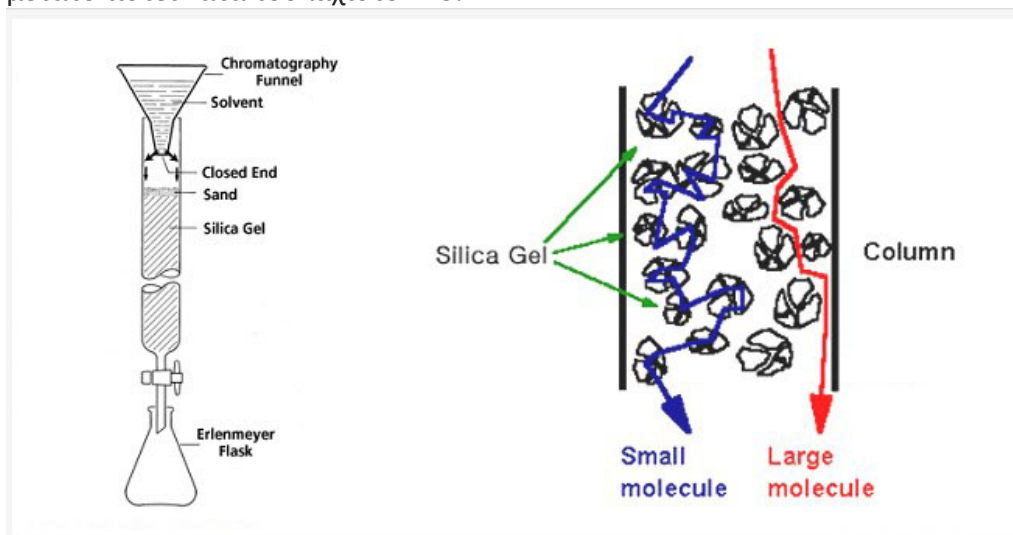
#### ■ *Υγρή χρωματογραφία*

Στην υγρή χρωματογραφία ως στατική φάση χρησιμοποιείται ένα στερεό πορώδες υλικό (συνήθως οξείδιο του πυριτίου) ή ένα υγρό σε ένα στερεό υπόστρωμα (μη πορώδη σωματίδια υάλου ή πολυμερούς). Η κινητή φάση είναι σε υγρή μορφή. Η διαβίβαση της κινητής φάσης επιτυγχάνεται με τη χρησιμοποίηση αντλιών χαμηλής πίεσης όταν η στατική φάση αποτελείται από μεγάλης διαμέτρου σωματίδια με μικρή αντίσταση (κλασσική υγρή χρωματογραφία στήλης), είτε με τη χρησιμοποίηση αντλιών υψηλής πίεσης όταν η στατική φάση αποτελείται από μικρής διαμέτρου μεγάλης αντίστασης σωματίδια (υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης).<sup>19</sup>

Οι φάσεις που χρησιμοποιούνται έχουν ως βάση το πυρίτιο. Πολλές από αυτές ενδέχεται να έχουν υπολειμματικές ομάδες σιλανόλης (Si-OH). Κατά την κατασκευή αντίστροφων φάσεων με βάση το πυρίτιο, αυτό αντιδρά με ενώσεις αλκυλοχλωροσιλανίου (C4, C8 ή C18) οι οποίες παρέχουν την επιφανειακή λειτουργικότητα της στατικής φάσης. Λόγω προβλημάτων όπως η θερμική αστάθεια,



στήλες που βασίζονται σε μονολιθικό υλικό συσκευασίας και αλουμίνα έχουν επίσης υιοθετηθεί, ιδιαίτερα για μεθόδους HPLC που χρησιμοποιούν ακραία pH. Το υλικό συσκευασίας με βάση την αλουμίνα απλοποιεί τους μηχανισμούς συγκράτησης λόγω της απουσίας ομάδων σιλανόλης. Έτσι αφαιρεί την απαίτηση για τροποποιητές αμίνης και μειώνει τη μη αναστρέψιμη δέσμευση. Η αλουμίνα μπορεί να επικαλυφθεί με πολυβουταδιένιο για να δώσει χαρακτηριστικά αντίστροφης φάσης. Τέλος η αλουμίνα έχει εύρος pH χρήσης από pH 2 έως 12 σε σύγκριση με το pH 2–8 που χρησιμοποιείται στις στήλες με πυρίτιο. Οι μονολιθικές στήλες, σε αντίθεση με τις συσκευασμένες στήλες, είναι πορώδεις ράβδοι που παράγονται μέσα σε στήλη. Είναι πολύ πορώδη, με πολλά κανάλια και μεγάλη επιφάνεια για διαμοριακή αλληλεπίδραση των αναλυτών με τη στατική φάση. Τα μήκη των στηλών κυμαίνονται συνήθως από 35 έως 250 mm. Οι τυπικές εσωτερικές διαμέτροι είναι 1,0, 2,1, 3,0 και 4,6 mm. Μερικές από τις πιο κοινές στατικές φάσεις είναι επίσης διαθέσιμες σε στενό τριχοειδές (0,3, 0,5 και 0,8 mm) και νανομορφές εσωτερικής διαμέτρου (0,075 και 0,1 mm) που επιτρέπουν την ανάλυση πολύ χαμηλών συγκεντρώσεων της αναλυόμενης ουσίας, όπως θα αναμέναμε για περιπτώσεις όπως η ανάλυση δειγμάτων μαλλιών ή σε περιπτώσεις σεξουαλικής παρενόχλησης με χρήση ναρκωτικών ουσιών, όπου έχει περάσει πολύς χρόνος από τη λήψη τους. Αξιοσημείωτο είναι ότι χρησιμοποιούνται και στήλες με ακινητοποιημένα μέταλλα και οξείδια μετάλλων ως στατικές φάσεις στην πρωτεωμική, κατά την ανάλυση των φωσφοπεπτιδίων.<sup>19</sup> Κάποιες φορές χρησιμοποιούνται προστατευτικές στήλες ή προστήλες για την απομάκρυνση αιωρούμενων σωματιδίων και προσμίξεων του διαλύτη. Η σύσταση του υλικού της πρέπει να είναι παρόμοια με αυτού της αναλυτικής στήλης. Η στήλη προστασίας είναι πιο κοντή από την αναλυτική στήλη (π.χ. 12,5 ή 17 mm), αλλά έχει την ίδια στατική φάση και το ίδιο πλάτος. Συνιστάται από τους κατασκευαστές η προστατευτική στήλη να αλλάζει εάν η ανάλυση, η πίεση ή ο αριθμός των πλακών μετατοπιστεί κατά τουλάχιστον 10%.<sup>19</sup>

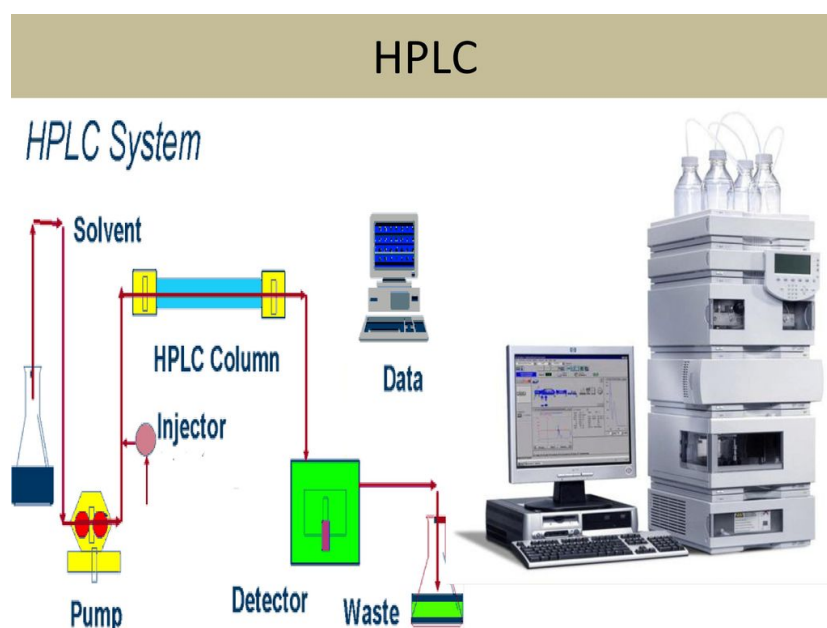


Εικόνα 9: αναλυτική στήλη <https://swambechemicals.wordpress.com/2015/09/26/silica-gel-for-column-chromatography/>

Συχνότερα από όλες τις τεχνικές διαχωρισμού χρησιμοποιείται η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης. Αυτό συμβαίνει λόγω της ευαισθησίας της τεχνικής, της καταλληλότητάς της για διαχωρισμό μη πτητικών ουσιών και η προσαρμογή της σε ακριβείς ποσοτικούς προσδιορισμούς. Χρησιμοποιείται ευρέως

λόγω ικανότητας διαχωρισμού αμινοξέων, πρωτεϊνών, νουκλεϊκών οξέων, υδατανθράκων, αντιβιοτικών, στεροειδών, φυτοφαρμάκων, ανόργανων ουσιών και άλλων ουσιών. Να σημειωθεί ότι με την ονομασία υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης/πίεσης, αναφερόμαστε σε όλες τις σύγχρονες τεχνικές υγροχρωματογραφίας που χρησιμοποιούν πίεση για να επιτευχθεί ροή.

Τα μέρη του οργάνου είναι οι φιάλες αποθήκευσης διαλυτών, μια αντλία σταθερής ροής και πίεσης, η μονάδα εισαγωγής του δείγματος, η χρωματογραφική στήλη, ο ανιχνευτής (φασματομετρίας μάζας, απορρόφησης υπεριώδους-ορατού, φθορισμού, δείκτη διάθλασης κ.α.) και το καταγραφικό (Εικόνα 10). Οι στήλες που χρησιμοποιούνται είναι συνήθως από ανοξείδωτο χάλυβα, διαμέτρου 3-5mm και μήκους 5-25 cm. Οι διαλύτες που χρησιμοποιούνται είναι συνήθως νερό, μεθανόλη, ακετονιτρίλιο. Ανάλογα την ποσότητα και τη σύσταση των διαλυτών διακρίνουμε δυο είδη έκλουσης. Την ισοκρατική, κατά την οποία χρησιμοποιείται ένας διαλύτης σταθερής σύστασης και την βαθμιδωτή, όπου χρησιμοποιείται σύστημα διαλυτών, με διαφορετική σύσταση και πολικότητα. Κατά την έκλουση αλλάζει ο λόγος των διαλυτών με προκαθορισμένο ρυθμό. Η βαθμιδωτή έκλουση έχει καλύτερη απόδοση.<sup>20</sup>



Εικόνα 10: μέρη συστήματος HPLC, Χρωματογραφία, Ελευθερίου Α. <https://slideplayer.gr/slide/12043896/>

Τα φάρμακα συνήθως περιέχουν είτε μια βασική είτε μια όξινη ομάδα και το φορτίο μπορεί να χειριστεί χρησιμοποιώντας είτε ένα ρυθμιστικό (συνήθως στην περιοχή 5–10 mM) είτε ένα οξύ ή βάση. Είναι σημαντικό να ρυθμιστεί το δείγμα καθώς εγχύεται για να αποφευχθεί η καθίζηση αλάτων και για τον λόγο αυτό, τα δείγματα παρασκευάζονται συχνά στη μήτρα της κινητής φάσης. Εναλλακτικά, ένα οξύ συχνά σε 0,1% v/v προστίθεται στην κινητή φάση Α και μερικές φορές Β για να επιτευχθεί χαμηλό pH ή βάση για να επιτευχθεί υψηλό pH. Κατά κανόνα, οι βασικές ενώσεις θεωρούνται ενοποιημένες (>99%) 2 μονάδες pH πάνω από το pKa τους και θεωρούνται ιονισμένες 2 μονάδες pH κάτω από το pKa τους. Το αντίστροφο ισχύει για τις όξινες ενώσεις. Η ενοποιημένη μορφή αξιοποιείται σε χρωματογραφία αντίστροφης φάσης όπου οι οργανικές ενώσεις θα διατηρούνται ισχυρότερα μέσω



των δυνάμεων van der Waals. Εάν χρησιμοποιείται pH κινητής φάσης γύρω από το pKa μιας ουσίας, μικρές διακυμάνσεις 0,1 μονάδας pH μπορεί να προκαλέσουν αστάθεια χρόνου κατακράτησης και δυσκολίες στις μεθόδους επικύρωσης. Η κινητή φάση B περιέχει έναν οργανικό διαλύτη είτε ως μοναδικό διαλύτη είτε μεικτό με μικρότερη αναλογία υδατικού διαλύματος. Το οργανικό συστατικό της κινητής φάσης είναι συχνά μεθανόλη ή ακετονιτρίλιο.<sup>20</sup>

## *2.2 Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης σε δείγματα εδάφους*

Πολλές φορές το έδαφος ενός τόπου που διερευνάται για ένα έγκλημα αποτελεί αποδεικτικό στοιχείο. Η παρουσία ιζημάτων έχει οδηγήσει στη χρήση γεωδραστικής ανάλυσης σε πολλά σενάρια για να βοηθήσει την ανακατασκευή του τόπου του εγκλήματος, να επιβεβαιώσει δηλώσεις μαρτύρων ή να επαληθεύσει ύποπτα άλλοθι. Οι τεχνικές που χρησιμοποιούνται για να γίνει αυτό βασίζονται στα φυσικά ή χημικά χαρακτηριστικά του ορυκτού κλάσματος του εδάφους. Ορισμένες από τις αναλυτικές τεχνικές που χρησιμοποιούνται μπορεί να καταστρέψουν το δείγμα ή να απαιτήσουν ομογενοποίηση του δείγματος. Άλλες τεχνικές που χρησιμοποιούνται απαιτούν ποσότητες δειγμάτων που υπερβαίνουν τα υλικά που ανακτώνται από αντικείμενα εγκληματολογικού ενδιαφέροντος (π.χ. παπούτσια, ρούχα, οχήματα).<sup>21</sup>

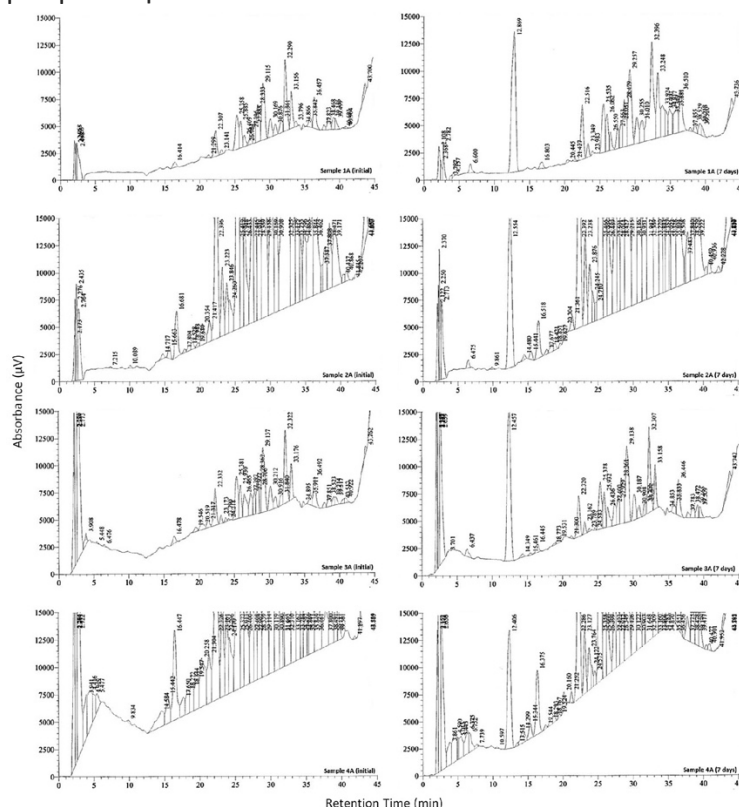
Το έδαφος αποτελείται από βιολογικό υλικό, υγρά και αέρια συστατικά. Οργανικά (κυρίως στα ανώτερα στρώματα) και ανόργανα υλικά συνθέτουν λοιπόν το έδαφος, καθώς εκτός από τα φυσικά υλικά του (ορυκτά σωματίδια) περιλαμβάνει και άλλα υλικά όπως βαρέα μέταλλα (σε περιοχές κοντά σε βιομηχανίες και εργοστάσια ή άλλες βιομηχανικές δραστηριότητες όπως οι εξορύξεις) ή οργανικά υλικά από λιπάσματα και φυτοφάρμακα. Ως εκ τούτου, τα εδάφη που προέρχονται από διαφορετικές τοποθεσίες, περιοχές ή χώρες τείνουν να έχουν μοναδική σύνθεση. Κατά την ανάκτηση υλικού ωστόσο από ένα θύμα ή έναν ύποπτο λαμβάνουμε πολύ μικρή ποσότητα δείγματος γι' αυτό αναζητούμε μεθόδους με υψηλή ευαισθησία.<sup>22</sup>

Επίσης πολλές φορές στην κάτω σόλα των υποδημάτων και στα ελαστικά των οχημάτων, μπορεί ενδεχομένως να μεταφερθεί μεταξύ του εντοπισμού ενός πιθανού υπόπτου στον τόπο του εγκλήματος και αντίστροφα.<sup>23</sup>

Αναπτύχθηκε μια μελέτη στο Λονδίνο με δείγματα εδάφους που αναλύθηκαν με HPLC ο σκοπός της οποίας ήταν να αναπτύξει τη συλλογή δειγμάτων, την προετοιμασία, την ανάλυση και τις ερμηνευτικές προσεγγίσεις που χρησιμοποιήθηκαν. Η μέθοδος που αναπτύχθηκε εκ νέου προοριζόταν να είναι κατάλληλη για τη σύγκριση δειγμάτων ίχνους εδάφους με σκοπό τον αποκλεισμό του τόπου του εγκλήματος και άγνωστων δειγμάτων. Επιλέχθηκαν τέσσερις τοποθεσίες: ένα λιβάδι, ένας υγρότοπος, μια δασώδης περιοχή και ένα άγριο λιβάδι. Ελήφθησαν δείγματα από περιοχές εκτεθειμένου εδάφους λόγω ότι κρίθηκαν πιο εύκολα μεταφερόμενες. Πέντε δείγματα συλλέχθηκαν χρησιμοποιώντας ένα κουτάλι από ανοξείδωτο χάλυβα, αφαιρώντας τυχόν χλοοτάπητα ή χαλίκι. Τα δείγματα αποθηκεύτηκαν σε σακούλες LDPE (χαμηλής πυκνότητας πολυαιθυλένιο), που ήταν μοναδικά επισήμασμένες και σφραγιζόμενες.

Τα δείγματα αποθηκεύτηκαν στους -20 °C προκειμένου να αποφευχθούν αλλαγές στην οργανική σύνθεση των δειγμάτων που προκαλούνται από μικροοργανισμούς ή από θερμική αποδόμηση. Κατά την προετοιμασία των δειγμάτων αυτά αρχικά αφέθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου προς απόψυξη. Στη συνέχεια ζυγίστηκαν 250

mg χρώματος απο κάθε δείγμα και αραιώθηκε με διαλύτη ακετονιτρίλιο (500 μl). Τα δείγματα στη συνέχεια αναμίχθηκαν και υποβλήθηκαν σε υπερήχους για 15 λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκαν στις 15.000 στροφές για 10 λεπτά. Το υπερκείμενο διάλυμα δείγματος μεταφέρθηκε σε φιαλίδιο HPLC για ανάλυση. Η αναλυτική στήλη που χρησιμοποιήθηκε ήταν η Whatman Partasil 10 ODS (μέγεθος σωματιδίων 10 μm, υλικό συσκευασίας C18, διαστάσεις στήλης 250 × 4,6 mm). Η κινητή φάση που χρησιμοποιήθηκε ήταν 65% ακετονιτρίλιο 35% νερό, ο όγκος έγχυσης ήταν 10 μl και τα δείγματα διατηρήθηκαν στους 10 °C κατά την ανάλυση για να ελαχιστοποιηθεί η αποικοδόμηση του δείγματος. Η έκλουση ήταν βαθμιδωτή.



Εικόνα 11: αποκρίσεις οργάνου HPLC, <https://www.researchgate.net/publication/304340559>

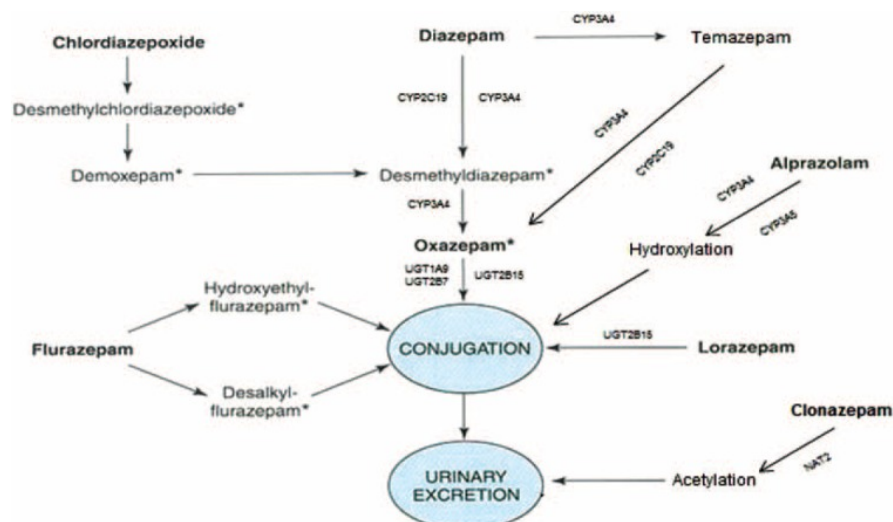
Διενεργήθηκαν βελτιώσεις για τα καλύτερα αποτελέσματα της ανάλυσης. Η αύξηση του όγκου του δείγματος που εγχύθηκε στο σύστημα αύξησε το ύψος των κορυφών χωρίς να επηρεάσει σημαντικά την ανάλυση αιχμής. Αυτό επέτρεψε τη μείωση της συγκέντρωσης του δείγματος χωρίς απώλεια ευαισθησίας, γεγονός που επέτρεψε τη χρήση πιο ιατροδικαστικών μεγεθών δειγμάτων. Οι αποκρίσεις που βλέπουμε παραπάνω (εικόνα 11) ήταν γενικά πολύ αδύναμες, αλλά ήταν σύμφωνες με προηγούμενες μελέτες.. Επιπλέον, μόνο πολύ λίγες κορυφές ήταν κάτω από το όριο ανίχνευσης, που ορίζεται ως η απόκριση αιχμής με αναλογία σήματος προς θόρυβο 3:1. Επίσης η χρήση βαθμιδωτής έκλουσης σε αυτή τη μελέτη πέτυχε καλύτερο διαχωρισμό των συστατικών των δειγμάτων, σε σχέση με προηγούμενες μελέτες. Αυτό επέτρεψε την ανίχνευση επιπλέον 11 κορυφών, προσφέροντας έτσι περισσότερα σημεία για σύγκριση μεταξύ δειγμάτων και βοηθώντας στην εκχώρηση ταυτοτήτων κορυφών. Τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης μελέτης λοιπόν ήταν τα εξής: ήταν δυνατό να απλοποιηθεί η μέθοδος προετοιμασίας του δείγματος σε έξι στάδια, εξαλείφοντας τα στάδια ξήρανσης, κοσκινίσματος, εξάτμισης και

διαχωρισμού που περιγράφονται σε προηγούμενες μελέτες, γεγονός που μείωσε τον χρόνο προετοιμασίας του δείγματος στα 40 λεπτά. Άμεσα προκύπτει ο περιορισμός του κινδύνου μόλυνσης και αποικοδόμησης των δειγμάτων αλλά και η ανάγκη ομογενοποίησης τους δείγματος. Η βελτιστοποίηση των παραμέτρων του οργάνου επίσης βελτίωσε την ευαισθησία της μεθόδου ( 250 mg δείγματος). Τέλος απαιτήθηκε μόνο ένα βήμα φιλτραρίσματος, το οποίο μειώνει το κόστος των αναλωσίμων σε σύγκριση με προηγούμενες μεθόδους. Για πρώτη φορά, λοιπόν με αυτή την μελέτη αποδείχθηκε ότι δύναται η διάκριση μεταξύ δειγμάτων εδάφους που λαμβάνονται από διαφορετικά σημεία εντός της ίδιας γεωγραφικής τοποθεσίας με HPLC και μάλιστα με υψηλά επίπεδα ακρίβειας.<sup>24</sup>

Σε μια έρευνα του McCulloch και της ομάδας του σχετικά με τη σκοπιμότητα της υγρής χρωματογραφίας υπερ-απόδοσης (HPLC) στη διάκριση εδαφών για εγκληματολογικούς σκοπούς, οι συγγραφείς κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η μέθοδος έχει τη δυνατότητα να παρέχει ακριβή και πρακτική διαφοροποίηση των εδαφών που προέρχονται από διάφορες γειτονικές περιοχές.<sup>25</sup> Αξίζει να αναφέρουμε πως σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε πανεπιστήμιο της Μαλαισίας, έλεγξαν δείγματα από τρία διαφορετικά εδάφη για τον προσδιορισμό του προφίλ των μη πτητικών ενώσεων και διενήργησαν υγρή χρωματογραφία υπερ απόδοσης (UPLC) ισοκρατικής έκλουσης για τον διαχωρισμό των μη πτητικών οργανικών ενώσεων χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση ακετονιτρίλιο. Τα πλεονεκτήματα που τόνισαν έναντι της HPLC είναι ότι η UPLC μειώνει τον χρόνο ανάλυσης, τον όγκο έγχυσης και την κατανάλωση διαλύτη.<sup>24</sup>

### *2.3 Εφαρμογή HPLC και UHPLC για τον εντοπισμό βενζοδιαζεπινών*

Οι βενζοδιαζεπίνες (BZ) είναι τα συχνότερα χορηγούμενα ψυχιατρικά φάρμακα (σκευάσματα όπως Xanax, Restoril, valium, klonopin κ.α.). Αυτές δρουν ως αγχολυτικά, υπνωτικά, αντισπασμωδικά και μυοχαλαρωτικά.<sup>26</sup> Πολλές φορές όμως εκτός της χρήσης του από ασθενείς έπειτα από συνταγογράφηση, χορηγούνται παράνομα σε περιπτώσεις βιασμού και σεξουαλικής παρενόχλησης για ύπνωση. Επίσης σε πολλές περιπτώσεις γίνεται κατάχρηση της χορηγούμενης δόσης και προκαλείται θάνατος από υπερβολική δόση. Για τον εντοπισμό των βενζοδιαζεπινών σε βιολογικά και μη δείγματα χρησιμοποιείται HPLC ή UHPLC. Οι μεταβολικές οδοί των βενζοδιαζεπινών είναι 2 βασικές: ηπατική μικροσωμική οξείδωση, N - απαλκυλίωση ή αλειφατική υδροξυλίωση (φάση I) και σύζευξη γλυκουρονιδίου (φάση II) . Τα CYP3A4 , CYP3A5 και CYP2C19 είναι σημαντικά ένζυμα βιομετατροπής των BZ.<sup>27</sup>



Εικόνα 12: μεταβολισμός βενζοδιαζεπινών, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4554044/>

Σε μια μελέτη που διεξήχθη συγκρίθηκαν υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης και η υγρή χρωματογραφία υπερ-υψηλής απόδοσης σε 73 βιολογικά δείγματα για 7 BZ. Όσον αφορά τους χρόνους ανάλυσης αλλά και άλλες παραμέτρους που συγκρίθηκαν μεταξύ των δυο μεθόδων παρουσιάζονται τα αποτελέσματα στον παρακάτω πίνακα.<sup>27</sup>

Πίνακας 1: παράμετροι HPLC και UHPLC

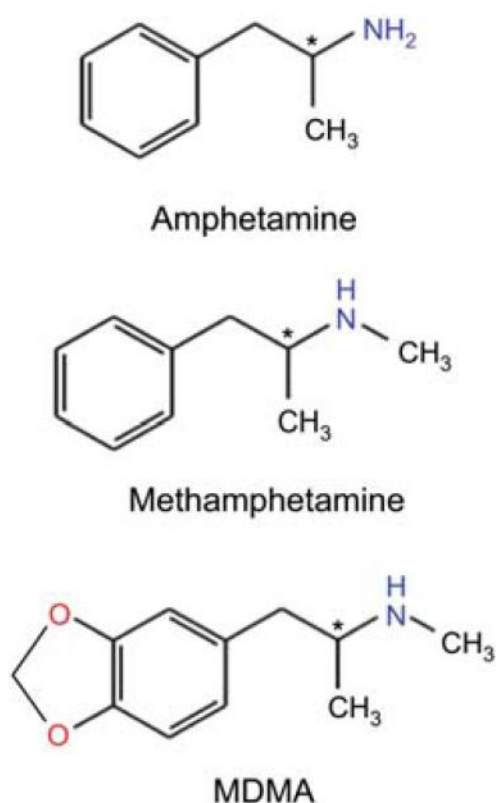
|                                 | HPLC | UHPLC |
|---------------------------------|------|-------|
| Ρυθμός ροής (ml/min)            | 1    | 0,7   |
| Συνολικός χρόνος ανάλυσης (min) | 40   | 15    |
| Πίεση (bar)                     | 400  | 750   |
| Όγκος κινητής φάσης (ml)        | 40   | 21,5  |
| Όγκος σταθερής φάσης (μl)       | 20   | 5     |

Οι στήλες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν για την HPLC Eurospher 100-5 C-18 (250 mm × 4,6 mm) και για την UHPLC η Eurospher II 100-3 C-18 (100 mm x 3 mm). Το χρωματογραφικό λογισμικό που χρησιμοποιήσαμε ήταν το Ezchrom Elite.

Σε μία περίπτωση η καθαρή δηλητηρίαση από BZ εντοπίστηκε ως η μόνη αιτία θανάτου. Σε 25 περιπτώσεις, η δηλητηρίαση από πολλά φάρμακα (μεταξύ αυτών και οι BZ) η κύρια αιτία θανάτου, στις υπόλοιπες 47 περιπτώσεις ήταν άλλες ιατρικές ασθένειες. βρέθηκαν ως οι κύριοι παράγοντες πρόκλησης θανάτου και είχαν λάβει BZ κατά τη διάρκεια της θεραπείας, η οποία ανιχνεύθηκε σε μεταθανάτια δείγματα. Κρίνεται αρκετά σημαντική η συμβολή των υγρών χρωματογραφιών λοιπόν για την διαπίστωση θανάτου που προκλήθηκε από τις βενζοδιαζεπίνες κυρίως για τοξικολογικούς σκοπούς. Ωστόσο προτιμότερη είναι η UHPLC, καθώς διαθέτει ένα σύστημα εξαιρετικά υψηλής πίεσης το οποίο επιτρέπει τη χρήση στηλών με μικρά σωματίδια και μικρή διάμετρο, γεγονός που έχει θετική επίδραση στην απόδοση και στο χρόνο ανάλυσης.<sup>27</sup>

## 2.4 UHPLC- MS/MS για την ανίχνευση ναρκωτικών σε μαλλιά

Οι αμφεταμίνες είναι μια υποκατηγορία ψυχοδιεγερτικών που χαρακτηρίζονται από την παρουσία μιας δομής πυρήνα α-μεθυλφαιναιθυλαμίνης. Η μεθαμφεταμίνη (METH), η d -αμφεταμίνη (d -AMPH) και η 3,4-μεθυλενοδιοξυμεθαμφεταμίνη (MDMA) (εικόνα 12) είναι παράνομα ψυχοδραστικά ναρκωτικά που χρησιμοποιούνται παγκοσμίως για τις διεγερτικές, ευφορικές και στην περίπτωση του MDMA, εμφαθογενετικές/εντακτογονικές επιδράσεις τους (παράγουν εμπειρίες συναισθηματικής επικοινωνίας, ενότητας, συγγένειας ή συναισθηματικής διαφάνειας, δηλαδή ενσυναίσθηση).<sup>28</sup>



Εικόνα 13: χημική δομή των αμφεταμινών, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4497800/>

Στην ιατροδικαστική τοξικολογία, η χρήση της ανάλυσης μαλλιών σε θανάτους από υπερβολική δόση ναρκωτικών έχει διερευνηθεί εκτενώς. Η μέθοδος υγρής χρωματογραφίας-διαδοχικής φασματομετρίας μάζας (UHPLC-MS/MS) εξαιρετικά υψηλής απόδοσης χρησιμοποιείται συχνά σε αυτά τα δείγματα για την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό της αμφεταμίνης, της μεθαμφεταμίνης, της 3,4-μεθυλενοδιοξυαμφεταμίνης και της 3,4-μεθυλενοδιοξυ μεθαμφεταμίνης. Όταν χρησιμοποιούνται δείγματα μαλλιών για την ανάλυση φαρμάκων στην ιατροδικαστική τοξικολογία, η ερμηνεία των αποτελεσμάτων ενισχύεται εάν χρησιμοποιείται τμηματική ανάλυση. Η χρονική κατανομή των φαρμάκων κατά μήκος του στελέχους της τρίχας έχει βρεθεί πως ακόμη και μετά από μία δόση, το φάρμακο μπορεί να υπάρχει σε περισσότερα από ένα τμήματα. Ένας λόγος είναι ότι τα φάρμακα μεταναστεύουν κατά μήκος της τρίχας κατά την ανάπτυξη ή ότι οι θύλακες παράγουν τρίχες με διαφορετικούς ρυθμούς και σε διαφορετικούς χρόνους, με

αποτέλεσμα ένα θολό χρονοδιάγραμμα κατά την ανάλυση μιας δέσμης κλώνων μαλλιών.<sup>29</sup>

Έρευνες έδειξαν ότι μπορεί να χρειαστούν έως και 18 μήνες για να καθαρίσει πλήρως την τρίχα από ένα φάρμακο.<sup>30</sup>

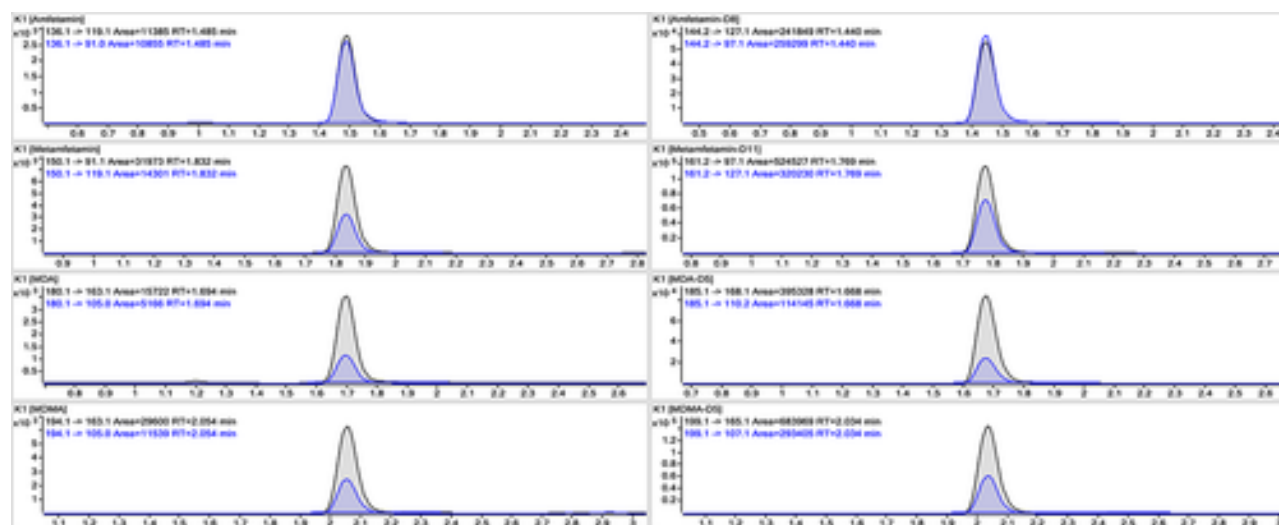
Σύμφωνα με το Society of Hair Testing (SoHT) συνίσταται τμηματοποίηση κατά περίπτωση και θεωρεί ότι συνήθως τα τμήματα μεταξύ 10 και 30 mm είναι επαρκή, αλλά ακόμη και μικρότερα τμήματα μπορούν να χρησιμοποιηθούν. Το SoHT συνιστά επίσης όρια για τον προσδιορισμό της χρήσης ναρκωτικών, όπως 0,2 ng/mg για την αμφεταμίνη (AM), τη μεθαμφεταμίνη (MA), το MDA και το MDMA.<sup>31</sup>

Σε μια συγκεκριμένη μελέτη διενεργήθηκε ανάλυση για ανίχνευση αμφεταμινών σε διάφορες καταστάσεις, συμπεριλαμβανομένης της ανίχνευσης μετά από σποραδική ή εφάπαξ δόση. Ο στόχος αυτής της μελέτης ήταν η ανάπτυξη και η επικύρωση μιας μεθόδου για την ποσοτική ανάλυση της αμφεταμίνης στα μαλλιά. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε σε τριπλό τετραπολικό φασματόμετρο μάζας Agilent 6490 σε συνδυασμό με όργανο Agilent 1290 Infinity UHPLC. Ο χρωματογραφικός διαχωρισμός επιτεύχθηκε με στήλη BEH Phenyl (2,1 × 50 mm, 1,8 μm) στους 60°C με κινητή φάση A μυρμηκικό αμμώνιο 10 mM με 0,05% μυρμηκικό οξύ (pH 3) και κινητή φάση B ακετονιτρίλιο με 0,05% μυρμηκικό οξύ. Ο ρυθμό ροής που επιλέχθηκε ήταν 0,4 mL/min. Ο συνολικός χρόνος εκτέλεσης ήταν 4 λεπτά και ο όγκος ένεσης 2 μL.

Για επικύρωση της μεθόδου αλλά και για την βαθμονόμηση και τα δείγματα ελέγχου, χρησιμοποιήθηκαν μαλλιά εθελοντών χωρίς φάρμακα. Επιπρόσθετα δείγματα ελέγχου αυθεντικών μαλλιών ελήφθησαν από περιπτώσεις αυτοψίας στο Τμήμα Ιατροδικαστικής στη Σόλνα της Σουηδίας. Τα μαλλιά πλύθηκαν σε 2 mL ισοπροπανόλης (37°C, 15 λεπτά) και ακολούθησαν τρεις πλύσεις με 2 mL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών 0,01 M pH6 (37°C, 30 λεπτά). Ξεπλύθηκαν με 2 mL ισοπροπανόλης (5 λεπτά). Στη συνέχεια στέγνωσαν όλη τη νύχτα σε θερμοκρασία δωματίου πριν από την ανάλυση. Τέλος προστέθηκαν 3 mL ισοοκτάνιο και το δείγμα ανακινήθηκε για 10 λεπτά και φυγοκεντρήθηκε στις 4200 στροφές για 5 λεπτά. Η οργανική φάση μεταφέρθηκε και εξατμίστηκε μέχρι ξηρού υπό ροή αζώτου. Το δείγμα ανασυστάθηκε σε 100 μL 0,05% μυρμηκικό οξύ με ακετονιτρίλιο και σε 10 mM μυρμηκικό αμμώνιο με 0,05% μυρμηκικό οξύ και μεταφέρθηκε σε φιαλίδιο αυτόματης δειγματοληψίας για ανάλυση.

Τα δείγματα με τον αναλύτη απομονώθηκαν από άτομα που έλαβαν αμφεταμίνη σε ποσότητα 50 mg και σε διάστημα 14 ημερών. Πραγματοποιήθηκε ανάλυση επιβεβαίωσης σε δείγματα μαλλιών από ιατροδικαστικές αυτοψίες (N=20), από βίαια εγκλήματα (N=3) και από κέντρα θεραπείας ναρκωτικών και επαναχορήγηση άδειας οδήγησης (N=20). Κατά την επικύρωση της μεθόδου, χρησιμοποιήθηκαν 10 mg τρίχας. Τα δείγματα ρουτίνας χωρίστηκαν σε τμήματα 0,5-1 cm ανάλογα με την περίπτωση και χρησιμοποιήθηκαν 5-20 mg τρίχας για ανάλυση. Δείγματα μαλλιών από την ελεγχόμενη μελέτη τμηματοποιήθηκαν σε τμήματα 0,5 cm και χρησιμοποιήθηκαν 4-12 mg για την ανάλυση. Με συνολικό χρόνο εκτέλεσης της μεθόδου 4 λεπτά, επιτεύχθη επαρκής διαχωρισμός και για τις τέσσερις αναλυόμενες ουσίες. Δεν ανιχνεύθηκαν αιχμές παρεμβολής από τα δέκα άτομα ή από το IS στη δοκιμή επιλεκτικότητας. Ωστόσο, η μεθεδρόνη έχει την ίδια μοριακή μάζα με το MDMA και η φαιντερμίνη την ίδια μοριακή μάζα με την MA. Ο διαχωρισμός επιτεύχθηκε για τη μεθεδρόνη και η MDMA και η φαιντερμίνη μοιράζονται μόνο μία

μετάβαση με την MA, η οποία θα παράγει μια αναλογία χαρακτηριστικού αποκλεισμού.<sup>32</sup>



Εικόνα 14: χρωματογραφήματα αμφεταμινών  
<https://analyticalsciencejournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/dta.1637>

Τα συμπεράσματα που βγήκαν από την παραπάνω δοκιμή είναι τα εξής. Παρόλο που η αναλυτική ακρίβεια ήταν αποδεκτή, οι δοκιμές ευρωστίας έδειξαν ότι η επαναλαμβανόμενη μέτρηση ενός αυθεντικού δείγματος τρίχας δίνει σημαντικά μεγαλύτερη απόκλιση και φαίνεται να εξαρτάται από τη συγκέντρωση του φαρμάκου. Επομένως, προτείνεται να συμπεριληφθούν αυθεντικά δείγματα μαλλιών στην επικύρωση των μεθόδων. Χρησιμοποιώντας μόνο 10 mg δείγματος, η ευαισθησία αυτής της μεθόδου ήταν ίση με τις προηγούμενες δημοσιευμένες μεθόδους LC-MS/MS που περιλάμβαναν πέψη των μαλλιών σε υδροξείδιο του νατρίου. Η χρήση του UHPLC οδήγησε σε μια πολύ σύντομη χρωματογραφία 4 λεπτών με καλή ανάλυση σε σύγκριση με την κανονική LC που μπορεί να χρειαστεί χρόνους λειτουργίας έως και 20 λεπτά. Η τμηματική ανάλυση της αμφεταμίνης στα μαλλιά αποκάλυψε αύξηση της συγκέντρωσης προς το εγγύς άκρο ή παρόμοιες συγκεντρώσεις στα τμήματα.<sup>32</sup>

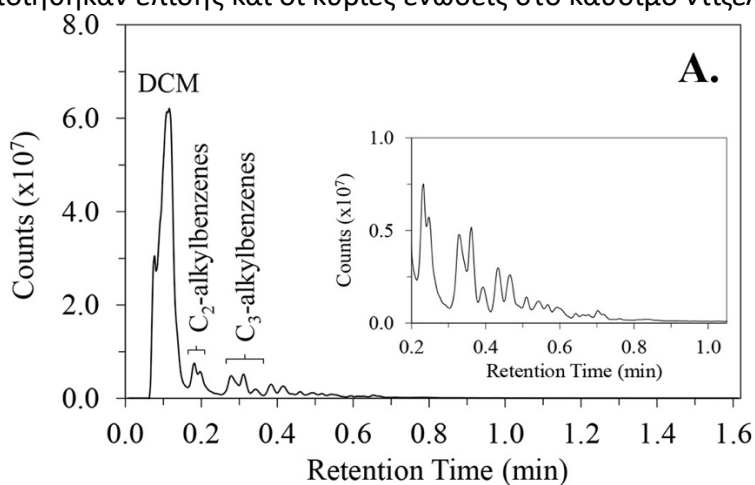
Άλλες εφαρμογές της HPLC σε συνδιασμό με την ανίχνευση διάταξης διόδων (DAD) εφαρμόζονται ήδη ενώ με την φασματομετρία μάζας ιονισμού ατμοσφαιρικής πίεσης (HPLC-API-MS) δοκιμάζονται. Οι εφαρμογές αυτές αφορούν κυρίως τον εντοπισμό ναρκωτικών ουσιών. Επίσης δημιουργήθηκαν βάσεις δεδομένων για τοξικολογικές ουσίες σε βιολογικά υγρά (όπως παράνομα και θεραπευτικά φάρμακα και οι μεταβολίτες τους, περιβαλλοντικά δηλητήρια κ.λπ.).<sup>33</sup>

## 2.5 Ανάλυση υπολειμμάτων πυρκαγιάς με φασματομετρία μάζας συζευγμένη με αέρια χρωματογραφία (GC-MS)

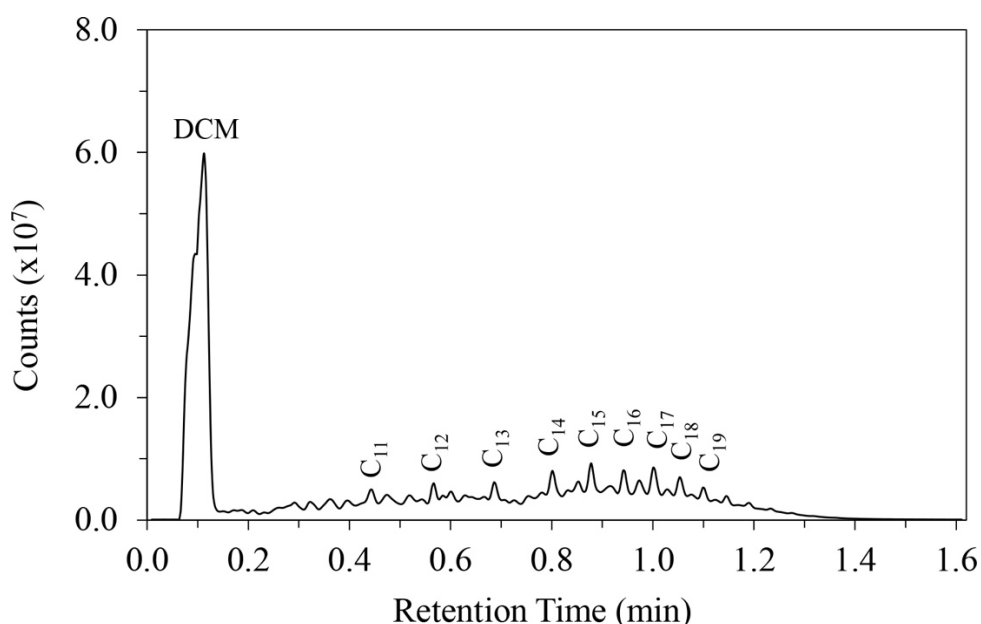
Η ανάλυση υπολειμμάτων εύφλεκτου υγρού είναι μια από τις πιο περιζήτητες αναλύσεις στα εγκληματολογικά εργαστήρια. Κατά την ανάλυση, τα χρωματογραφικά προφίλ που λαμβάνουμε, συγκρίνονται οπτικά με χρωματογραφήματα αναφοράς κοινών εύφλεκτων υγρών. Τα εύφλεκτα υγρά χρησιμοποιούνται συχνά για να αυξήσουν την ταχύτητα και την εξάπλωση των πυρκαγιών και η παρουσία



υπολειμμάτων εύφλεκτων υγρών σε δείγματα συντριμμιών πυρκαγιάς μπορεί να είναι χρήσιμη για τον προσδιορισμό της εμπρηστικής ενέργειας. Έχουν αναπτυχθεί διάφορες αναλυτικές μέθοδοι για τον έλεγχο και την αναγνώριση εύφλεκτων υγρών, πολλές από τις οποίες χρησιμοποιούν αυτόνομες φασματομετρικές μεθόδους. Τα τελευταία χρόνια όμως χρησιμοποιούνται όλο και περισσότερο και οι γρήγορες χρωματογραφικές τεχνικές, ως εργαλείο διαλογής για διάφορα δείγματα, ειδικά για εγκληματολογικές εφαρμογές. Ο διαχωρισμός που προσφέρουν είναι επαρκής για τον προκαταρκτικό έλεγχο δειγμάτων. Αρχικά βενζίνη και καύσιμο diesel υποβλήθηκαν σε ταχεία ανάλυση GC-MS για να εκτιμηθεί η ικανότητα ταυτοποίησης τους. Τα δείγματα αναλύθηκαν χρησιμοποιώντας τη βελτιστοποιημένη μέθοδο με επικύρωση με GC-MS. Οι ενώσεις χαρακτηριστικές της βενζίνης αναγνωρίστηκαν χρησιμοποιώντας απλή επιλογή κορυφής (εικόνα 14). Με την ίδια ανάλυση ταυτοποιήθηκαν επίσης και οι κύριες ενώσεις στο καύσιμο ντίζελ (εικόνα 15).<sup>34</sup>



Εικόνα 15: Το χρωματογράφημα της βενζίνης, <https://chemrxiv.org/engage/chemrxiv/article-details/62701711ef2adefa4145e29a>



Εικόνα 16: Το χρωματογράφημα του καυσίμου ντίζελ, <https://chemrxiv.org/engage/chemrxiv/article-details/62701711ef2adefa4145e29a>



Στη συνέχεια αναλύθηκαν δείγματα από τεχνητά συντρίμμια πυρκαγιάς. Αυτά ήταν τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα οικοδομικά υλικά δηλαδή χαλί, ημιτελές ξύλο και ασταρωμένο ξύλο. Για κάθε δείγμα μια ποσότητα εύφλεκτου υγρού τοποθετήθηκε στο υπόστρωμα και στη συνέχεια αναφλεγόταν. Όλα τα δείγματα αφέθηκαν να καούν μέχρι την ολοκλήρωση. Στη συνέχεια έγινε η προκατεργασία αυτών των δειγμάτων προς ανάλυση. Κατά την προετοιμασία των δειγμάτων γίνεται εξαγωγή (εκχύλιση) συνήθως με την μέθοδο headspace extraction. Κατά την παθητική εξαγωγή χώρου γίνεται μετανάστευση πτητικών ενώσεων-στόχων στο προσροφητικό υλικό με διάχυση σε θερμοκρασίες περιβάλλοντος ή θερμαινόμενες θερμοκρασίες σε συγκεκριμένο χρονικό διάστημα. Ωστόσο για την εκχύλιση άγνωστων πτητικών ουσιών με αυτή τη μέθοδο απαιτείται πολύς χρόνος, έως και 24 ώρες. Προς εξοικονόμηση χρόνου, πολλές φορές γίνεται θέρμανση των δειγμάτων σε φούρνους κατά τη διάρκεια της νύχτας. Στη συνέχεια της ανάλυσης τα δείγματα θερμάνθηκαν στους 80°C και μετά αφέθηκαν να κρυώσουν σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια αναλύθηκαν διπλά αντίγραφα όλων των δειγμάτων με ταχεία και παραδοσιακή GC-MS. Γενικά η συγκεκριμένη ανάλυση είναι χρονοβόρα και απαιτεί ως 30 λεπτά οπότε γίνονται προσπάθειες εύρεσης τεχνικών που απαιτούν λιγότερο χρόνο και θα το συζητήσουμε ξανά στις φασματοσκοπικές τεχνικές. Με την ίδια διαδικασία αναλύθηκαν επίσης άκαυστα υποστρώματα χωρίς εύφλεκτα υγρά.<sup>34</sup>

## Κεφάλαιο 3

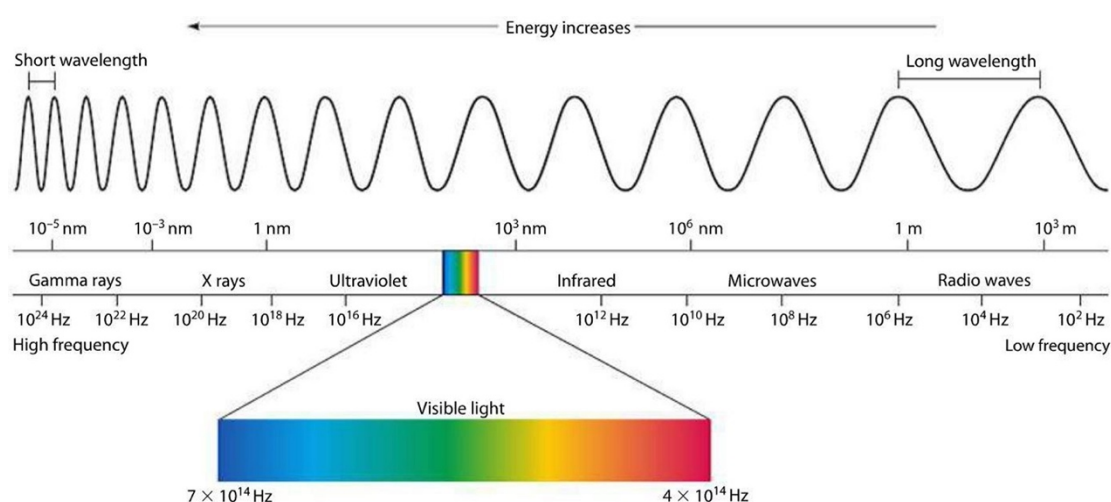
### Φασματοσκοπικές τεχνικές

#### 3.1 Εισαγωγή

Φασματοσκοπία είναι ο όρος που αναφέρεται και περιγράφει τις αλληλεπιδράσεις της ακτινοβολίας με την ύλη. Οι φασματοσκοπικές τεχνικές μετρούν την ένταση αυτής της ακτινοβολίας και αποτελούν βασικό εργαλείο της χημικής ανάλυσης καθώς συνδράμουν εκτός των άλλων και στον προσδιορισμό και την ταυτοποίηση της μοριακής δομής. Η συχνότερα χρησιμοποιούμενες τεχνικές αναφέρονται στην ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία. Όμως κάποιες βασίζονται σε άλλες μορφές ακτινοβολίας όπως οι ακτίνες  $\chi$  και  $\gamma$  αλλά και η υπεριώδης ακτινοβολία. Διακρίνουμε την ατομική και την μοριακή φασματοσκοπία, ανάλογα αν μελετάμε άτομα ή μόρια. Φαινόμενα που μελετώνται κατά τις τεχνικές αυτές είναι η απορρόφηση ακτινοβολίας, εκπομπή ακτινοβολίας, φθορισμός, φωσφορισμός, σκέδαση, χημειοφωταύγεια. Να τονίσουμε πως ως οπτικές τεχνικές αναφέρονται αυτές που αφορούν την ορατή ακτινοβολία αλλά και την υπεριώδη και την υπέρυθη, με μήκη κύματος  $10^{-8}$ - $10^{-3}$  m (εικόνα 16).<sup>35</sup>

Η ηλεκτρομαγνητική (ΗΜ) ακτινοβολία περιγράφεται ως δύο ταλαντούμενα, σε φάση ηλεκτρικά και μαγνητικά πεδία κάθετα μεταξύ τους, που προκαλούν τη διάδοση ενός κύματος, μεταφέροντας ενέργεια. Το κύμα είναι κάθετο και στα δύο πεδία και ταξιδεύει σε ευθεία γραμμή εκτός αν ανακλάται ή διαθλάται. Όλη η ακτινοβολία ταξιδεύει με την ταχύτητα του φωτός, σε κενό. Από την σκοπιά της κβαντομηχανικής, η ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία αναφέρεται ως ένα ρεύμα φωτονίων ή πακέτων ενέργειας. Τα φωτόνια μπορούν να προωθήσουν ένα άτομο ή μόριο σε διεγερμένη κατάσταση, ηλεκτρονική, δονητική κ.λπ., που έχει ως αποτέλεσμα την απορρόφηση, την εκπομπή ή την σκέδαση καθώς το άτομο/μόριο

επιστρέφει στη βασική κατάσταση. Για να συμβεί αυτό, το ενεργειακό χάσμα μεταξύ της θεμελιώδους κατάστασης και της διεγερμένης κατάστασης πρέπει να ταιριάζει με το μήκος κύματος της προσπίπτουσας ακτινοβολίας, δηλαδή να είναι κβαντισμένη. Τα μεγέθη στα οποία αναφερόμαστε κατά την μελέτη της ΗΜ ακτινοβολίας είναι το μήκος κύματος (η απόσταση μεταξύ των κορυφών δύο κυμάτων, μετριέται σε cm, μm ή nm), η συχνότητα (δηλαδή ο αριθμός των κυμάτων που διέρχονται από ένα σταθερό σημείο σε ένα δεδομένο χρονικό διάστημα, μετριέται σε Hz ) και η ενέργεια που μετράται σε J ή eV. Το ηλεκτρομαγνητικό φάσμα είναι το εύρος των συχνοτήτων ακτινοβολίας από περίπου  $10^3$  έως  $10^{20}$  Hz και συχνά ταξινομείται σε περιοχές συχνοτήτων ή μηκών κύματος (εικόνα 16).<sup>35</sup>



Εικόνα 17: φάσμα ΗΜ ακτινοβολίας, <https://www.miniphysics.com>

Η ακτινοβολία χαμηλής ενέργειας προκαλεί μικρές αλλαγές σε ένα μόριο, π.χ. κατεύθυνση πυρηνικής στροφορμής (spin) στο πυρηνικό μαγνητικό Συντονισμό (NMR), η οποία χρησιμοποιεί ραδιοκύματα. Η επόμενη περιοχή είναι τα μικροκύματα, που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη μέτρηση της περιστροφικής ενέργειας των μορίων στα αέρια με περιστροφική φασματοσκοπία. Η φασματοσκοπία IR και η φασματοσκοπία Raman αφορούν, κυρίως, τη δονητική ενέργεια ενός μορίου στην περιοχή IR. Η φασματοσκοπία UV-Vis μετρά τη μοριακή ή ηλεκτρονική διέγερση σθένους. Η ακτίνες χ ανιχνεύονται μετά από εσωτερικές ηλεκτρονικές μεταβάσεις χρησιμοποιώντας: φασματομετρία ακτίνων X διασποράς ενέργειας (EDX) ή φασματομετρία ακτίνων X με διασπορά μήκους κύματος (WDX), οι οποίες σε ένα εγκληματολογικό πλαίσιο συνήθως συνδέονται με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης (SEM). Η ακτινοβολία υψηλής ενέργειας μπορεί να προκαλέσει αλλαγές στη διαμόρφωση του πυρήνα όπως στην φασματοσκοπία ακτίνων  $\gamma$ . Ένα από τα πλεονεκτήματα των φασματοσκοπικών/φασματομετρικών τεχνικών για την εγκληματολογία είναι ότι δεν είναι καταστροφικές για το δείγμα και απαιτούν μικρή προετοιμασία δείγματος.

### 3.2 Φασματοσκοπία μοριακών μαζών MS

Η φασματομετρία μάζας είναι ένα από τα πιο ισχυρά αναλυτικά εργαλεία που διαθέτει η ιατροδικαστική επιστήμη. Τα όργανα επιτρέπουν την επιλεκτική μέτρηση του λόγου μάζας προς φορτίο ( $m/z$ ) από το οποίο μπορούμε να προσδιορίσουμε το μοριακό βάρος μιας ένωσης και στη συνέχεια να πάρουμε πληροφορίες ως προς την

ταυτότητά του. Στην εγκληματολογική επιστήμη συνδέεται συχνά με μια χρωματογραφική τεχνική, συνήθως GC ή LC, η οποία προσθέτει μια δεύτερη διάσταση διαχωρισμού, διευκολύνοντας την ανάλυση πιο περίπλοκων τύπων δειγμάτων. Η τεχνική μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό της ατομικής σύνθεσης αλλά και της μοριακής δομής μιας ένωσης. Εκτός των εγκλημάτων και των αδικημάτων που σχετίζονται με τα ναρκωτικά, χρησιμοποιείται ευρέως για την ανάλυση εκρηκτικών και καυσίμων για να βοηθήσει σε εφαρμογές που σχετίζονται με την παρακολούθηση τρομοκρατικών δραστηριοτήτων και εμπρησμών. Άλλη μια εφαρμογή της MS αφορά την ανάλυση ιχνοστοιχείων, ιδιαίτερα σε χρώματα, μελάνια και βαφές. Επίσης τα ατυχήματα οχημάτων μπορούν να διερευνηθούν με ανάλυση γυαλιού και χρωμάτων με χρήση της MS. Τέλος έγγραφα και πίνακες μπορούν να αναλυθούν για παράνομες δραστηριότητες αναλύοντας τις βαφές που χρησιμοποιούνται στα μελάνια και βαφές και δημιουργώντας το χημικό προφίλ για πιθανές ταυτοποιήσεις.

### 3.2.1 Αρχή μεθόδου

Η φασματομετρία μάζας (MS) είναι μια αναλυτική τεχνική κατά την οποία διαχωρίζονται ιονισμένα σωματίδια (π.χ. άτομα, μόρια και συστάδες) , χρησιμοποιώντας διαφορές στους λόγους των φορτίων τους προς τις αντίστοιχες μάζες τους (μάζα/φορτίο,  $m/z$  ). Βασίζεται στην παραγωγή δέσμης ιοντικών θραυσμάτων που προκύπτει από τον βομβαρδισμό των εξεταζόμενων μορίων με ηλεκτρόνια υψηλής ενέργειας. Όταν ένα ηλεκτρόνιο υψηλής ενέργειας προσπίψει σε ένα ουδέτερο μόριο ή άτομο, το ηλεκτρόνιο εκτρέπεται (λόγω μαγνητικού πεδίου) μεταβιβάζοντας παράλληλα μεγάλο μέρος της ενέργειάς του στο μόριο. Το μόριο αυτό ιονίζεται αποβάλλοντας ένα ηλεκτρόνιο και αποκτά θετικό φορτίο. Τα θραύσματα που παράγονται στη συνέχεια διαχωρίζονται με εφαρμογή ηλεκτρικού ή μαγνητικού πεδίου ή με συνδυασμό και των δύο. Ο διαχωρισμός βασίζεται στον διαφορετικό λόγο μάζας προς φορτίο ( $m/z$ ) κάθε ιοντικού θραύσματος. Το φάσμα που λαμβάνουμε αφορά την απεικόνιση της αφθονίας των ανιχνευθέντων ιόντων προς το λόγο μάζας φορτίου. Στον οριζόντιο άξονα έχει το λόγο μάζας/φορτίου και στον κατακόρυφο την ένταση του λαμβανόμενου σήματος. Το ιόν σε μεγαλύτερη αφθονία δίνει την υψηλότερη κορυφή του φάσματος (μητρική κορυφή). Οι μάζες από την θραυσματοποίηση των μοριακών ιόντων σε ιόντα μικρότερης ενέργειας επίσης καταγράφονται στο φάσμα. Τα όργανα MS αποτελούνται από τα ακόλουθα μέρη: <sup>36</sup>

- ⇒ μια πηγή ιόντων, η οποία μετατρέπει τα μόρια του δείγματος σε ιόντα (ιονισμός)
- ⇒ έναν αναλυτή μάζας, ο οποίος διαχωρίζει τα ιόντα ανάλογα με τις μάζες τους εφαρμόζοντας ηλεκτρομαγνητικά πεδία
- ⇒ έναν ανιχνευτή για μέτρηση της τιμής μιας ποσότητας δείκτη, που παρέχει δεδομένα για τον υπολογισμό της αφθονίας κάθε ιόντος που υπάρχει
- ⇒ έναν υπολογιστή, ο οποίος ρυθμίζει τον αναλυτή μάζας και διαχειρίζεται τα δεδομένα που λαμβάνονται από τον ανιχνευτή

Η ονομαστική μάζα ενός ιόντος ή μορίου είναι η μάζα του πιο άφθονου ισοτόπου κάθε στοιχείου στρογγυλεμένη στον πλησιέστερο ακέραιο. Η ακριβής μάζα είναι η υπολογισμένη μάζα ενός ιόντος ή μορίου που προσδιορίζεται γνωρίζοντας την

ισοτοπική σύνθεση και την κατάσταση φορτίου (θεωρητική μάζα). Ακρίβεια μάζας είναι η μετρούμενη, πειραματική μάζα του ιόντος ή του μορίου και καθορίζεται από την ακρίβεια του αναλυτή μάζας. Το λαμβανόμενο φάσμα μάζας θα πρέπει να σχολιάζεται είτε με την ονομαστική είτε με την ακριβή μάζα μέσω της κατάλληλης χρήσης σημαντικών αριθμών που σχετίζονται με τον βαθμό ακρίβειας του αναλυτή μάζας.<sup>36</sup>

### Ιονισμός

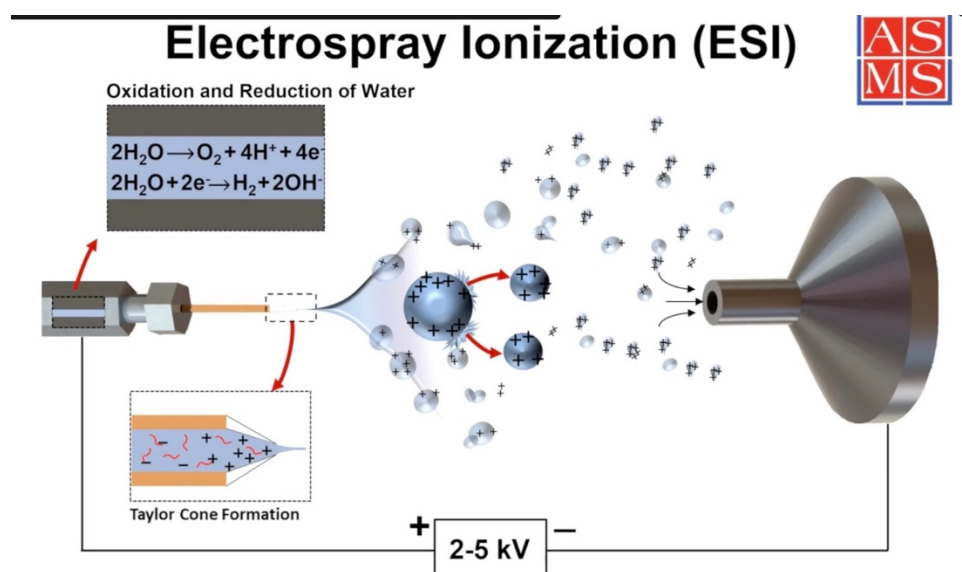
Το πρώτο στάδιο μια ανάλυσης MS είναι ο σχηματισμός των ιόντων του αέριου αναλύτη. Οι πηγές ιόντων που χρησιμοποιούνται σε αυτό το στάδιο μπορεί να είναι αέριας φάσης (εξαέρωση και μετά ιονισμός) ή εκρόφησης (δείγμα σε στερεή ή υγρή κατάσταση που μετατρέπεται απευθείας σε αέρια ιόντα). Οι ενώσεις του δείγματος μετατρέπονται σε αέρια ιόντα μετά από βομβαρδισμό με ηλεκτρόνια φωτόνια ιόντα ή μόρια, με θερμική ή με ηλεκτρική ενέργεια.

Μια από τις πιο συχνά χρησιμοποιούμενες τεχνικές ιονισμού είναι ο *ιονισμός εκρόφησης με τη βοήθεια υλικού μήτρας MALDI*. Παρέχεται η δυνατότητα ανάλυσης βιοπολυμερών, τα οποία έχουν μεγάλο μοριακό βάρος ως αρκετές εκατοντάδες χιλιάδες Dalton. Μια χαμηλή συγκέντρωση αναλύτη διεσπαρμένου σε μια μήτρα, τοποθετείται σε ένα ανοξείδωτο σύρμα ή μια μεταλλική πλάκα. Αυτή τοποθετείται σε θάλαμο κενού και εστιάζεται στο δείγμα μια δέσμη λέιζερ. Η μήτρα πρέπει να απορροφά την δέσμη και η μήτρα με τον αναλύτη πρέπει να εκροφούνται και να ιονίζονται δημιουργώντας νέφος ιόντων. Η μήτρα η οποία αποτελείται από κρυσταλλωμένα μόρια χρησιμοποιείται για την προστασία των βιομορίων από την καταστροφή από την άμεση δέσμη λέιζερ και για τη διευκόλυνση της εξάτμισης και του ιονισμού. Μια κατάλληλη επιλογή της μήτρας είναι επίσης κρίσιμη για τη λήψη καλών φασμάτων μάζας. Κάποιες από τις συνηθέστερες μήτρες είναι οι νιτροπυριδίνες (π.χ νικοτινικό οξύ), τα παράγωγα βενζοϊκού οξέος (βανιλλικό οξύ, αμινοβενζοϊκό οξύ), τα παράγωγα κινναμωμικού οξέος (καφφεϊκό οξύ, σιναπινικό οξύ, ηλεκτρικό οξύ). Η συνηθέστερη προετοιμασία δείγματος που ακολουθείται είναι η τεχνική ξηρής σταγόνας όπου μια σταγόνα μήτρας που περιέχει  $\mu\text{M}$  του αναλύτη τοποθετείται σε μια πλάκα και αφήνεται να ξεραθεί.<sup>37</sup>

Άλλος ένας τρόπος ιονισμού που χρησιμοποιείται ευρέως είναι ο ιονισμός με *ηλεκτροψεκασμό (ESI)*. Χρησιμοποιείται για μετρήσεις βιομορίων όπως πολυπεπτίδια, πρωτεΐνες και ολιγονουκλεοτίδια με μοριακά βάρη πάνω από 100.000 Da, αλλά και για τον χαρακτηρισμό συνθετικών πολυμερών. Ο μηχανισμός του ESI περιλαμβάνει την παραγωγή ενός λεπτού αερολύματος ή ομίχλης, σε ατμοσφαιρική πίεση, που εξατμίζεται γρήγορα λόγω της αύξησης της επιφάνειας που δημιουργείται από το σχηματισμό αερολύματος. Το διάλυμα του δείγματος αντλείται μέσω μιας ανοξείδωτης τριχοειδούς βελόνας με ταχύτητα μερικών  $\mu\text{L}/\text{min}$ . Η βελόνα βρίσκεται σε δυναμικό (kV) ως προς ένα κυλινδρικό ηλεκτρόδιο που την περιβάλλει. Οι φορτισμένες σταγόνες που δημιουργούνται διέρχονται μέσω ενός τριχοειδούς όπου ο διαλύτης εξατμίζεται και φορτίζονται τα μόρια του αναλύτη. Οι σταγόνες μικραίνουν λόγω της εξαέρωσης του διαλύτη και αυξάνεται η πυκνότητα φορτίου μέχρι ένα όριο (όριο Rayleigh) στο οποίο δεν μπορεί η επιφανειακή τάση να υποστηρίξει το φορτίο.

Στο σημείο αυτό συμβαίνει μια κουλομβική έκρηξη και η σταγόνα διασπάται σε μικρότερες. Αυτές οι σταγόνες επαναλαμβάνουν τη διαδικασία μέχρι την πλήρη

απομάκρυνση όλου του διαλύτη από τον αναλύτη, δημιουργώντας ένα πολλαπλά φορτισμένο μόριο αναλύτη (εικόνα 17).<sup>38</sup>

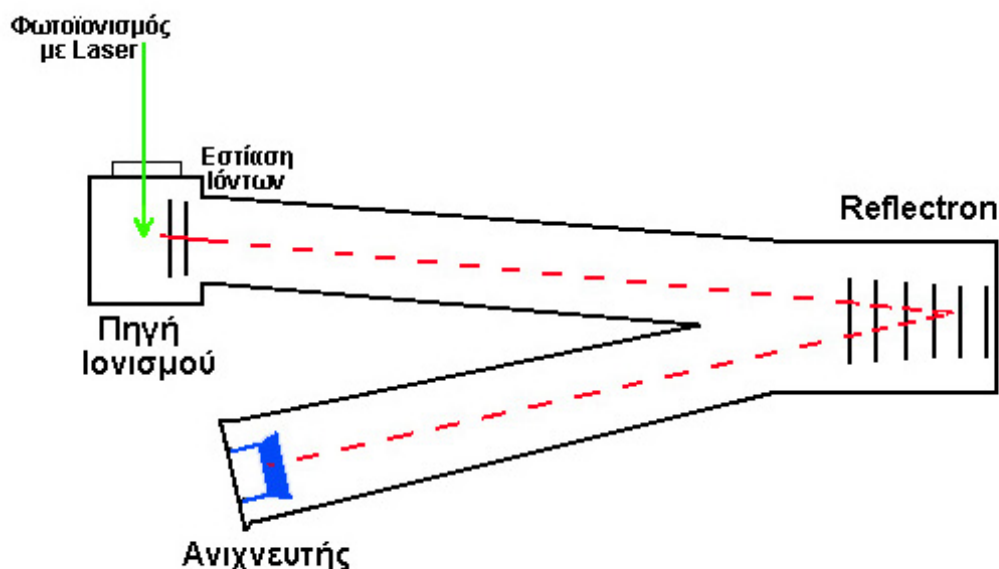


Εικόνα 11: American society for mass spectrometry <https://www.asms.org/about-mass-spec/basics-of-mass-spectrometry>

Για να βοηθηθεί αυτή η διαδικασία αποδιάλυσης η πηγή θερμαίνεται και συχνά μια επιπλέον ροή αδρανούς αερίου (π.χ άζωτο) προστίθεται ομόκεντρα γύρω από τη βελόνα. Οι πηγές ελεγχόμενης θερμοκρασίας έχουν σχεδιαστεί για να θερμαίνουν ή να ψύχουν την αναλυόμενη ουσία σε διάλυμα πριν από τον ψεκασμό. Αυτό παρέχει ένα «στιγμιότυπο» των διαμορφώσεων που υιοθετεί η αναλυόμενη ουσία σε διάλυμα για μια δεδομένη θερμοκρασία. Εκτελώντας τις μετρήσεις σε ένα εύρος θερμοκρασιών, μπορούν να προσδιοριστούν τα θερμοδυναμικά χαρακτηριστικά ενός βιομορίου, όπως η θερμοκρασία τήξης. Όμως θα πρέπει να συζητηθούν οι επιπτώσεις της θερμοκρασίας στη διαδικασία ηλεκτροψεκασμού. Τα βιομόρια στο διάλυμα αποδιαλύονται αφού ψεκαστούν με ESI ακολουθώντας διαφορετικές οδούς. Για παράδειγμα, για τις διπλωμένες πρωτεΐνες, ο διαλύτης εξατμίζεται γύρω τους και τελικά μόνο τα εκτεθειμένα ιονιζόμενα αμινοξέα στην επιφάνεια των πρωτεϊνών διατηρούν ένα φορτίο (μοντέλο υπολειμμάτων φορτίου), αντίστροφα, οι μετουσιωμένες πρωτεΐνες εκτοξεύονται από το σταγονίδιο ως αλυσίδα και τα ιονιζόμενα αμινοξέα στην αλυσίδα αποκτούν φορτίο (μοντέλο εξώθησης αλυσίδας). Οι μερικώς διπλωμένες πρωτεΐνες έχουν προταθεί να ακολουθούν έναν ενδιάμεσο μηχανισμό αποδιάλυσης (μοντέλο μερικής εξώθησης). Δεδομένου ότι ο αριθμός των φορτίων που φέρει μια πρωτεΐνη εξαρτάται από το πόσο διπλωμένη/σφαιρική είναι σε διάλυμα, η μέση κατάσταση φόρτισής της, όπως μετράται από το MS, μπορεί επομένως να χρησιμοποιηθεί για να εκτιμηθεί πόσο διπλωμένη ήταν στο διάλυμα. Η κατανομή της κατάστασης φορτίου μπορεί επομένως να χρησιμοποιηθεί ως αντιπρόσωπος για την φυσική έναντι της μετουσιωμένης κατάστασης των βιομορίων.<sup>38</sup>

## Αναλυτές

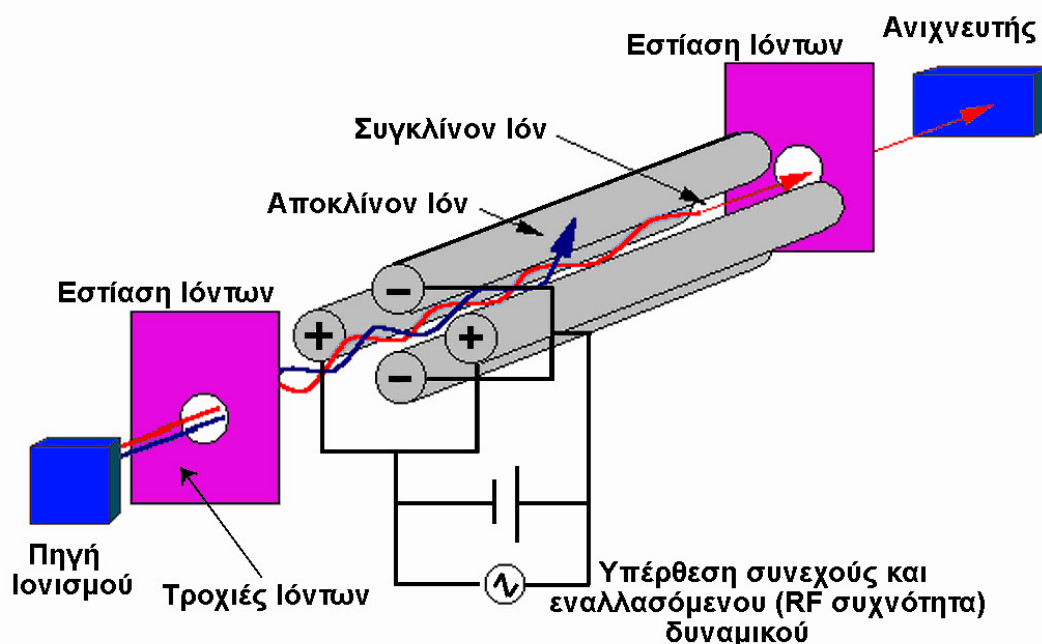
Από την πηγή ιόντων εξέρχεται ένα ρεύμα θετικών ή αρνητικών ιόντων που επιταχύνονται προς τον αναλυτή και ταξινομούνται με βάση του λόγου  $m/z$ . Ένας από τους πιο συχνά χρησιμοποιούμενους είναι ο αναλυτής χρόνου πτήσης TOF. Τα θετικά ιόντα παράγονται περιοδικά μετά από βομβαρδισμό του δείγματος με παλμούς ηλεκτρονίων, δευτερογενών ιόντων ή φωτονίων ακτινοβολίας λέιζερ. Τα παραγόμενα αυτά ιόντα επιταχύνονται και διέρχονται μέσα από έναν σωλήνα πορείας (σωλήνα πτήσης) απαλλαγμένο από πεδία, σε κατάσταση υψηλού κενού, όλα με την ίδια κινητική ενέργεια (εικόνα 19). Το κενό χρειάζεται καθώς επιπλέον μόρια αερίου θα μπορούσαν να διασκορπίσουν τα ιόντα του δείγματος κατά τη διάρκεια της πτήσης. Διαχωρίζονται λοιπόν στον αναλυτή κενού ανάλογα με το χρόνο πτήσης και τα ελαφρύτερα ιόντα φτάνουν στους ανιχνευτές γρηγορότερα από τα βαρύτερα. Επομένως, ο χρόνος που χρειάζεται ένα ιόν για να φτάσει στον ανιχνευτή σε μια γνωστή απόσταση από την είσοδο στον αναλυτή μάζας μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό του  $m/z$  του.



Εικόνα 12: αναλυτής χρόνου πτήσης [https://tccc.iesl.forth.gr/AMS\\_EPEAEK/courses/LazPap/MSLab\\_AMS.htm](https://tccc.iesl.forth.gr/AMS_EPEAEK/courses/LazPap/MSLab_AMS.htm)

Συνήθως χρησιμοποιείται και το ανακλαστικό (reflectron). Αλλάζει τη διαδρομή πτήσης των ιόντων αντανakλώντας τα από την αρχική τους κατεύθυνση ταξιδιού πίσω προς έναν ανιχνευτή χρησιμοποιώντας ηλεκτροστατικό πεδίο. Αυτό αντισταθμίζει περαιτέρω οποιαδήποτε διακύμανση της κινητικής ενέργειας καθώς ιόντα της ίδιας μάζας με μεγαλύτερες ενέργειες (και συνεπώς ταχύτερες) διεισδύουν βαθύτερα στο ανακλαστήρα και επομένως έχουν ελαφρώς μεγαλύτερη διαδρομή πτήσης σε σύγκριση με χαμηλότερη ενέργεια. Τα όργανα δεν υποβάλλονται σε σάρωση για να επιτευχθεί το απαιτούμενο εύρος μάζας. Αυτό καθιστά τη λειτουργία τους πολύ πιο γρήγορη στην απόκτηση φασμάτων σε σχέση με τους αντίστοιχους αναλυτές σάρωσης. Επιπλέον ανάλογα με το μέγεθος του σωλήνα πτήσης, τα όργανα TOF μπορούν να έχουν πολύ υψηλές δυνάμεις ανάλυσης και αυτό επιτρέπει ακριβείς μετρήσεις μάζας παρόμοιες με αυτές ενός οργάνου τομέα. Τέλος είναι ανθεκτικοί, με απλή κατασκευή και χρησιμοποιούνται για μεγάλο εύρος μαζών. Το πλεονέκτημα τους είναι η μικρή διακριτική ικανότητα και η μικρότερη επαναληψιμότητα.<sup>39</sup>

Η άλλη πιο κοινά χρησιμοποιούμενη κατηγορία ανιχνευτών είναι οι *τετραπολικοί αναλυτές μαζών*. Αποτελούνται από τέσσερις παράλληλες κυκλικές μεταλλικές ράβδους έτσι ώστε το ηλεκτρικό πεδίο μεταξύ τους να είναι υπερβολικό (εικόνα 20). Ένα δυναμικό ηλεκτρικό πεδίο δημιουργείται με την εφαρμογή μιας ραδιοσυχνότητας (RF), με διαφορά φάσης 180 μοίρες ανα ζεύγη ράβδων. Κάθε ζεύγος αντίθετων ράβδων τροφοδοτείται επίσης με συνεχές ρεύμα (DC) ίσου μεγέθους αλλά αντίθετης πολικότητας σε σχέση με τη γείωση. Το ηλεκτρικό πεδίο που δημιουργείται στον αναλυτή μάζας λειτουργεί ως φίλτρο, δεδομένου ότι επιτρέπει μόνο σε ιόντα ορισμένων μαζών («ιόντα συντονισμού») να περάσουν από το κενό μεταξύ των τεσσάρων ράβδων, δηλαδή το τετράπολο είναι ένα φίλτρο φόρτισης μάζας. Τα ιόντα με διαφορετικές τιμές  $m/z$  (ιόντα χωρίς συντονισμό) θα συγκρουστούν με τις ράβδους και θα εξουδετερωθούν. Με αύξηση των τάσεων DC και RF, σταθερές τροχιές για ιόντα διαφορετικών τιμών  $m/z$  περνούν στον ανιχνευτή. Οι μικροί χρόνοι σάρωσης αποτελούν πλεονέκτημα του τετράπολου, σε συνδυασμό με το μικρό κόστος τους και την ανθεκτικότητά τους.



Εικόνα 20: τετραπολικοί ανιχνευτές μαζών  
[https://tccc.iesl.forth.gr/AMS\\_EPEAEK/courses/LazPap/MSLab\\_AMS.htm](https://tccc.iesl.forth.gr/AMS_EPEAEK/courses/LazPap/MSLab_AMS.htm)

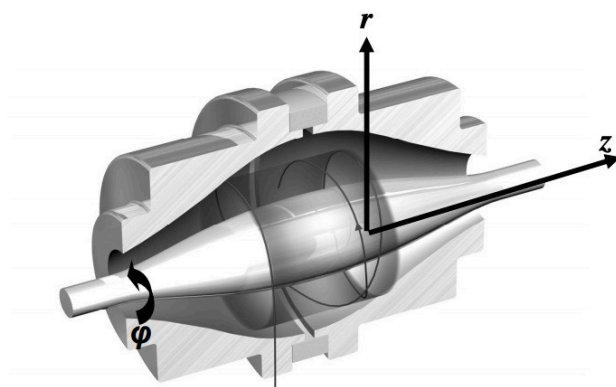
Άλλοι αναλυτές που χρησιμοποιούνται είναι οι ανιχνευτές *μαγνητικού τομέα* (ή *αλλιώς απλής εστίασης*), οι οποίοι διαθέτουν έναν μόνιμο μαγνήτη ή έναν ηλεκτρομαγνήτη, με πεδίο που αναγκάζει τα ιόντα μετά την έξοδο τους από την πηγή, να κινούνται σε μια κυκλική τροχιά 60°, 90°, 120°. Το μεγάλο κόστος τους, ο μεγάλος όγκο αλλά και η αδυναμία σύζευξής τους με άλλες πηγές ιονισμού, τους καθιστά λιγότερο χρησιμοποιούμενους. Έτσι είναι απίθανο τέτοιου είδους όργανα να συναντηθούν στο εγκληματολογικό εργαστήριο.



Επίσης οι αναλυτές παγίδας ιόντων αποτελούν μια διάταξη στην οποία δημιουργούνται ανιόντα ή κατιόντα σε αέρια κατάσταση με ένα ηλεκτρικό ή μαγνητικό πεδίο. Αποτελούν φθηνά όργανα με χαμηλά όρια ανίχνευσης. Τα ιόντα παγιδεύονται μεταξύ των τριών ηλεκτροδίων (δυο πλευρικών και ενός δακτυλοειδούς) μέσω ενός επαγόμενου ηλεκτρικού πεδίου που δημιουργείται από ένα συνεχές (DC) και ένα εναλλασσόμενο (AC) ρεύμα. Τα ιόντα πραγματοποιούν ταλάντωση στον οριζόντιο άξονα και με την εφαρμογή τάσης υψηλής συχνότητας, αυξάνεται το πλάτος της ταλάντωσης. Έτσι εκτοξεύονται έξω από την παγίδα πρώτα τα ιόντα με μικρότερο λόγο  $m/z$  και κατευθύνονται προς τον ανιχνευτή όπου καταγράφονται τα φάσματα μαζών. Μια άλλη παρόμοια κατηγορία αναλυτών είναι τα όργανα με μετασχηματισμό Fourier. Μόλις παγιδευτούν τα ιόντα διεγείρονται στη συνέχεια με την εφαρμογή ενός παλμού ραδιοσυχνοτήτων που τα κάνει να κινούνται σε μια συνεκτική τροχιακή κίνηση γνωστή ως συχνότητα κυκλοτρονίων. Τα ιόντα επάγουν φορτίο στα τοιχώματα των πλακών δέκτη και στη συνέχεια μπορεί να μετρηθεί η συχνότητα της κίνησής τους. Μετρώντας αυτή τη συχνότητα, οι τιμές  $m/z$  μπορούν να υπολογιστούν εφαρμόζοντας έναν μετασχηματισμό Fourier και μετατρέποντας το πεδίο χρόνου σε  $m/z$ .<sup>40</sup>

Ωστόσο είναι απίθανο να χρησιμοποιηθεί τέτοιου είδους όργανο στα εγκληματολογικά εργαστήρια καθώς έχουν πολύ υψηλό κόστος και τα όργανα Orbitrap μπορούν να επιτύχουν παρόμοια ανάλυση με ακρίβεια και με πολύ φθηνότερο κόστος. Είναι επίσης μικρότερα και δεν απαιτούν μαγνήτη και κρυογόνο. Το φασματομέτρο μάζας orbitrap είναι η πιο πρόσφατη εξέλιξη σε συσκευές παγίδευσης που χρησιμοποιούνται ως αναλυτής  $m/z$ . Αποτελείται από δύο ηλεκτρόδια με τη μορφή ομοαξονικών συμμετρικών ηλεκτροδίων, μια εξωτερική επιφάνεια σε σχήμα κώνου και ένα εσωτερικό ηλεκτρόδιο σε σχήμα ατράκτου. Τα ιόντα εγχέονται στον χώρο μεταξύ του εξωτερικού και του εσωτερικού ηλεκτροδίου και αρχίζουν να περιφέρονται γύρω από την άτρακτο λόγω της ισορροπίας μεταξύ των ηλεκτροστατικών και φυγόκεντρων δυνάμεων. Τα ιόντα εγχέονται στο Orbitrap και ακολουθούν μια κυκλική τροχιά γύρω από το ηλεκτρόδιο της ατράκτου και μεταξύ του εξωτερικού ηλεκτροδίου. Το σχήμα του εξωτερικού ηλεκτροδίου της κώνου και το επαγόμενο πεδίο αναγκάζουν τα ιόντα να ταλαντώνονται σαν εκκρεμές. Η συχνότητα αυτής της ταλάντωσης εξαρτάται από τη μάζα και ανιχνεύεται ως σήμα πεδίου χρόνου και μετασχηματίζεται σε φάσμα μάζας χρησιμοποιώντας μετασχηματισμό Fourier παρόμοιο με το FT-ICR (εικόνα 21).<sup>41</sup>





**Figure 2-32B. Cutaway of the orbitrap mass analyzer. Ions are injected at an off-axis point with a velocity perpendicular to the z-axis.**  
Courtesy of Thermo Fisher Scientific.

Εικόνα 3: όργανο orbitrap μετασχηματισμού Fourier  
[https://spectrino.com/resources/mass\\_spec/Intro%20to%20Mass%20Spectrometry.pdf](https://spectrino.com/resources/mass_spec/Intro%20to%20Mass%20Spectrometry.pdf)

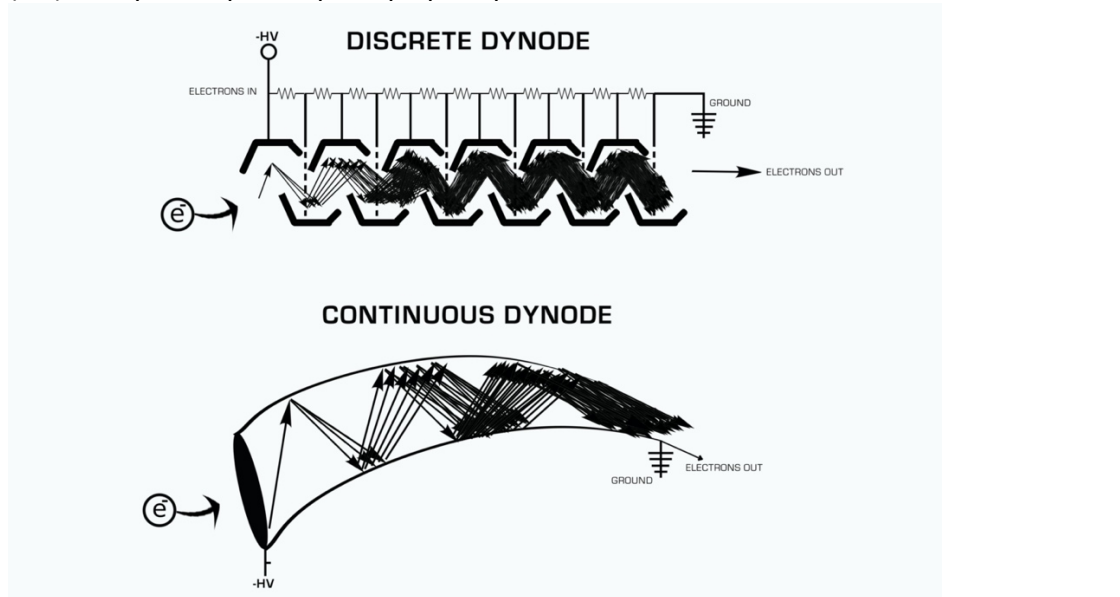
### Ανιχνευτές

Ο ανιχνευτής ή αλλιώς μεταλλάκτης σε ένα φασματόμετρο μάζας παρέχει πληροφορίες για την αφθονία ιόντων μετά την έξοδό τους από τον αναλυτή μάζας και μετατρέπει την ιοντική δέσμη σε ηλεκτρικό σήμα. Η καταγραφή του σήματος που λαμβάνουμε γίνεται συνήθως σε έναν ηλεκτρονικό υπολογιστή που διαθέτει το απαραίτητο λογισμικό. Η δέσμη των ιόντων μετατρέπεται σε ηλεκτρικό σήμα που μπορεί να ενισχυθεί, να αποθηκευτεί και αργότερα να εμφανιστεί από λογισμικό σε έναν υπολογιστή συνδεδεμένο στη μάζα φασματόμετρο. Το σήμα που λαμβάνεται συνήθως δεν είναι πολύ ισχυρό και χρειάζεται κάποια ενίσχυση. Η ανίχνευση βασίζεται πάντα στο φορτίο, τη μάζα ή την ταχύτητα του ιόντος (με εξαίρεση τα όργανα FT-ICR και Orbitrap). Υπάρχουν ηλεκτρονικές βιβλιοθήκες με φάσματα μαζών στα οποία έχουμε πρόσβαση μέσω εμπορικά διαθέσιμων υπολογιστικών συστημάτων.<sup>42</sup>

Οι ανιχνευτές που χρησιμοποιούνται συχνότερα με τα σύγχρονα φασματόμετρα μάζας περιλαμβάνουν δευτερογενή εκπομπή ηλεκτρονίων. Αυτό σημαίνει ότι η συσκευή ανίχνευσης έχει πεπερασμένη διάρκεια ζωής, η οποία εξαρτάται από τον αριθμό των ιόντων που προσκρούουν στη συσκευή.

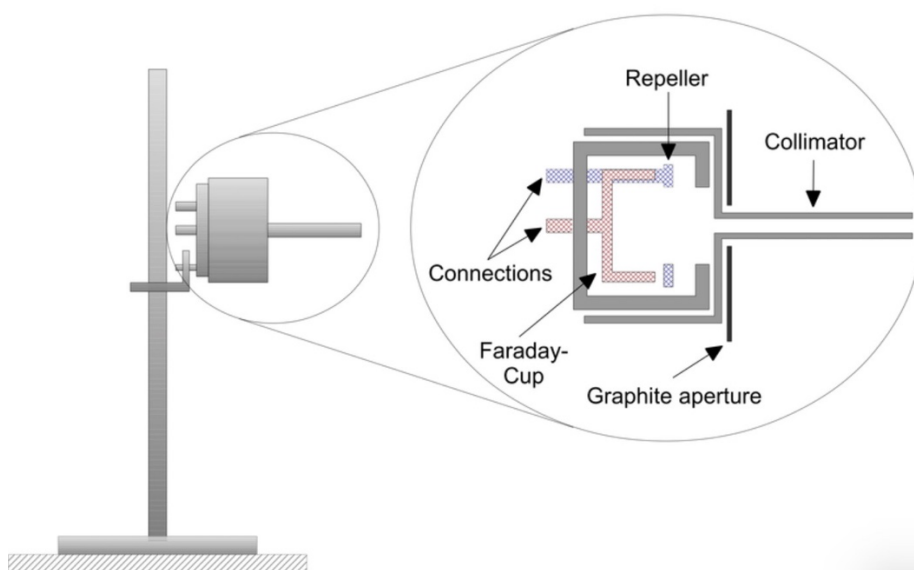
Αυτός ο ανιχνευτής είναι συχνότερα ένας ηλεκτρονιοπολλαπλασιαστής, αλλά χρησιμοποιείται για ανίχνευση και το κύπελλο Faraday (συνήθως χρησιμοποιείται για βαθμονόμηση άλλων αναλυτών), ή μια πλάκα μικροδιοδίων (σπάνια). Ο ηλεκτρονιοπολλαπλασιαστής διακριτών δυνοδών ανιχνεύει θετικά ιόντα. Κάθε δύνοδος έχει υψηλότερο δυναμικό από τον προηγούμενο. Οι δύνοδοι και η κάθοδος είναι από χαλκό και βηρύλλιο. Από αυτές τις επιφάνειες εκπέμπονται ριπές ηλεκτρονίων όταν προσκρούουν σε αυτές ιόντα ή ηλεκτρόνια μεγαλύτερων ενεργειών. Αυτά έλκονται στην επόμενη δύνοδο ως την τελευταία. Έτσι παράγεται μεγάλος αριθμός ηλεκτρονίων για κάθε ηλεκτρόνιο που φθάνει στην κάθοδο. Είναι αξιόπιστοι, ανθεκτικοί και παρέχουν υψηλή ενίσχυση ρεύματος. Ο πολλαπλασιαστής ηλεκτρονίων έχει καλή ακρίβεια και πολύ μεγαλύτερη ευαισθησία από το κλασικό κύπελλο Faraday. Ένας εναλλακτικός σχεδιασμός του πολλαπλασιαστή ηλεκτρονίων (EM) χρησιμοποιεί μια συνεχή δύναμη

(CD) από γυαλί εμποτισμένο με μόλυβδο.<sup>43</sup>



Εικόνα 22: ηλεκτρονιοπολλαπλασιαστές συνεχούς ή διακριτών δυναδών, [https://spectrino.com/resources/mass\\_spec/Intro%20to%20Mass%20Spectrometry.pdf](https://spectrino.com/resources/mass_spec/Intro%20to%20Mass%20Spectrometry.pdf)

Το κύπελλο Faraday αποτελείται από έναν κλωβό ο οποίος περιβάλλει ένα ηλεκτρόδιο στο οποίο προσπίπτουν τα ιόντα που εξέρχονται από τον αναλυτή. Το ηλεκτρόδιο έχει μια κλίση ώστε τα ηλεκτρόνια τα σωματίδια που προσπίπτουν ή εγκαταλείπουν το ηλεκτρόδιο να ανακλώνται προς τα τοιχώματα του κλωβού και όχι της εισόδου του. Το ηλεκτρόδιο και ο κλωβός συνδέονται με τη γείωση και η δημιουργούμενη πτώση τάσης κατά μήκος της αντίστασης είναι ενισχύεται με έναν ενισχυτή υψηλής εμπέδησης. Είναι φθηνός μεταλλάκτης με απλή λειτουργία, βασικό μειονέκτημά του όμως είναι η απαίτηση του ενισχυτή υψηλής εμπέδησης που περιορίζει την ταχύτητα σάρωσης του φάσματος. Επίσης είναι λιγότερο ευαίσθητος από τον ηλεκτρονιοπολλαπλασιαστή. Η απόκριση του κυπέλλου Faraday είναι ανεξάρτητη από την ενέργεια, τη μάζα ή τη χημική φύση των ιόντων.



Εικόνα 23: φαρανταϊκό κύπελλο [https://www.researchgate.net/figure/Structure-of-the-Faraday-probe-consisting-of-Faraday-cup-repeller-collimator-and\\_fig1\\_320404360](https://www.researchgate.net/figure/Structure-of-the-Faraday-probe-consisting-of-Faraday-cup-repeller-collimator-and_fig1_320404360)

Να τονίσουμε ότι πολλά όργανα HPLC είναι εξοπλισμένα με ανιχνευτές UV ή PDA που είναι λιγότερο δαπανηρά από τους ανιχνευτές MS. Επιπρόσθετα, η επιβεβαίωση των ευρημάτων σε υποθέσεις απαιτεί συχνά δύο ανεξάρτητα μέσα επιβεβαίωσης της παρουσίας μιας ουσίας σε ένα δείγμα και μερικές φορές η ροή της κινητής φάσης εκτρέπεται μέσω ενός φασματοφωτόμετρου UV, μιας μη καταστροφικής μεθόδου ανίχνευσης, μετά την οποία η ροή εισέρχεται στη μάζα φασματομέτρο. Αν και αυτό αυξάνει τον όγκο της επιπλέον στήλης και μπορεί να αυξήσει την πιθανότητα διεύρυνσης της ζώνης, η σωλήνωση που χρησιμοποιείται

καταλαμβάνει πολύ μικρό όγκο σε σχέση με τον συνολικό όγκο της στήλης και το πλεονέκτημα του. Το ανιχνευόμενο μήκος κύματος υπεριώδους ακτινοβολίας επιλέγεται σε σχέση με οποιουσδήποτε τροποποιητές κινητής φάσης που παρεμβαίνουν στα φάσματα απορρόφησης των ενώσεων και είναι σημαντικό τα αποτελέσματα της μήτρας να μελετώνται κατά την επικύρωση των μεθόδων.<sup>44</sup>

### *3.2.2 Διάκριση μελανιών από στυλό με αέρια χρωματογραφία συζευγμένη με φασματομετρία μάζας*

Η βασική χρησιμότητα αυτής της εφαρμογής αφορά απάτες με έγγραφα που απαιτείται η επιβεβαίωση της γνησιότητάς τους. Για το σκοπό αυτό απαιτείται η αναγνώριση της συγκεκριμένης σύνθεσης του μελανιού. Συγκρίνονται τα μελάνια των στυλό κατά την εξέταση των εγκληματολογικών αμφισβητούμενων εγγράφων λοιπόν, εάν οι εγγραφές προέρχονται από παρόμοια σύνθεση μελανιού.<sup>45</sup>

Τα μελάνια στυλογράφου αποτελούνται από πολύπλοκο μείγμα χημικών ενώσεων που είναι κοινά με προϊόντα που προσδίδουν χρώμα (για παράδειγμα, όξινες βαφές, άμεσες βαφές ή βασικές βαφές, θειικός σίδηρος (II) και έγχρωμες χρωστικές ανόργανης ή οργανικής φύσης) και πρόσθετα (για παράδειγμα, τασιενεργά, αντιοξειδωτικά, ρυθμιστές ιξώδους, γλυκόλη, γλυκερίνη και ρητίνες). τα συστατικά της βαφής είναι ευαίσθητα στο φως και αποικοδομούνται σταδιακά. Επομένως, η ανάλυση των χρωστικών ουσιών της βαφής μπορεί να δώσει σημαντικές πληροφορίες σχετικά με τη γήρανση του μελανιού. Τα συστατικά των μελανιών μπορεί να είναι τα υγρά (λάδι, διαλύτες, ρητίνες), η χρωματική ουσία (χρωστικές), άλλα συστατικά όπως πλαστικοποιητές (μειώνουν την ευθραυστότητα του μελανιού), κερί (ελέγχουν την σκληρότητα και την ευκαμψία του μελανιού), στεγνωτικά υλικά (συνήθως ανόργανα άλατα που ελέγχουν την ξήρανση του μελανιού) και επιφανειοδραστικά που επηρεάζουν την ικανότητα διαβροχής τους.<sup>46</sup>

Έχουν χρησιμοποιηθεί διάφορες αναλυτικές μέθοδοι για την εξέταση της σύστασης του μελανιού. Αν και η αέρια χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας (GC-MS) είναι μια καταστροφική τεχνική, έχει το πλεονέκτημα της τεράστιας αναγνώρισης προσαρμοστικότητας στην ευαισθησία των εγκληματολογικών μελανιών και η συγκεκριμένη χημική ανάλυση βοηθά στον χαρακτηρισμό των ρητινών και των διαλυτών συνδετικού μελανιού. Οι βαφές και τα θερμικά ασταθή ανθεκτικά συστατικά των μελανιών δημιουργούν συνήθως το φάσμα μάζας τους ως πρωτονιωμένα μόρια (μόρια που έλαβαν ένα πρωτόνιο και είναι θετικά φορτισμένα). Έχουν γίνει λίγες μελέτες που περιγράφουν τη μέθοδο αυτή για εγκληματολογική διάκριση μελανιών στυλογράφου. Μια από αυτές έγινε από ομάδα καθηγητών ενός πανεπιστημίου στο Πακιστάν. Εξέτασαν έντεκα εμπορικά διαθέσιμα μελάνια για στυλό, χρώματος μπλε, πράσινο και μαύρο, με τα οποία σχεδίασαν μια γραμμή σε ένα χαρτί. Κατά την προετοιμασία του δείγματος κάθε γραμμή από τις έντεκα

αφέθηκε να ξηραθεί και έπειτα με διάτρηση διαλύθηκε σε νερό. Έγινε εξαγωγή μελάνης από τη διάτρηση χαρτιού και το νερό εξατμίσθηκε περνώντας από αέριο άζωτο. Τέλος η ξηρή αυτή μάζα στη συνέχεια διαλύθηκε σε κυκλοεξάνιο προς ανάλυση. Πραγματοποιήθηκε ανάλυση αέριας χρωματογραφίας-φασματομετρίας μάζας με στήλη HP-5 (30 m × 0,32 mm × 0,25 μ L). Ως φέρον αέριο χρησιμοποιήθηκε ήλιο. Το λογισμικό LabSolution χρησιμοποιείται για την επεξεργασία των δεδομένων και τον εντοπισμό των εκλούόμενων κορυφών. Συμπέραναν ότι το μελάνι αποτελούνταν από διάφορα συστατικά τα οποία όμως βρίσκονταν σε διαφορετικές ποσότητες στο κάθε δείγμα. Αυτό σημαίνει πως όλα τα δείγματα μπλε, μαύρων και πράσινων μελανιών πένας μπορούν να διαφοροποιηθούν καθώς τα χημικά συστατικά εμφανίζουν διαφοροποίηση. Η διακριτική ισχύς εκφράζει πόσο γρήγορα γίνεται η αλλαγή από χαμηλή πιθανότητα σε υψηλή πιθανότητα ακριβούς απόκρισης και για όλα τα διαφορετικά μελάνια είναι 1,0, καθώς όλα τα ζεύγη δειγμάτων έχουν διακριθεί με επιτυχία. Αυτά τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι η αέρια χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας είναι η πιο αποτελεσματική τεχνική διαχωρισμού για τα μελάνια στυλογράφου, καθώς μπορεί να διακρίνει σωστά τα δείγματα μελανιού πένας.

Ίσως μια από τις πιο σημαντικές εφαρμογές της χρωματογραφίας-MS είναι για την ανίχνευση φαρμάκων, δηλητηρίων και απαγορευμένων ουσιών σε βιολογικά δείγματα όπως το αίμα και τα ούρα. Αυτό μπορεί να παρέχει στοιχεία που θα βοηθήσουν στον προσδιορισμό των αιτιών θανάτου, στον προσδιορισμό του εάν έχει σημειωθεί παράβαση οδήγησης ή στην πρόληψη της εξαπάτησης στον αθλητισμό. Συλλογικά αυτός ο τύπος ανάλυσης είναι γνωστός ως εγκληματολογική τοξικολογία και η σχεδόν καθολική φύση της ανίχνευσης MS επιτρέπει την ανίχνευση ενός ευρέος φάσματος ενώσεων. Αυτά μπορεί να είναι στεροειδή στην περίπτωση αντι-ντόпинγκ ή ηρεμιστικών ταχείας δράσης όπως οι βενζοδιαζεπίνες σε περιπτώσεις σεξουαλικών επιθέσεων που διευκολύνονται από φάρμακα. Τα ούρα έχουν πολλά πλεονεκτήματα σε σχέση με το αίμα, γεγονός που τα καθιστά δημοφιλή αναλυτική μήτρα. Σε αντίθεση με το αίμα δεν απαιτεί μια επεμβατική διαδικασία συλλογής και οι όγκοι δειγμάτων θα είναι συνήθως πολύ μεγαλύτεροι. Απαιτεί απλοποιημένη προετοιμασία δείγματος και συνήθως προσφέρει αυξημένο παράθυρο ανίχνευσης σε σύγκριση με αίμα που περιέχει μεγαλύτερο εύρος

μεταβολιτών. Τα δείγματα αίματος μπορούν, ωστόσο, να δώσουν πληροφορίες που τα δείγματα ούρων δεν μπορούν. Λόγω των διαφορών στους ρυθμούς απέκκρισης και της επίδρασης της αραίωσης των ούρων, η συγκέντρωση των φαρμάκων και των μεταβολιτών τους στα ούρα μπορεί να ποικίλλει ευρέως, πράγμα που σημαίνει, σε αντίθεση με τα δείγματα αίματος, μπορεί να είναι δύσκολο να προσδιοριστεί ο χρόνος ή το μέγεθος της δόσης και επομένως το φαρμακολογικό είδος συναντήθηκε. Μια περαιτέρω χρήση του συνδυασμού χρωματογραφίας και MS είναι για ναρκωτικά που προέρχονται από φυσικά προϊόντα όπως η ηρωίνη. Τα άλλα συστατικά οπιούχων που εξάγονται από τη ρητίνη παπαρούνας μπορούν επίσης να ανιχνευθούν και οι σχετικές ποσότητες αυτών των ουσιών μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον εντοπισμό της χώρας ή ακόμη και της περιοχής προέλευσης. Στην περίπτωση της κάνναβης, έχει παρασκευαστεί μια σειρά από συνθετικές ενώσεις που είναι παράνομες σε πολλές χώρες. Αυτά τα συνθετικά κανναβινοειδή είναι πολύ πιο ισχυρά από τα φυσικά τους αντίστοιχα και μεταβολίζονται γρήγορα από το ανθρώπινο σώμα έτσι ώστε η μητρική ένωση να υπάρχει μόνο σε μικρές ποσότητες. Εδώ η ακριβής MS

υψηλής ανάλυσης με χρήση οργάνων Orbitrap ή Q-TOF γίνεται πολύ χρήσιμη καθώς οι δομές τόσο του μητρικού φαρμάκου όσο και του μεταβολίτη είναι απίθανο να είναι γνωστές.<sup>46</sup>

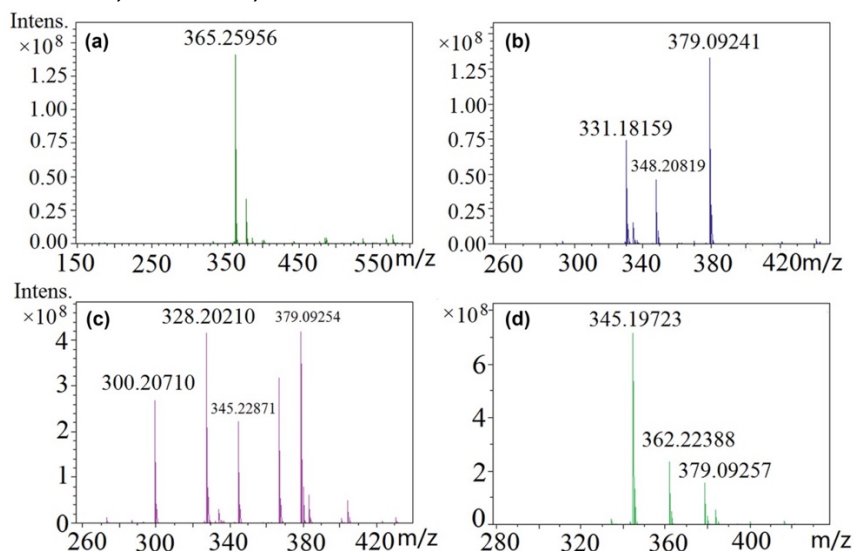
### 3.2.3 Ανάλυση τρίχας με φασματομετρία μάζας

Η τμηματική ανάλυση τρίχας παρέχει ένα εναλλακτικό εργαλείο παρακολούθηση των προσθετικών φαρμάκων και ιατροδικαστική ανάλυση. Σε σύγκριση με την ανάλυση φαρμάκων σε βιολογικά υγρά, συμπεριλαμβανομένου του αίματος ή των ούρων, η ανάλυση δειγμάτων μαλλιών μπορεί να προσφέρει ένα παρατεταμένο παράθυρο ανίχνευσης και εντοπισμού της χρήσης ναρκωτικών για εβδομάδες έως μήνες. Μετρώντας το μήκος της τρίχας και προσεγγίζοντας το ρυθμό ανάπτυξης των μαλλιών (1 cm/μήνα κατά μέσο όρο), είναι δυνατό να εκτιμηθεί πότε έλαβε χώρα συγκεκριμένη λήψη φαρμάκου, σε μια χρονική περίοδο όσο το επιτρέπει το μήκος των μαλλιών (εβδομάδες, μήνες ή και χρόνια).<sup>47</sup> Τα φάρμακα ενσωματώνονται στα μαλλιά τη στιγμή που χορηγούνται. Καθώς τα μαλλιά μεγαλώνουν, το φάρμακο που ενσωματώνεται στο στέλεχος της τρίχας μεταναστεύει μακριά από το τριχωτό της κεφαλής καθώς σχηματίζονται νέες τρίχες. Επομένως, τα μαλλιά μπορούν να θεωρηθούν ιστορικό αρχείο χορήγησης φαρμάκων και συχνά περισσότερες τρίχες θα είναι πάντα διαθέσιμες εάν απαιτηθεί περαιτέρω ανάλυση. Πρέπει να ληφθούν υπόψη τα μειονεκτήματα της ανάλυσης μαλλιών, όπως τα άτομα που έχουν κοντά μαλλιά, η επίδραση της θεραπείας μαλλιών όπως η βαφή και το λούσιμο στις συγκεντρώσεις του φαρμάκου, η μόλυνση του περιβάλλοντος και τα διαφορετικά ποσοστά ενσωμάτωσης φαρμάκων στα μαλλιά εντός του θύλακα. Άλλες μήτρες μπορεί να περιλαμβάνουν ιδρώτα, ο οποίος δεν είναι επεμβατικός και συλλέγεται πολύ εύκολα χρησιμοποιώντας επιχρίσματα ή επιθέματα ιδρώτα. Ο ιδρώτας έχει προταθεί ως εναλλακτική λύση στα δείγματα ούρων, καθώς μειώνει τον κίνδυνο χειραγώγησης του δείγματος.<sup>48</sup>

Πέρα από τις τεχνικές GC-MS και LC-MS που έχουν αναπτυχθεί για την ανάλυση αυτή, χρησιμοποιείται και η ανάλυση με φασματομετρία μάζας σε πραγματικό χρόνο με ιονισμό με υποβοήθηση μήτρας (MALDI). Η MALDI σε συνδυασμό με τη φασματομετρία μάζας έχει χρησιμοποιηθεί ως μέθοδος που παράγει χάρτες κατανομής φαρμάκων και μεταβολιτών *in situ* στα μαλλιά και στοχευόμενα φάρμακα όπως η κεταμίνη, η μεθαμφεταμίνη, η ζολπιδέμη, η μεθοξυφαιναμίνη, η νικοτίνη, η τιλιδίνη, η κοκαΐνη και οι μεταβολίτες κοκαΐνης, οι κανναβινόλες και τα ισομερή κανναβινοειδών. Τα συνθετικά κανναβινοειδή (SCs) έχουν την ικανότητα να δεσμεύουν και να διεγείρουν τους υποδοχείς κανναβινοειδών, επομένως η λήψη συνθετικών κανναβινοειδών μπορεί να προκαλέσει παραισθησιογόνα αποτελέσματα παρόμοια με τη φυσική κάνναβη. Συνήθως ψεκάζονται σε καπνό ή μπαχαρικά για το κάπνισμα και το εθιστικό τους και τα συμπτώματα στέρησης είναι παρόμοια με τη φυσική κάνναβη. Μακροπρόθεσμα το κάπνισμα μπορεί να οδηγήσει σε καρδιαγγειακά νοσήματα και ψυχικές διαταραχές, καθώς και καρκινογόνους κινδύνους. Τα τελευταία χρόνια, διάφορα νέα παράγωγα SC έχουν αναπτυχθεί για να ξεφύγουν από την επιθεώρηση ελέγχου φαρμάκων. Τα SC είναι η πιο ταχέως αναπτυσσόμενη κατηγορία νέων ψυχοδραστικών ουσιών (NPSs). Σε αυτή τη μελέτη, χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά φασματομετρία μάζας συντονισμού ιόντων κυκλοτρονίων μετασχηματισμού MALDI-Fourier (MALDI-FT ICR MS) για την

ταυτοποίηση των παραγώγων κανναβινοειδών συντιθέμενης ινδόλης 3-καρβοξαμίδης σε δείγματα μαλλιών μετά την εξάχνωση της μήτρας.<sup>49</sup>

Οι ενώσεις-στόχοι περιλαμβάνουν APICA, 5F-AB-PICA, ADB-PINACA και 5F-ADBICA. Μέθοδοι εναπόθεσης μήτρας, συμπεριλαμβανομένου του ψεκαστήρα με αερογράφο και της εξάχνωσης συγκρίθηκαν. Οι *in situ* χωρικές κατανομές των APICA και 5F-ADBICA στις πραγματικές τρίχες δύο τοξικομανών αναλύθηκαν επίσης από το MSI. Σε σύγκριση με την παραδοσιακή μέθοδο LC-MS/MS και GC-MS, αυτή η μέθοδος μειώνει το μέγεθος του δείγματος, τον χρόνο προεπεξεργασίας και ανάλυσης του δείγματος και παρέχει ένα ισχυρό εργαλείο για τον έλεγχο της κατάχρησης ναρκωτικών και την ιατροδικαστική ανάλυση. Δείγματα μαλλιών χωρίς ναρκωτικά δόθηκαν από εθελοντή που δεν είχε έρθει σε επαφή με συνθετικά κανναβινοειδή στο τον τελευταίο 1 χρόνο. Δύο δείγματα τρίχας του τριχωτού της κεφαλής από χρήστες συνθετικών κανναβινοειδών ελήφθησαν από την Επιτροπή Ελέγχου Ναρκωτικών του Γραφείου, Δημοτική Δημόσια Ασφάλεια της Ναντζίγκ. Και στις δυο περιπτώσεις επιβεβαιώθηκαν τα αποτελέσματα με τη μέθοδο UPLC-MS/MS. Οι τρίχες πλύθηκαν με διαλύτες, ανακτήθηκαν και αφέθηκαν να ξηραθούν. Για την ανάλυση MALDI-FT ICR MS, χρησιμοποιήθηκε φασματόμετρο μάζας Bruker 7.0T Solarix FTICR με τετραπολικό-FT ICR αναλυτή, εξοπλισμένο με πηγή ιόντων ESI/APCI/MALDI και εξωτερική συσσώρευση ιόντων σε λειτουργία θετικού ιόντος σε εύρος μάζας  $m/z$  150,48–800. 2244. Το πλήρες φάσμα μάζας σάρωσης τεσσάρων SC στα δείγματα μαλλιών παρουσιάζεται στην παρακάτω εικόνα (εικόνα 23). Οι κορυφές αφορούν τα πρόδρομα ιόντα του APICA, 5F-ABPICA, ADB-PINACA και 5F-ADBICA στο  $m/z$  365.2593, 348.2087, 345.2291 και 362.2244.<sup>49</sup>



Εικόνα 24: Φάσματα μάζας πλήρους σάρωσης τεσσάρων SC στο δείγμα εμποτισμένων μαλλιών με MALDI-FT ICR MS. a) APICA, b) 5F-AB-PICA, c) ADB-PINACA, d) 5F-ADB, <https://www.sigmaaldrich.com/GR/en/tech-docs/paper/538368>

Στο FT ICR MS, μέσω της βελτιστοποίησης των τετραπολικών παραμέτρων, η απόδοση απομόνωσης βελτιστοποιήθηκε σε υψηλότερη από 80%, ο θόρυβος μπορεί να μειωθεί μετά την απομόνωση, η επιλεκτικότητα και το S/N μπορούν να αυξηθούν, επομένως η ευαισθησία ανίχνευσης της λειτουργίας απομόνωσης είναι υψηλότερη από την πλήρη σάρωση. Χρησιμοποιήθηκε επίσης MALDI-TOF MS στην οποία παρατηρήθηκε χαμηλότερη ισχύς ανάλυσης που δεν ήταν ικανή

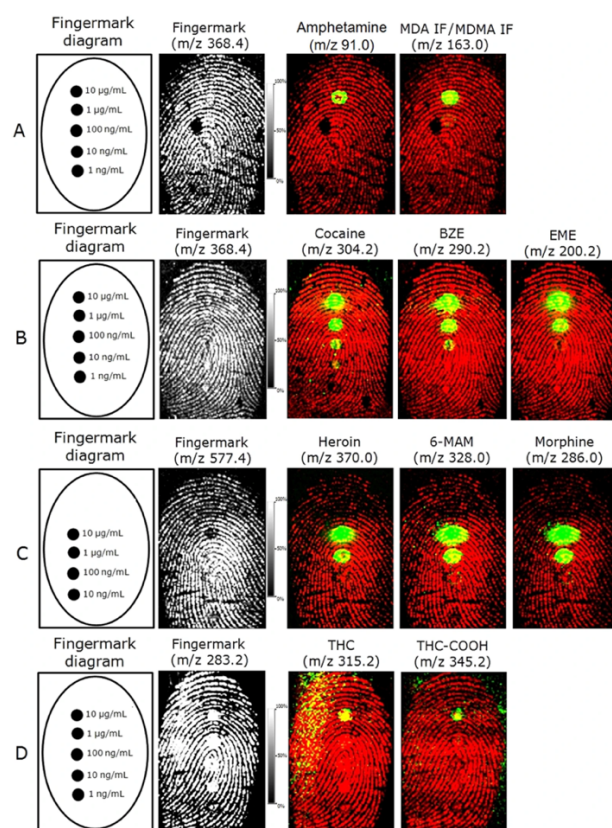
για να διαχωριστούν τα στενά συνδεδεμένα ιόντα. Ωστόσο, παρά τη χαμηλότερη ανάλυση του MALDI-TOF MS, μια σύγκριση των μέσων φασμάτων που ελήφθησαν και από τα δύο φασματομέτρα μάζας αποκάλυψε υψηλή ομοιότητα στην ίδια τρίχα. Το MALDI MSI μπορεί να αποφύγει την αποικοδόμηση των φαρμάκων που προκαλείται από την καταστροφή των τριχών σε όξινα ή αλκαλικά διαλύματα κατά τις διαδικασίες προεπεξεργασίας και να συντομεύσει τον χρόνο προεπεξεργασίας και ανάλυσης του δείγματος, παρέχοντας τεχνική φασματομετρίας μάζας υψηλής απόδοσης για ιατροδικαστική, τοξικολογική, κλινική και αντιναρκωτική έρευνα. Το MALDI-FT ICR MS είχε το πλεονέκτημα της υψηλότερης επιλεκτικότητας και την ανάλυση μάζας, αποδίδοντας περισσότερα ευδιάκριτα ιόντα και υψηλότερα επίπεδα σημασίας.<sup>49</sup>

#### 3.2.4 MALDI MS σε δακτυλικά αποτυπώματα για την ανίχνευση ναρκωτικών ουσιών

Η ανίχνευση και η χαρτογράφηση παράνομων ναρκωτικών και μεταβολιτών σε λανθάνοντα δακτυλικά σημάδια θα παρείχε πληροφορίες που είναι επωφελείς τόσο για αστυνομικές έρευνες όσο και για δικαστικές υποθέσεις. Βελτιστοποιημένα πρωτόκολλα που επιτρέπουν τη συμβατή εφαρμογή του MALDI σε ανεπτυγμένα δακτυλικά σημάδια θα επιτρέψουν τη συγκέντρωση πρόσθετων πληροφοριών γύρω από τον τρόπο ζωής και τις δραστηριότητες ενός υπόπτου πριν από την εναπόθεση των δακτυλικών σημαδιών του ενώ διαπράττει ένα έγκλημα. Πρόσφατες εργασίες που έγιναν σε δακτυλικά σημάδια που έχουν εναποτεθεί σε μια σειρά επιφανειών (πορώδεις και μη πορώδεις) έχουν δείξει διαφορετικούς βαθμούς συμβατότητας MALDI MS με έναν αριθμό τεχνικών εγκληματολογικής ενίσχυσης (FET) που χρησιμοποιούνται συμβατικά από τους ερευνητές σκηής του εγκλήματος (CSI) για την οπτικοποίηση δακτυλικών σημαδιών. Για αυτήν τη μελέτη, επιλέχθηκαν 17 ενώσεις (μητρικά φάρμακα και μεταβολίτες, συμπεριλαμβανομένων των ισομερών μεθαμφεταμίνης και 4-μεθυλαμφεταμίνης) από 5 διαφορετικές κατηγορίες φαρμάκων: αμφεταμίνες, αλκαλοειδή, οπιοειδή, κανναβινοειδή και επώνυμα φάρμακα. Να τονίσουμε ότι η ανίχνευση μεταβολιτών φαρμάκων θα υποδηλώνει «κατάχρηση» ναρκωτικών και όχι χρήση, τα οποία αφορούν δύο πολύ διαφορετικά εγκληματολογικά σενάρια. Στην αναφερθείσα έρευνα δοκιμάστηκαν δύο σενάρια για μίμηση «χρήσης» (συγκεντρώσεις φαρμάκου της τάξης των 0,5 μg της καθαρής ένωσης που μολύνει την άκρη του δακτύλου) και «κατάχρηση» (οι συγκεντρώσεις του φαρμάκου εξαρτώνται από το LOD που λήφθηκε κατά τις προκαταρκτικές μελέτες και κυμαίνονταν από 0,05 έως 0,0005 μg καθαρής ένωσης). Ωστόσο, στην τελευταία περίπτωση, η βιβλιογραφία δεν παρέχει πληροφορίες σχετικά με τα πιθανά ποσά που μπορούν τελικά να ανακτηθούν σε δακτυλικά σημάδια. Οι μόνες διαθέσιμες μελέτες αναφέρονται στην ποσοτικοποίηση ορισμένων από αυτά τα είδη σε επιθέματα ιδρώτα. Για παράδειγμα, σε μια μελέτη των Barnes et al. , η απέκκριση της μεθαμφεταμίνης στον ιδρώτα μετά την κατανάλωση αποδείχθηκε με GC-MS, με τιμές που κυμαίνονται μεταξύ 307 και 53,8 ng/έμπλαστρο, αν και δεν εντοπίστηκαν μεταβολίτες. Σε μια άλλη μελέτη των Barnes et al., η απέκκριση της 3,4-μεθυλενοδιοξυ-μεθαμφεταμίνης (MDMA) διερευνήθηκε χρησιμοποιώντας GC-MS. Αυτές οι αναλύσεις έδειξαν την παρουσία MDMA ως κύριας αναλυόμενης ουσίας. Μια μελέτη των Kacinko et al. έδειξε ότι μετά τη χορήγηση κοκαΐνης, η κοκαΐνη ήταν η κύρια αναλυόμενη ουσία που ανιχνεύθηκε σε επιθέματα ιδρώτα χρησιμοποιώντας



GC-MS, με έως και 375,4 ng/έμπλαστρο. Τέλος, όπως μελετήθηκε από τους Huestis et al., η Δ9-τετραϋδροκανναβινόλη (THC, κάνναβη) είναι η κύρια ένωση που παρατηρείται σε επιθέματα ιδρώτα, που ανακτάται σε συγκέντρωση έως και 3,85 ng/έμπλαστρο χρησιμοποιώντας GC-MS. Τα φάσματα MALDI MS και MALDI MS/MS αποκτήθηκαν σε θετικό τρόπο για 17 ενώσεις και στη συνέχεια δημιουργήθηκαν βελτιστοποιημένες συνθήκες οργάνου. Όλες οι ενώσεις ήταν ανιχνεύσιμες ως ιόντα  $[M+H]^+$  σε τρόπο λειτουργίας MS και δημιούργησαν χαρακτηριστικά θραύσματα ιόντων σε τρόπο λειτουργίας MS/MS. Επιπλέον, για την παροχή πληροφοριών σχετικά με την ειδικότητα της ανίχνευσης MALDI, ένα μείγμα δέκα ενώσεων (5-διμεθοξυ-4-βρωμοφαιναυλαμίνη (2-CB), αμφεταμίνη, 4-μεθυλαμφεταμίνη, μεθαμφεταμίνη, 3,4-μεθυλενοδιοξαμφεταμίνη (MDA), 3, H 4-μεθυλενοδιοξυ-N-αιθυλ-αμφεταμίνη (MDEA), η μετα-χλωροφαινυλπιπεραζίνη (mCPP), η κοκαΐνη, η ηρωίνη και η μεθαδόνη) αναλύθηκαν με MALDI MS. Ανιχνεύθηκαν και τα δέκα είδη, χωρίς σημαντική καταστολή ιόντων να εμποδίζει την ανίχνευση οποιουδήποτε είδους. Οι κατηγορίες αμφεταμινών και κανναβινοειδών παρουσιάζουν τη χαμηλότερη αποτελεσματικότητα ιονισμού με φάρμακα και μεταβολίτες και θα μπορούσαν να παρέχουν εικόνες κηλίδων μόνο στην υψηλότερη συγκέντρωση που δοκιμάστηκε (10 μg/mL). Η ανίχνευση αλκαλοειδών σε εικόνες κηλίδων κυμαινόταν από 10 ng/mL έως 10 μg/mL, ενώ το LOD για τα οπιοειδή ήταν μεταξύ 100 και 10 ng/mL. Τα MDA/MDMA ήταν επίσης ορατά στο 1 μg/mL και το EME, η ηρωίνη, τα 6-MAM και η μορφίνη ήταν ορατά στα 100 ng/mL (εικόνα 24).<sup>50</sup>

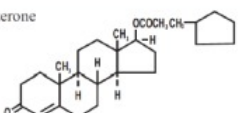
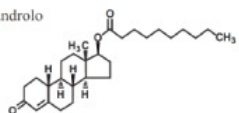
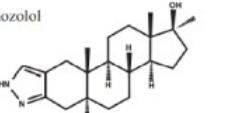


Εικόνα 25: MALDI MSI διαδοχικών αραιώσεων που κυμαίνονται από 10 μg/mL έως 1 ng/mL των διαφορετικών κατηγοριών φαρμάκων που εντοπίζονται σε ένα δακτυλικό αποτύπωμα, <https://www.nature.com/articles/srep11716>



### 3.2.5 Ανίχνευση αναβολικών ανδρογόνων στεροειδών με GC-MS

Τα αναβολικά-ανδρογόνα στεροειδή (AASs) είναι μια ομάδα ουσιών που περιλαμβάνουν την τεστοστερόνη και τα συνθετικά της παράγωγα, που χορηγούνται από του στόματος ή ενέσιμα. Αρχικά χρησιμοποιούνταν για να ελαχιστοποιήσουν τις ανδρογονικές επιδράσεις της τεστοστερόνης και να μεγιστοποιήσουν τα αναβολικά αποτελέσματα, μέσω της δράσης των υποδοχέων αυξητικού παράγοντα, όπως η αυξητική ορμόνη (GH) και ο αυξητικός παράγοντας 1 (IGF-1). Επιπλέον, τα AASs και τα συνθετικά τους παράγωγα χρησιμοποιούνται σε θεραπευτικές δόσεις στην ιατρική πρακτική, στη θεραπεία ορμονικών ασθενειών και άλλων παθολογιών που χαρακτηρίζονται από απώλεια μυών (γήρανση, καρκίνος και AIDS), υπογοναδισμό, καρκίνο του μαστού, καθυστερημένη εφηβεία, νεφρική ανεπάρκεια και αναιμία.<sup>51</sup>

| AAS Class    | I<br>C-17 Esterification   | II<br>19-Nortestosterone  | III<br>C-17 Alkylation   |
|--------------|--|---|--|
| Substitution | Long-chain ester   | No methyl group at C-19; may also have C-17 esters  | Alkyl moiety at C-17   |
| Examples     | <ul style="list-style-type: none"> <li>Testosterone cypionate</li> <li>Testosterone propionate</li> <li>Methenolone</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>Nandrolone decanoate</li> <li>Trenbolone</li> </ul>        | <ul style="list-style-type: none"> <li>Stanozolol</li> <li>17<math>\alpha</math>-Methyltestosterone</li> <li>Methandrostenolone</li> <li>Oxymetholone</li> </ul> |
| Structure    | Testosterone<br>                            | Nandrolone<br> | Stanozolol<br>  |

Εικόνα 26: Οι τρεις κύριες κατηγορίες αναβολικών ανδρογόνων στεροειδών, <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26074748/>

Στις μέρες μας, η αγορά φαρμάκων ντόπινγκ είναι τεράστια και συνεχώς αυξάνεται. Το φαινόμενο του ντόπινγκ δεν επηρεάζει μόνο επαγγελματίες αθλητές, αλλά και άτομα που ασκούν ερασιτεχνικές αθλητικές δραστηριότητες (μη αθλητές), που εξακολουθούν να έχουν τον χαμηλότερο επιπολασμό κατανάλωσης (1%). Επιπλέον, η κατάχρηση AAS μεταξύ μη αθλητών αυξάνεται ιδιαίτερα στα γυμναστήρια, για αισθητικούς λόγους. Σύμφωνα με τη Διεθνή Ολυμπιακή Επιτροπή, τα στεροειδή ευθύνονται για περισσότερο από το 50% των θετικών κρουσμάτων ντόπινγκ. Η Μέση Ανατολή έχει τον υψηλότερο επιπολασμό κατανάλωσης AAS, με 21,7% των χρηστών παγκοσμίως, ακολουθούμενη από τη Νότια Αμερική (4,8%), την Ευρώπη (3,8%), τη Βόρεια Αμερική (3,0%), την Ωκεανία (2,6%), την Αφρική (2,4%), και την Ασία (0,2%).<sup>52</sup> Αρκετές αναφορές περιστατικών αιφνίδιου θανάτου σε νεαρούς αθλητές υποδεικνύουν μια σχέση μεταξύ της χρόνιας κατάχρησης AAS και του αυξημένου κινδύνου αρρυθμιών και του αιφνίδιου καρδιακού θανάτου. Λόγω του υψηλού επιπολασμού της χρήσης AAS μεταξύ των αθλητών, οι τοξικολογικές έρευνες είναι θεμελιώδεις σε αυτές τις περιπτώσεις σε άτομα που είναι ύποπτα για κατανάλωση AAS. Σε όλες τις περιπτώσεις αιφνίδιου θανάτου που αφορά νεαρό αθλητή, το

επίκεντρο της μεταθανάτιας εξέτασης πρέπει να είναι στον φυσικό φαινότυπο, όπως η μυϊκή υπερτροφία ή η γυναικομαστία. Επιπλέον, λαμβάνοντας υπόψη ότι οι καρδιακές ανεπιθύμητες ενέργειες σχετίζονται με τη χρόνια κατανάλωση AAS και η χρήση αυτών των ουσιών έχει αυξηθεί μεταξύ των νεαρών ενηλίκων, έχουν αυξηθεί οι περιπτώσεις αιφνίδιου θανάτου στους νεαρούς ενήλικες. Η χημική-τοξικολογική ανάλυση είναι επομένως ένα κρίσιμο εργαλείο για την αξιολόγηση της σχέσης μεταξύ αιφνίδιου καρδιακού θανάτου και κατάχρησης AAS.<sup>53</sup>

Για τη διεξαγωγή τοξικολογικών ερευνών προκειμένου να εξακριβωθούν τα AAS που χρησιμοποιούνται, οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενες μέθοδοι είναι η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) και η αέρια χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας (GC-MS). Τα υγρά βιολογικά δείγματα (αίμα και ούρα) θα πρέπει να υποβάλλονται σε έλεγχο με χρήση χρωματογραφίας-φασματομετρίας μάζας (GC-MS). Τα δείγματα ούρων πρέπει πρώτα να ρυθμιστούν σε pH 7,0 και να υδρολύονται χρησιμοποιώντας β-γλυκουρονιδάση από *Escherichia coli*. Το pH στη συνέχεια ρυθμίζεται σε μια τιμή 9,5 και οι αναλυόμενες ουσίες εκχυλίζονται μέσω τριβουτυλομεθυλαιθέρα (MTBE). Εάν τα αποτελέσματα είναι αρνητικά, μπορούν είτε να υποβληθούν σε GC-MS είτε σε υγρή χρωματογραφία-διαδοχική φασματομετρία μάζας (LC-MS-MS) ξανά για να επιβεβαιωθεί η έναρξη του AAS. Για αναλύσεις αίματος, χρησιμοποιείται υγρή χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας (LC-MS) για να ληφθεί η καθίζηση πρωτεϊνών. Αναπτύχθηκε μια μέθοδος GC-MS που βασίζεται κυρίως σε παρακολούθηση ενός ιόντος και επαναλαμβανόμενη σάρωση για την ανίχνευση μεταβολιτών ούρων νανδρολόνης, μεθανοδιενόνης, νορεθανδρολόνης και οραβολίνης σε ανθρώπους. Λίγο μετά, αναφέρθηκε η πρώτη ολοκληρωμένη μέθοδος GC-MS ιονισμού ηλεκτρονίων-χημικού ιονισμού (EI-CI) για διαλογή αναβολικών στεροειδών με χρήση της επιλεγμένης λειτουργίας παρακολούθησης ιόντων (SIM), όπου καταγράφηκαν και άλλαξαν αρκετές ομάδες δύο ή τριών ειδικών ιόντων κατά την ανάλυση σύμφωνα με χρόνους διατήρησης των στεροειδών που μας ενδιαφέρουν.<sup>54</sup>

Στη χρήση του MS για εγκληματολογική ανάλυση, η προσέγγιση υψηλής ακρίβειας μάζας (HRMS) είναι ιδιαίτερα χρήσιμη τόσο για τον εντοπισμό αγνώστων ουσιών όσο και για τον έλεγχο φαρμάκων σε τοξικολογική και αντι-ντόπινγκ ανάλυση. Λόγω των πλεονεκτημάτων του ελέγχου LC-HRMS, η προσέγγιση υιοθετήθηκε από το εργαστήριο που είναι υπεύθυνο για την ανάλυση αντιντόπινγκ πριν από τους Ολυμπιακούς και Παραολυμπιακούς Αγώνες του Λονδίνου 2012.

### 3.2.6 Αναγνώριση προφυλακτικού σε μολυσμένα με προφυλακτικά δακτυλικά σημάδια

Οι σεξουαλικοί παραβάτες αναφέρονται όλο και περισσότερο ότι χρησιμοποιούν προφυλακτικά κατά τη διάπραξη του εγκλήματος, κυρίως για να αποτρέψουν τη μεταφορά αποδεικτικών στοιχείων DNA. Παρόλο που τα προφυλακτικά αφαιρούνται συχνά από τον τόπο του εγκλήματος, μπορούν να ληφθούν κολπικά επιχρίσματα από το θύμα για να αποδειχθεί η παρουσία λιπαντικών προφυλακτικών. Επίσης ανάλυση των δακτυλικών σημαδιών που έχουν μολυνθεί από προφυλακτικό επιτρέπει τη λήψη εικόνων του σχεδίου κορυφογραμμής των δακτυλικών αποτυπωμάτων ταυτόχρονα με την ανίχνευση του λιπαντικού προφυλακτικού για δύο μάρκες προφυλακτικών, καθιστώντας έτσι έναν πιθανό εναλλακτικό τρόπο σύνδεσης του δράστη με το έγκλημα. Ωστόσο, η καθυστερημένη αναφορά στην αστυνομία και η τάση του

θύματος να πλένεται αμέσως μετά το έγκλημα, μπορεί να θέσει σε κίνδυνο την συγκεκριμένη ανάλυση.<sup>117</sup>

### 3.3 Φασματομετρία υπεριώδους ορατού

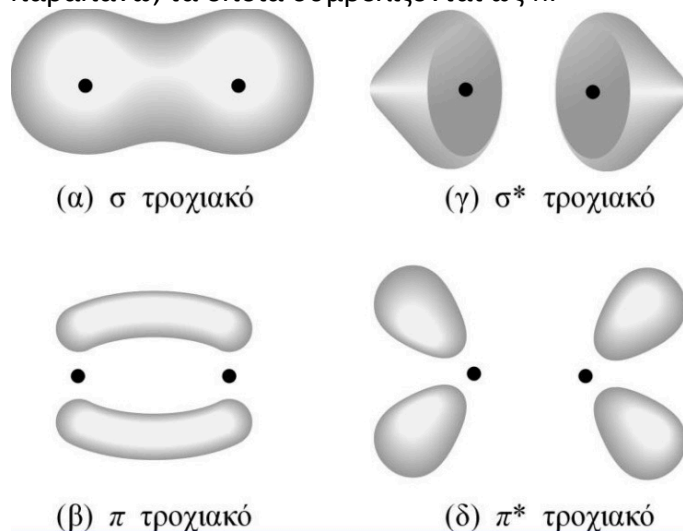
Η φασματοσκοπία υπεριώδους-ορατού (UV-Vis) είναι μια καθιερωμένη τεχνική που ασχολείται με ηλεκτρονικές μεταβάσεις εντός των μορίων σε ένα δείγμα. Έχει διατεθεί στο εμπόριο από τη δεκαετία του 1940, αλλά τα τελευταία χρόνια έχει επωφεληθεί από την πρόοδο της τεχνολογίας, μεταξύ των οποίων βελτιωμένοι ανιχνευτές και δειγματοληψία οπτικών ινών, που επέτρεψαν στα όργανα να γίνουν μικρότερο, ταχύτερο, ικανό να αναλύει όλο και πιο μικρές ποσότητες δειγμάτων και να είναι πιο φορητό. Η φασματομετρία UV-Vis χρησιμοποιείται συνήθως στη βιομηχανία και έχει εφαρμοστεί, για παράδειγμα, σε την ανάλυση φαρμακευτικών προϊόντων, πρωτεϊνών και DNA. Οι εγκληματολογικές εφαρμογές είναι ποικίλες, δεδομένης της διαθεσιμότητας όχι μόνο τυπικών φασματόμετρων αλλά και μικροφασματοφωτοεστέρων, οι οποίοι μπορούν να αναλύσουν μικρά δείγματα μη καταστροφικά, συμπεριλαμβανομένων μελάνης, ινών και χρωμάτων.

#### Αρχή

#### μεθόδου

Η φασματοσκοπία UV-Vis αναλύει τις ηλεκτρονικές μεταβάσεις που συμβαίνουν όταν η προσπίπτουσα ακτινοβολία EM σε ένα δείγμα είναι στην περιοχή 200–750 nm, δηλαδή στην περιοχή UV-Vis. Στο υπεριώδες διακρίνουμε δύο περιοχές: το εγγύς υπεριώδες (400 με 190 nm) και το άπω υπεριώδες (100 με 190 nm), και στην ορατή περιοχή αναφερόμαστε σε μήκη κύματος 400-750 nm. Η συνήθης οργάνολογία όσον αφορά το υπεριώδες περιορίζεται στο εγγύς υπεριώδες. Στις συνδυασμένες περιοχές UV και ορατές, οι ηλεκτρονικές μεταβάσεις που καταγράφονται τείνουν να είναι μοριακές και όχι ατομικές, έτσι ώστε η φασματοσκοπία UV-Vis να μπορεί να παρέχει πληροφορίες σχετικά με τη δομή ή τις δομές που υπάρχουν σε ένα μόριο. Σε μια τυπική διέγερση, η μετάβαση είναι από το υψηλότερο μοριακό τροχιακό στο χαμηλότερο μοριακό τροχιακό. Οι ηλεκτρονικές μεταπτώσεις μπορεί να ακολουθούνται από μεταβολές στις δονητικές και περιστροφικές στάθμες. Για να πραγματοποιηθεί απορρόφηση της ακτινοβολίας, τα φωτόνια που προσκρούουν στο δείγμα πρέπει να έχουν ίση ενέργεια με αυτή που απαιτείται για να προκληθεί μια κβαντισμένη ενεργειακή μεταβολή. Αρχικά συμβαίνει μια ηλεκτρονιακή διέγερση του μορίου. Το προϊόν της αντίδρασης του μορίου με το φωτόνιο είναι ένα ηλεκτρονικά διεγερμένο (ενδιάμεσο) σωματίδιο. Ακολουθεί η αποδιέγερση αυτού του ενδιάμεσου σωματιδίου με τη διάσπασή του και τον σχηματισμό ενός νέου σωματιδίου. Εναλλακτικά η αποδιέγερση μπορεί να περιλαμβάνει εκπομπή φθορισμού ή φωσφορισμού. Με τη φασματομετρία uv-vis λοιπόν ταυτοποιούμε και ποσοτικοποιούμε ενώσεις που περιέχουν χαρακτηριστικές ομάδες. Καθώς όλες οι οργανικές ενώσεις έχουν ηλεκτρόνια σθένους, έχουν όλες την δυνατότητα να απορροφούν ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία. Όταν δύο άτομα σχηματίζουν ένα χημικό δεσμό, ηλεκτρόνια και από τα δύο αυτά άτομα συμμετέχουν στο δεσμό και καταλαμβάνουν ένα νέο μοριακό τροχιακό. Τα δεσμικά ηλεκτρόνια συνδέονται με το

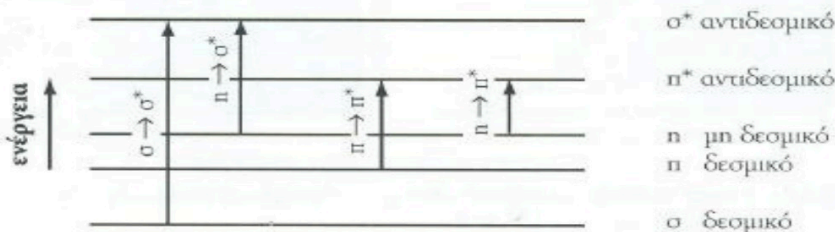
μόριο σαν σύνολο. Μη δεσμικά ονομάζονται τα ηλεκτρόνια σθένους που δεν συμμετέχουν στους χημικούς δεσμούς των μορίων. Στα οργανικά μόρια, τα μοριακά τροχιακά που σχετίζονται με απλούς δεσμούς αναφέρονται ως σ. Ο διπλός δεσμός αποτελείται από ένα τροχιακό σ και ένα π. Εκτός από τα σ και π ηλεκτρόνια, πολλά οργανικά μόρια περιέχουν επιπλέον και μη δεσμικά ηλεκτρόνια όπως αναφέραμε και παραπάνω, τα οποία συμβολίζονται ως n.<sup>55</sup>



Εικόνα 27: σ και π τροχιακά <https://www.chemistry.uoc.gr/nmr/physchem/Lecture8.pdf>

Οι μεταπτώσεις που μελετώνται στη φασματοσκοπία απορρόφησης αφορούν μη δεσμικά ηλεκτρόνια n σε τροχιακά σ\* αλλά και μεταπτώσεις n ή π ηλεκτρονίων σε διεγερμένη κατάσταση π\*. Οι μεταπτώσεις n → π\* και π → π\* απαιτούν την παρουσία μιας ακόρεστης (διπλός ή τριπλός δεσμός) λειτουργικής ομάδας με π τροχιακά. Αυτά τα μόρια που διαθέτουν τέτοιες ομάδες και είναι ικανά να απορροφούν στην περιοχή υπεριώδους ορατού ονομάζονται χρωμοφόρα. Στα οργανικά μόρια, τα n ηλεκτρόνια εντοπίζονται κυρίως σε ατομικά τροχιακά του αζώτου, θείου, οξυγόνου και των αλογόνων. Τα σύμπλοκα μετάλλων μετάπτωσης μπορούν επίσης να αναλυθούν χρησιμοποιώντας φασματοσκοπία UV-Vis. Εάν το σύμπλοκο έχει οργανικό πρόσδεμα, οι κορυφές που οφείλονται στον συνδέτη θα υπάρχουν στο φάσμα, υποθέτοντας ότι υπάρχει κάποια σύζευξη, όπως συμβαίνει με οποιοδήποτε οργανικό μόριο.<sup>55</sup>

| χρωμοφόρος ομάδα | ηλεκτρονικές μεταπτώσεις      | $\lambda_{\max} / \text{nm}$ |
|------------------|-------------------------------|------------------------------|
| -C-C-            | $\sigma \rightarrow \sigma^*$ | 150                          |
| -O-              | $n \rightarrow \sigma^*$      | 185                          |
| -N-              | $n \rightarrow \sigma^*$      | 195                          |
| -S-              | $n \rightarrow \sigma^*$      | 195                          |
| >C=O             | $\pi \rightarrow \pi^*$       | 190                          |
|                  | $n \rightarrow \pi^*$         | 300                          |
| >C=C<            | $\pi \rightarrow \pi^*$       | 190                          |



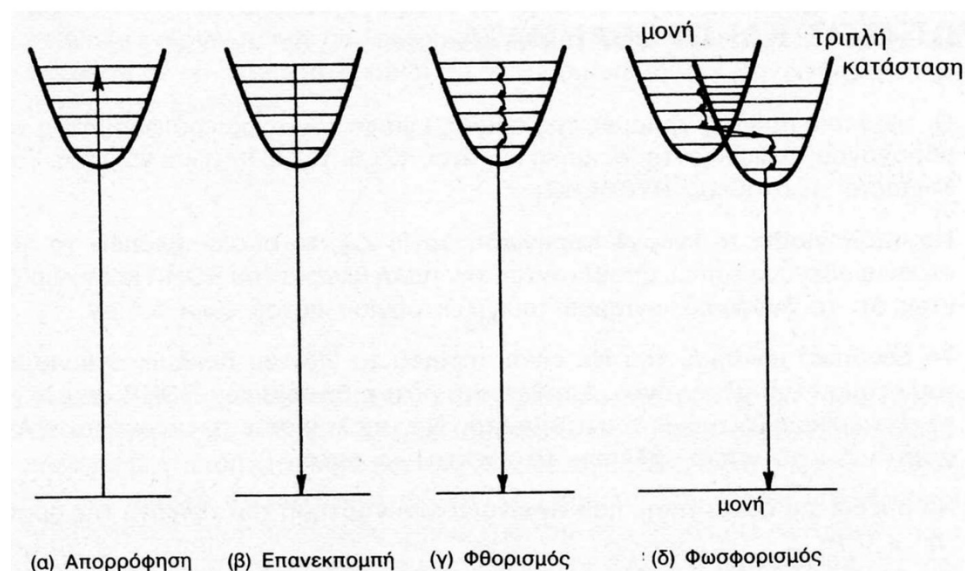
Εικόνα 28: μεταπτώσεις  $\sigma$   $\pi$  και  $n$  τροχιακών και οι μερικές χρωμοφόρες ομάδες, Cooper J.W., *Spectroscopic Techniques for Organic Chemists*, Wiley, 1980

Οι συντελεστές γραμμομοριακής απορροφητικότητας ( $\epsilon$ ) αποτελούν μέτρο του πόσο αποτελεσματικά ένα μόριο απορροφά ακτινοβολία και είναι σταθεροί για οποιοδήποτε μόριο σε δεδομένο μήκος κύματος, καθώς δεν εξαρτώνται από τη συγκέντρωση. Όσο μεγαλύτερη είναι η τιμή του  $\epsilon$ , τόσο πιο αποτελεσματική είναι η μετάβαση του μορίου στη διεγερμένη κατάσταση. Η τιμή του συντελεστή γραμμομοριακής απορροφητικότητας  $\epsilon$  υπολογίζεται από την εξίσωση:  $\epsilon = 8,7 \cdot 10^{19} \cdot P \cdot A$ , όπου  $P$  είναι η πιθανότητα μετάπτωσης και  $A$  είναι η επιφάνεια του στόχου του συστήματος απορρόφησης. Η τιμή του  $\epsilon$  για τις μεταπτώσεις  $n \rightarrow \pi^*$  βρίσκονται στην περιοχή  $10\text{-}100 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  ενώ για τις μεταπτώσεις  $\pi \rightarrow \pi^*$  στην περιοχή  $1000\text{-}15000 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  και είναι υψηλότερες. Τα φάσματα των οργανικών μορίων με χρωμοφόρες ομάδες είναι πολύπλοκα και έχουν αλληλεπικαλύψεις. Οι κορυφές στο φάσμα δεν έχουν την ίδια ένταση. Η ένταση της κάθε κορυφής εξαρτάται και από άλλους παράγοντες, όπως η συγκέντρωση και η φύση των μορίων της υπό μελέτη ουσίας. Να τονίσουμε πως τα φάσματα UV δεν χαρακτηρίζουν συνολικά το μόριο αλλά δίνουν πληροφορίες για τις χρωμοφόρες ομάδες που απορροφούν ακτινοβολία. Μπορεί επίσης να εμφανιστούν λίγες γραμμές, που ακολουθούνται από μια συνέχεια στο φάσμα απορρόφησης. Τα φάσματα αποτελούνται συνήθως από ευρείες ταινίες απορρόφησης σε μήκη κύματος τα οποία αντιστοιχούν στα μέγιστα των απορροφήσεων  $\lambda_{\max}$ , μιας ή περισσότερων χρωμοφόρων ομάδων εντός του μορίου. Για τις κορεσμένες οργανικές ενώσεις, υπάρχουν επίσης μη δεσμικά ηλεκτρόνια που διεγείρονται με ακτινοβολία 170-250 nm. Επίσης ανόργανα ιόντα παρουσιάζουν ζώνες απορρόφησης στο υπεριώδες λόγω διέγερσης μη δεσμικών ηλεκτρονίων. Εκτός από τις ηλεκτρονικές μεταβάσεις που λαμβάνουν χώρα, συμβαίνουν και δονητικές και περιστροφικές μεταβάσεις, οι οποίες μπορούν να προκαλέσουν μικρές αλλαγές στην ενέργεια των μεταβάσεων. Ως αποτέλεσμα, οι αιχμηρές ηλεκτρονικές γραμμές απορρόφησης διευρύνονται σε κορυφές.<sup>55</sup>

Για να προωθηθεί η διέγερση, η ενέργεια του προσπίπτοντος φωτός πρέπει να είναι ίδια με τη διαφορά ενέργειας μεταξύ της βασικής ηλεκτρονικής κατάστασης και της

διεγερμένης ηλεκτρονικής κατάστασης. Επομένως, το μήκος κύματος ( $\lambda$ ) της απορρόφησης υποδεικνύει την απόσταση μεταξύ των ενεργειακών επιπέδων των τροχιακών, παρέχοντας πληροφορίες για τη δομή των μορίων του δείγματος. Η μετεγκατάσταση μπορεί να αυξηθεί με υποκατάσταση με ομάδες που έχουν χαμηλή ή καθόλου απορρόφηση όπως —OR, —NO<sub>2</sub>, —NH<sub>2</sub> και —CO<sub>2</sub>R. Αυτά είναι γνωστά ως αυξόχρωμα μόρια και προκαλούν την απορρόφηση να μετατοπιστεί σε μεγαλύτερο μήκος κύματος, δηλαδή μια κόκκινη ή βαθοχρωμική μετατόπιση, καθώς και αύξηση της έντασης του σήματος.<sup>55</sup>

Εκτός από τη φασματοσκοπία UV-Vis, η περιοχή UV-Vis του ηλεκτρομαγνητικού (EM) φάσματος μπορεί να αξιοποιηθεί για την προώθηση του φθορισμού, ο οποίος μπορεί να χρησιμοποιηθεί για εξέταση φιλτραρισμένου φωτός (FLE) και φασματοσκοπία/φθορομέτρηση φθορισμού (εικόνα 29). Όπως και πριν, οι εφαρμογές κυμαίνονται ευρέως από βιολογικές εφαρμογές, όπως αναγνώριση όγκων, έως περιβαλλοντικές, π.χ. ανίχνευση προϊόντων πετρελαίου στο νερό. Η ιατροδικαστική χρήση της φασματοσκοπίας φθορισμού δεν είναι τόσο κοινή όσο η φασματοσκοπία UV Vis, αλλά υπάρχουν εφαρμογές, όπως η ανίχνευση ανθρώπινου σάλιου.<sup>55</sup>



Εικόνα 29: το φαινόμενο του φθορισμού(δ), <https://www.chemistry.uoc.gr/nmr/physchem/Lecture8.pdf>

Στον φθορισμό, το μόριο χάνει ενέργεια εσωτερικά, ως δονητική ενέργεια, φτάνοντας στο χαμηλότερο επίπεδο δόνησης μιας ηλεκτρονικής διεγερμένης κατάστασης. Στη συνέχεια, ένα φωτόνιο φθορισμού εκπέμπεται, ουσιαστικά στιγμιαία, σε μεγαλύτερο μήκος κύματος από το μήκος κύματος διέγερσης, επιστρέφοντας το μόριο στη θεμελιώδη κατάσταση. Η διάρκεια της εκπομπής φωτονίων είναι τυπικά της τάξης των νανοδευτερόλεπτων και σταματά σχεδόν ακαριαία όταν αφαιρεθεί η πηγή διέγερσης. Ο φθορισμός είναι ένας τύπος φωτοφωταύγειας και σε αυτό το πλαίσιο ο φθορισμός UV αναφέρεται σε εκπομπές που διεγείρονται στην περιοχή UV και παρατηρούνται στην ορατή περιοχή. Η δομή μέσα σε ένα μόριο που προκαλεί φθορισμό είναι γνωστή ως φθοροφόρο. Όσο πιο άκαμπτο είναι ένα μόριο τόσο λιγότερο πιθανό είναι να συμβεί χαλάρωση με μη ακτινοβολούμενα μέσα, δηλαδή τόσο πιο πιθανό είναι ο φθορισμός. Τα αρωματικά μόρια, επομένως, είναι ισχυρά φθοροφόρα. Όπως και με τη φασματοσκοπία UV-Vis, το φάσμα φθορισμού ενός

δείγματος μπορεί να επηρεαστεί από την πολικότητα και το pH του διαλύτη και τη θερμοκρασία στην οποία πραγματοποιείται η ανάλυση.

Οι μη πολικοί διαλύτες και οι μειωμένες θερμοκρασίες αυξάνουν την ένταση.

Η εύκολη ποσοτικοποίηση είναι ένα από τα κύρια πλεονεκτήματα της φασματοσκοπίας UV Vis έναντι άλλων φασματοσκοπικών τεχνικών. Σε ιδανική περίπτωση, κατά τον ποσοτικό προσδιορισμό, θα χρησιμοποιηθεί η περιοχή κάτω από την καμπύλη της κορυφής απορρόφησης. Ωστόσο, δεδομένου ότι το τυπικό φάσμα UV-Vis μπορεί να έχει αλληλεπικαλυπτόμενες κορυφές, αυτό δεν χρησιμοποιείται. Μπορεί όμως να επιτευχθεί ποσοτικοποίηση χρησιμοποιώντας τον νόμο Beer-Lambert. Αυτός ορίζει ότι η απορρόφηση (absorption)  $A$ , δηλαδή η διαδικασία απορρόφησης της προσπίπτουσας ακτινοβολίας, είναι ανάλογη του συντελεστή  $\epsilon$ , της συγκέντρωσης  $c$  της ουσίας σε  $M$  και του μήκους  $b$  της οπτικής διαδρομής σε  $cm$  (πάχος κυψελίδας):  $A = \epsilon \cdot b \cdot c$ .<sup>55</sup>

### 3.3.1 Οργανολογία

Όπως στις περισσότερες φασματοσκοπικές μεθόδους, ένα φασματόμετρο  $uv-vis$  αποτελείται από:

- μια πηγή ακτινοβολίας

Συνήθεις πηγές UV-Vis είναι λυχνίες νήματος βολφραμίου, λυχνίες δευτερίου και υδρογόνου, λαμπτήρες τόξου ξένου για την κάλυψη της υπεριώδους και ορατής περιοχής (200-1000 nm) ή φωτοεκπομποί δίοδοι LED για την ορατή περιοχή. Τα τυπικά φασματόμετρα UV-Vis χρησιμοποιούν συνδυαστικά μια λάμπα δευτερίου για την υπεριώδη ακτινοβολία που παράγει φως από 170 έως 375 nm και μια λάμπα νήματος βολφραμίου για την ορατή, η οποία παράγει φως από 350 έως 2500 nm.

- έναν μονοχρωμάτορα (επιλογέας μήκους κύματος)

Ο μονοχρωμάτορας αποτελείται από μια σχισμή εισόδου που καθορίζει την ισχύ της ακτινοβολίας που εισέρχεται στον μονοχρωμάτορα, έναν κατευθυντήρα (φακός ή κάτοπτρο) με τον οποίο η δέσμη γίνεται παράλληλη, ένα στοιχείο διασποράς (πρίσμα ή φράγμα περιθλάσεως) με την περιστροφή του οποίου επιλέγεται το επιθυμητό μήκος κύματος και μια σχισμή εξόδου.

- έναν ανιχνευτή

Οι ανιχνευτές μετατρέπουν το σήμα των φωτονίων της ακτινοβολίας σε ηλεκτρικό σήμα. Ως ανιχνευτές χρησιμοποιούνται φωτολυχνίες, φωτοπολλαπλασιαστές και φωτοδίοδοι. Συνηθέστεροι είναι ο ανιχνευτής συστοιχίας διόδων DAD, μια συσκευή συζευγμένης φόρτισης CCD)

- έναν υπολογιστή με ειδικό λογισμικό.

Επιπλέον, τα τυπικά φασματόμετρα UV-Vis φέρουν μια υποδοχή δείγματος (υποδοχή για κυψελίδα για δείγματα σε διάλυμα). Τα αναλυόμενα δείγματα τοποθετούνται σε κυψελίδες. Οι κυψελίδες κατασκευάζονται από γυαλί για την περιοχή του ορατού και από χαλαζία για την περιοχή του υπεριώδους. Πριν χρησιμοποιηθούν οι κυψελίδες πρέπει να καθαρίζονται, ενώ αν πρόκειται να χρησιμοποιηθούν για διαλύματα οργανικών ουσιών πρέπει να καθαρίζονται με αλκοόλη και αιθέρα.<sup>56</sup>

Τόσο η UV-Vis όσο και η φασματοσκοπία φθορισμού χρησιμοποιούνται συνήθως ως ανιχνευτές για άλλες αναλυτικές τεχνικές, κυρίως υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) αλλά και τριχοειδική ηλεκτροφόρηση (CE).

Όταν ένα δείγμα αναλύεται σε διάλυμα, ο συνήθης διαλύτης είναι 95% αιθανόλη, καθώς είναι διαφανές έως τα 210 nm, έχει καλές ιδιότητες διαλυτοποίησης, είναι



φθηνό και είναι άμεσα διαθέσιμο. Άλλοι διαλύτες όπως εξάνιο, κυκλοεξάνιο, χλωροφόρμιο, μεθανόλη και προπανόλη μπορούν να χρησιμοποιηθούν, ανάλογα με την περίπτωση, για τα μήκη κύματος ενδιαφέροντος.<sup>56</sup>

Πίνακας 3: οι πιο κοινά χρησιμοποιούμενοι διαλύτες και τα ελάχιστα μήκη κύματος στα οποία απορροφούν

| Διαλύτης  | Ελάχιστο μήκος κύματος (nm) |
|---|-----------------------------|
| Acetonitrile, CH <sub>3</sub> CN                              | 190                         |
| Water, H <sub>2</sub> O                                       | 191                         |
| Cyclohexane, C <sub>6</sub> H <sub>12</sub>                   | 195                         |
| Hexane, C <sub>6</sub> H <sub>14</sub>                        | 201                         |
| Methanol, CH <sub>3</sub> OH                                  | 203                         |
| Ethanol, C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH                     | 204                         |
| Diethylether, (C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> ) <sub>2</sub> O | 215                         |
| Dichloromethane, CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>              | 220                         |

Οι τυπικές φασματοσκοπικές τεχνικές συνήθως απαιτούν το δείγμα να είναι σε διάλυμα για να περάσει η πηγή φωτός μέσα από το δείγμα, δηλαδή τον τρόπο μετάδοσης. Η φασματοσκοπία UV-Vis έχει χρησιμοποιηθεί με αυτόν τον τρόπο για την ανάλυση δειγμάτων αραιωμένης μελάνης και πλαστών δειγμάτων ουσίσι. Στην περίπτωση ορισμένων δειγμάτων, π.χ. ουσίσι, αυτό δεν είναι καταστροφικό, αλλά εάν εφαρμοστεί σε μελάνι σε ένα υπό αμφισβήτηση έγγραφο, το μελάνι πρέπει να αξεχθεί από το χαρτί, κάτι που είναι επιζήμιο για τα στοιχεία και, επομένως, ανεπιθύμητο. Μια έρευνα που διεξάγεται στην εγκληματολογική επιστήμη επικεντρώνεται στην ικανότητα των τεχνικών να κάνουν διάκριση μεταξύ δειγμάτων. Στην περίπτωση των τεχνικών που βασίζονται στο UV-Vis, αυτό που ενδιαφέρει είναι η ικανότητα διάκρισης μεταξύ δειγμάτων που φαίνονται το ίδιο χρώμα με γυμνό μάτι αλλά δεν έχουν τα ίδια φασματικά χαρακτηριστικά.

### 3.3.2 Εφαρμογή σε διάφορους τύπους χαρτιών

Η ιατροδικαστική εξέταση εγγράφων είναι ένα ευρύ πεδίο της εγκληματολογικής επιστήμης που ασχολείται με τον τύπο του χαρτιού και του μελανιού και τη διατύπωση και τον χαρακτηρισμό του. Το χαρτί μπορεί να έχει τη μορφή παραδοσιακών εγγράφων όπως πιστοποιητικά, επιστολές αιτήματος, έντυπα εξέτασης, φύλλα απαντήσεων, άδειες, ασφαλιστήρια συμβόλαια, τραπεζικές επιταγές, έγγραφα δανείου, νομικά έγγραφα, επιστολές, αποδείξεις κ.λπ. Επίσης, μπορεί να υπάρχουν περιπτώσεις όπου μια σελίδα από ένα σύνολο εγγράφων σε μια διαθήκη ή πράξη αντικαθίσταται για να δώσει οφέλη σε κάποιον χωρίς προηγούμενη συγκατάθεση όλων των μερών. Μια εφαρμογή της μεθόδου έγινε σε διάφορους τύπους χαρτιών και πιο συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκε για διάκριση διαφόρων τύπων χαρτιών γραφής, γραφείου και φωτοτυπιών που συλλέγονται από χαρτοπωλεία στην Ινδία, με βάση τα φάσματα ανάκλασης και απορρόφησης που κατά τα άλλα φαίνεται να είναι σχεδόν όμοια σε διαφορετικές συνθήκες φωτισμού. Το χαρτί είναι ένα πολύπλοκο σύνθετο υλικό που αποτελείται από διαφορετικά συστατικά. Η σύνθεση ινών, λευκασμένο μαλακό ξύλο (75%) και λευκασμένο σκληρό ξύλο (25%), χρησιμοποιείται για εκτύπωση και γραφή χαρτιού. Υλικό επίστρωσης, πληρωτικά και άλλα συστατικά χρησιμοποιούνται επίσης για την παραγωγή διαφορετικών τύπων χαρτιού. Η Τεχνική Ένωση Βιομηχανίας χαρτοπολτού και



χαρτιού (TAPPI) έχει δώσει κάποια πρότυπα μεθόδων, αλλά δεν μπορούν να εφαρμοστούν για εγκληματολογικούς σκοπούς, καθώς είναι κυρίως καταστροφικοί. Από εγκληματολογικής άποψης η καταλληλότερη τεχνική δεν είναι καταστροφική, χρειάζεται λίγα δείγματα, είναι εύκολα διαθέσιμη και παρέχει γρήγορη αναπαραγωγιμότητα των αποτελεσμάτων.<sup>57</sup>

Η προσέγγιση στην ανάλυση που θα περιγραφεί περιλάμβανε τα ποιοτικά χαρακτηριστικά, την ανάλυση κύριου συστατικού (PCA) και τον συνδυασμό των δύο πρώτων προσεγγίσεων για ολόκληρο το σύνολο των δειγμάτων. Στη συγκεκριμένη ανάλυση τα φύλλα κόπηκαν σε μέγεθος 5 cm \* 5 cm για ευκολία στο χειρισμό του δείγματος. Ωστόσο, σε πραγματικές ιατροδικαστικές εργασίες, τα φύλλα μπορούν να διπλωθούν ανάλογα για να εστιάσουν στη συγκεκριμένη περιοχή, έτσι ώστε να μπορεί να πραγματοποιηθεί μη καταστροφική μέτρηση. Δειγματολήφθηκαν τρεις περιοχές χαρτιού και επιλέχθηκε φασματική περιοχή από 190 έως 1400 nm για σάρωση κάθε δείγματος. Η μέση ανακλαστικότητα μετρήθηκε στην περιοχή 680-900 nm και χρησιμοποιήθηκαν τιμές απορρόφησης φασμάτων υπεριώδους ακτινοβολίας 190-680 nm για ανάλυση κύριου συστατικού (PCA). Καταγράφηκαν όλα τα φάσματα UV-Vis-NIR για όλα τα δείγματα και οι τιμές απορρόφησης για κάθε δείγμα διαιρέθηκαν με τη συνολική απορρόφηση που προέκυψε από κάθε φάσμα και τα αποτελέσματα πολλαπλασιάστηκαν επί 100. Αυτοί οι μετασχηματισμοί έγιναν για να ξεπεραστεί το πρόβλημα της κανονικότητας. Τα περισσότερα δείγματα δείχνουν εξέχουσες κορυφές στα 310, 385 και 580 nm περίπου. Η στατιστική σύγκριση βρέθηκε πολύ αποτελεσματική για τη διάκριση μεταξύ των πλευρών, της όψης Α και της όψης Β, του χαρτιού με σημαντικά αποτελέσματα. Οι προτεινόμενες τρεις προσεγγίσεις εφαρμόστηκαν στο σύνολο των δειγμάτων χαρτιού. Με βάση την πρώτη προσέγγιση, δηλαδή τα ποιοτικά χαρακτηριστικά, παρατηρήθηκε 96,49% διακριτική δύναμη, η οποία δείχνει εξαιρετικά σημαντικά αποτελέσματα με την τεχνική UV-Vis-NIR. Όλα τα δείγματα υπέστησαν διακρίσεις από αυτή την προσέγγιση, εκτός από τέσσερις δείγματα σε σύνολο 19 δειγμάτων. Στη δεύτερη προσέγγιση, η διακριτική ισχύς ενισχύθηκε περαιτέρω με την ενσωμάτωση της στατιστικής μεθόδου PCA σε ένα πλήρες σύνολο 19 δειγμάτων χαρτιού. Αυτή η μέθοδος περιγράφει πώς κάθε φάσμα UV-Vis σε μια ομάδα συνδέεται με τους πρώτους υπολογιστές μέσω αριθμητικών τιμές φόρτωσης. Χρησιμοποιήθηκαν τρεις υπολογιστές. Η ερμηνεία των διαγραμμάτων δείχνει ότι ο πρώτος υπολογιστής αντικατοπτρίζει τις κύριες κορυφές που προκύπτουν στα 305, 380 και 620 nm. Αυτές οι κορυφές ήταν πιο κοινές σχεδόν σε όλα τα φάσματα. Ο δεύτερος υπολογιστής δείχνει τις κορυφές που υπάρχουν στα 255 και 290 nm. Επιπλέον, ο τρίτος υπολογιστής ενισχύει την ένταση αιχμής του πρώτου υπολογιστή στο αντίστοιχο μήκος κύματος. Το PCA ενός πλήρους σετ χαρτιού περιγράφει το 99,70% της διακύμανσης με επαναλαμβανόμενη ανάλυση συστατικών. Όλα τα δείγματα διακρίθηκαν με την προσέγγιση PCA. Στην τρίτη προσέγγιση, τα τέσσερα δείγματα, από ένα σύνολο 19 δειγμάτων, τα οποία δεν διαφοροποιήθηκαν ως προς τα ποιοτικά χαρακτηριστικά, υποβλήθηκαν σε PCA και επιτεύχθηκε διάκριση 99,37% χρησιμοποιώντας ένα διάγραμμα φόρτωσης μεταξύ PC1 και PC2. Επειδή μόνο έξι ζεύγη δειγμάτων δεν μπορούσαν να διακριθούν από ποιοτικά χαρακτηριστικά, ο αριθμός των ζευγών δειγμάτων που διακρίνονται είναι  $171 - 6 = 165$ . Επομένως, με βάση τα ποιοτικά χαρακτηριστικά, διακρίθηκε το 96,49% των δειγμάτων χαρτιού, γεγονός που δείχνει εξαιρετικά σημαντικά αποτελέσματα με την τεχνική UV-Vis-NIR. Από τις τρεις προσεγγίσεις που χρησιμοποιήθηκαν, η δεύτερη και η τρίτη δίνουν

εξαιρετικά σημαντικά αποτελέσματα. Τελικά, η παρούσα φθηνή αναλυτική τεχνική σε συνδυασμό με μια στατιστική μέθοδο PCA μπορεί να είναι κατάλληλη για την διάκριση γραφής, γραφείου και φωτοτυπικού χαρτιού δείγματα.<sup>57</sup>

### 3.3.3 Εφαρμογή μικροφασματοφωτομετρίας υν-vis σε ίνες βαμβακιού

Το βαμβάκι παίζει σημαντικό ρόλο στην παγκόσμια οικονομία ως η κύρια φυσική ίνα για την κλωστοϋφαντουργία. Η ποιότητα των ινών βαμβακιού, ειδικά το μήκος, η λεπτότητα, η αντοχή και η ωριμότητα των ινών είναι οι πιο σημαντικοί παράγοντες για την επεξεργασία υφασμάτων. Το βαμβάκι επεξεργάζεται κυρίως σε μορφή υφάσματος και σπάνια σε μορφή ινών. Η κυτταρίνη είναι το κύριο συστατικό των ινών βαμβακιού, οι οποίες προέρχονται από φυτό που αναπτύσσεται φυσικά. Οι ίνες βαμβακιού περιέχουν από 82% έως 96% κυτταρίνη και μια μικρή ποσότητα μη κυτταρινικών συστατικών (ημικυτταρίνη, λιγνίνη, πηκτίνη). Μια μικρή διαφοροποίηση στη χημική σύνθεση του βαμβακιού μπορεί να συμβεί, ανάλογα με την περιβαλλοντική κατάσταση, όπου έχει καλλιεργηθεί, και τις τεχνολογικές διεργασίες. Η μικροφασματοφωτομετρία (MSP) είναι ένας συνδυασμός μικροσκοπίας και φασματομετρίας. Επιτρέπει τη μέτρηση ενός φάσματος ενός πολύ μικρού δείγματος (περίπου  $100 \mu\text{m}^2$ ) και την εξέταση της μορφολογίας του. Η τεχνική MSP είναι γρήγορη και μη καταστροφική, γεγονός που την κάνει να χρησιμοποιείται ευρέως σε διαφορετικούς τομείς. Στη βιοεπιστήμη, το MSP θα μπορούσε να εφαρμοστεί για τον προσδιορισμό της βιολογικής χρώσης. Στην εγκληματολογική επιστήμη, έχει εφαρμοστεί ευρέως στη χρωματική εξέταση αποδεικτικών στοιχείων, όπως τα χρώματα, τα μελάνια, τα μαλλιά και το χρώμα. Επίσης σε σύγκριση του χρώματος μικρών δειγμάτων όπως μεμονωμένες ίνες, ίχνη μπογιάς ή υλικά γραφής π.χ. μελάνια στυλό.<sup>58</sup> Κατά την ιατροδικαστική ανάλυση μεμονωμένων ινών βαμβακιού, το συγκεκριμένο χρώμα ενός θραύσματος μιας ίνας (κυρίως μήκους 1–3 mm) είναι μια βασική παράμετρος, για τη διαφοροποίηση των στοιχείων μεταξύ των ινών. Το τελικό χρώμα μιας ίνας είναι το αποτέλεσμα της φυσικής τροποποίησης του φωτός από τις χρωστικές ουσίες όπως ανιχνεύεται από το ανθρώπινο μάτι και ερμηνεύεται στον εγκέφαλο. Είναι μια υποκειμενική αντίληψη αλλά η αντικειμενικότητα έχει μεγάλη σημασία στην εγκληματολογία.<sup>58</sup>

Το MSP είναι μια μέθοδος μέτρησης της αλληλεπίδρασης της ακτινοβολίας διαφορετικών μηκών κύματος φωτός κατά μήκος της υπεριώδους και ορατής περιοχής (UV–Vis) όσον αφορά την απορρόφηση ή τη μετάδοση, και έχει την ικανότητα να μετράει το φυσικό αποτέλεσμα αυτής της αλληλεπίδρασης μεταξύ της ακτινοβολίας και η ουσία που εξετάζεται (που περιέχει χρωμοφόρα). Οι βαφές ινών είναι ουσίες που περιέχουν συζευγμένα συστήματα διεγέρσιμων ηλεκτρονίων. Οι φυσικές ίνες, όπως το βαμβάκι, δεν υποδηλώνουν ομοιογενή χημική δομή. Συνεπώς, μπορεί να παρατηρηθεί διακύμανση εντός του δείγματος όσον αφορά την απορρόφησή του ή τη μετάδοση του φωτός. Πολλά χρωματικά μοντέλα έχουν εμφανιστεί με την πάροδο των ετών, τα οποία καθιστούν δυνατό τον προσδιορισμό του χρώματος ενός αντικειμένου που ερευνάται, αποδίδοντάς του μια συγκεκριμένη αριθμητική τιμή. Έχουν γίνει κάποιες προσπάθειες να χρησιμοποιηθούν συντεταγμένες CIE στην εγκληματολογική επιστήμη. Ορισμένοι εξεταστές έχουν

χρησιμοποιήσει τις λεγόμενες συμπληρωματικές συντεταγμένες χρωματικότητας (CCC) αλλά σήμερα στον τομέα των κλωστοϋφαντουργικών προϊόντων το σύστημα CIE και CIEL είναι ευρέως αποδεκτό.<sup>59</sup>

**3.3.4 Εφαρμογή φασματομετρίας υπεριώδους σε μελάνια στυλό**  
Πενήντα μπλε μελάνια στυλό με σφαιρίδια πέντε διαφορετικών εμπορικών σημάτων εξετάστηκαν με βάση το φάσμα Vis των αιθανολικών διαλυμάτων τους με σκοπό την επίτευξη καλής διάκρισης μεταξύ τους. Η ανάλυση μελανιού είναι μια σημαντική ιατροδικαστική διαδικασία που μπορεί να αποκαλύψει χρήσιμες πληροφορίες σχετικά με τα αμφισβητούμενα έγγραφα. Οι περισσότερες από τις εφαρμογές της αφορούν τον εντοπισμό και την επιβεβαίωση αλλαγών σε έγγραφα με σημαντική οικονομική αξία όπως ασφαλιστικές απαιτήσεις, διαθήκες, συμβόλαια και φορολογικές δηλώσεις. Αυτές οι τροποποιήσεις μπορούν να επιβεβαιωθούν με σύγκριση των μελανιών που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή του αμφισβητούμενου εγγράφου ή με εκτίμηση του χρόνου κατά τον οποίο γράφτηκαν οι διάφορες ενότητες του εγγράφου. Τα έγγραφα είναι πολύπλοκα συστήματα που αποτελούνται από πρωτογενή και δευτερεύοντα υλικά. Τα κύρια υλικά περιλαμβάνουν το στήριγμα των εγγράφων (π.χ. χαρτί, χαρτόνι, πολυμερές κ.λπ.) και το κείμενο (π.χ. εναποθέσεις μελανιού, αντίγραφα άνθρακα, τόνερ φωτοτυπικού, μολύβι κ.λπ.). Τα δευτερεύοντα υλικά εμφανίζονται συνήθως σε ένα έγγραφο ως αποτέλεσμα διορθώσεων και χειρισμών και περιλαμβάνουν διορθωτικά υλικά, υπολείμματα σβησίματος, κόλλες, λεκέδες, δακτυλικά αποτυπώματα κ.λπ. Τα σύγχρονα μελάνια περιέχουν ουσίες που στοχεύουν στη βελτίωση των χαρακτηριστικών του μελανιού. Το πιο σημαντικό συστατικό είναι το υλικό χρωματισμού. Αυτό έρχεται με τη μορφή χρωστικών, βαφών ή συνδυασμού και των δύο. Οι βαφές μπορεί να είναι όξινες ή βασικές και είναι διαλυτές στο υγρό σώμα του μελανιού που είναι επίσης γνωστό ως όχημα. Από την άλλη πλευρά, οι χρωστικές είναι λεπτοαλεσμένοι πολυμοριακοί κόκκοι που είναι αδιάλυτοι στο όχημα. Το όχημα, του οποίου η σύνθεση επηρεάζει τα χαρακτηριστικά ροής και ξήρανσης του μελανιού, μπορεί να αποτελείται από λάδια, διαλύτες και ρητίνες. Μια άλλη κατηγορία ουσιών χρησιμοποιείται για τον ακριβή συντονισμό των χαρακτηριστικών του μελανιού. Αυτές οι ουσίες περιλαμβάνουν στεγνωτήρες, πλαστικοποιητές, κεριά, γράσα, σαπούνια και απορρυπαντικά. Οι τεχνικές που αφορούν την ανάλυση των μελανιών μπορούν να χωριστούν σε καταστροφικές και μη καταστροφικές ανάλογα με τις αλλαγές που επιφέρουν στο υπό εξέταση έγγραφο. Στις καταστροφικές μεθόδους, ένα μέρος του μελανιού πρέπει να αφαιρεθεί από το έγγραφο πριν από την ανάλυση. Από την άλλη πλευρά, οι μη καταστροφικές μέθοδοι περιλαμβάνουν την παρατήρηση του μελανιού στο έγγραφο μέσω μιας τεχνικής ανάκλασης που επιτρέπει την καταγραφή των φασματικών χαρακτηριστικών του μελανιού χωρίς να αφαιρείται το δείγμα από το στήριγμα.<sup>60</sup>

Για την παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν πέντε εμπορικά διαθέσιμες μάρκες μπλε μελανιών στυλό (κωδικοποιημένες ως: BI, FC, PE, PI και ST). Για κάθε μάρκα, έγινε δειγματοληψία 10 στυλό της ίδιας παρτίδας μέσω μιας βελόνας από ανοξείδωτο χάλυβα και ελήφθησε ένα μικρό μέρος του δείγματος (λιγότερο από 1 mg) το οποίο στην συνέχεια αραιώθηκε με διαλύτη. Για κάθε στυλό λήφθηκε δείγμα χρησιμοποιώντας διαφορετική βελόνα και το χρωματισμένο με μελάνι άκρο της βελόνας βυθίστηκε σε δοκιμαστικό σωλήνα που περιείχε 10,0 ml απόλυτης

αιθανόλης. Αφού ένα μέρος της μελάνης είχε διαλυθεί στον διαλύτη, το διάλυμα αναδεύτηκε και φυγοκεντρήθηκε στις 2000 στροφές για 10 λεπτά και η απορρόφηση του υπερκειμένου υγρού μετρήθηκε σε φασματοφωτόμετρο JENWAY 6405 UV-Vis σε κυψέλη χαλαζία 1,00 cm έναντι απόλυτης αιθανόλης ως το τυφλό διάλυμα. Το εύρος σάρωσης ήταν 400–750 nm σε διαστήματα 1 nm. Οι τιμές απορρόφησης για κάθε δείγμα διαιρέθηκαν με τη συνολική απορρόφηση που προέκυψε από κάθε φάσμα και τα αποτελέσματα πολλαπλασιάστηκαν επί 100. Τα δείγματα μελάνης της τάξης μεγέθους που χρησιμοποιούνται σε αυτή

τη μελέτη ήταν εξαιρετικά μικρή (λιγότερο από 1 mg) και είναι πολύ δύσκολο να ζυγιστεί και επομένως το κρίνουμε απαραίτητο να χρησιμοποιηθεί ένας μαθηματικός τύπος ώστε να ξεπεραστεί το πρόβλημα των διαφορών στα βάρη των δειγμάτων που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή των διαλυμάτων και τα φάσματα να γίνουν συγκρίσιμα. Τα φάσματα ενδεικτικά παρουσιάζονται στην παρακάτω εικόνα.

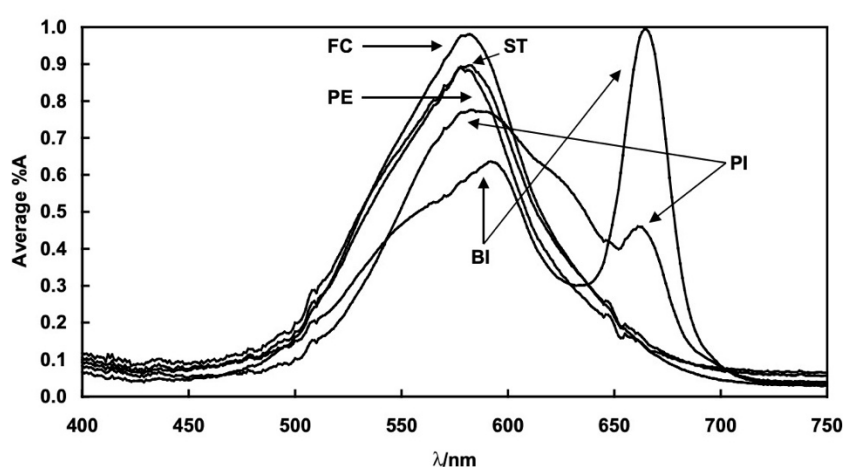


Fig. 1. Average %A vs.  $\lambda$  for all pen brands.

Εικόνα 30: φάσματα υπεριώδους μελανιών στυλό  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S037907380300375X?via%3Dihub>

Κάθε φάσμα αντιπροσωπεύει τη μέση απορρόφηση μελανιών που προέρχονται από την ίδια παρτίδα. Το εύρος μήκους κύματος που επιλέχθηκε στη μελέτη ήταν αυτό της ορατής περιοχής σε μια προσπάθεια να προσομοιωθεί η απόκριση του ανθρώπινου ματιού στα χρωματικά συστατικά των μελανιών. Από τα φάσματα, μπορεί να φανεί ότι τα μελάνια που μελετήθηκαν εμπίπτουν σε δύο κύριες κατηγορίες: τα μελάνια FC, PE, ST έδειξαν φάσμα μονής κορυφής, ενώ τα μελάνια BI και PI είχαν φάσματα διπλής κορυφής. Η πρώτη ζώνη απορρόφησης είχε την αιχμή της στην περιοχή των 570–600 nm και ήταν κοινή για όλα τα μελάνια. Η ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία αυτών των μηκών κύματος φαίνεται κίτρινο πορτοκαλί με γυμνό μάτι και απορροφάται από μπλε κυανές ουσίες. Ως εκ τούτου, η ζώνη που αναφέρεται παραπάνω αποδόθηκε στις μπλε χρωστικές και χρωστικές που περιέχονται σε όλα τα δείγματα. Η δεύτερη ζώνη, η οποία ήταν παρούσα μόνο στην περίπτωση των δειγμάτων BI και PI, είχε την κορυφή της στην περιοχή 660–670 nm. Η ακτινοβολία σε αυτό το εύρος έχει χρώμα πορτοκαλοκόκκινο και απορροφάται από μπλε πράσινες ουσίες. Πράγματι, όταν παρατηρήθηκαν με γυμνό μάτι, τα διαλύματα αυτών των μελανιών είχαν χρώματα που διέφεραν ελαφρώς από αυτά των μελανιών FC, ST και PE. Αυτά τα φάσματα ωστόσο αντιπροσώπευαν μόνο τη διακύμανση μεταξύ των δειγμάτων χωρίς να είναι γνωστό τίποτα για τη διακύμανση εντός του δείγματος. Οπότε αυτά τα φάσματα επιτρέπουν τη διάκριση των δειγμάτων αλλά δεν μπορεί να ειπωθεί κάποιο

συμπέρασμα για τις διαφορές που παρατηρήθηκαν στα φάσματα των μελανιών FC, ST και PE. Δεδομένου ότι τα δείγματα για κάθε μάρκα θεωρήθηκε ότι ανήκουν σε διαφορετικούς πληθυσμούς και μόνο 10 δείγματα από κάθε πληθυσμό ήταν διαθέσιμα, δεν πραγματοποιήθηκαν δοκιμές κανονικότητας, καθώς αυτές οι δοκιμές πραγματοποιούνται μόνο για δείγματα μεγάλων μεγεθών. Αυτή η μελέτη έδειξε ότι θα μπορούσε να επιτευχθεί εξαιρετική διάκριση μεταξύ μελανιών διαφορετικών εμπορικών σημάτων με την εξέταση των φασμάτων Vis των διαλυμάτων αιθανολικής μελάνης και την εφαρμογή ενός πολυμεταβλητού χημειομετρικού πρωτοκόλλου για τη μελέτη της αναλυτικής

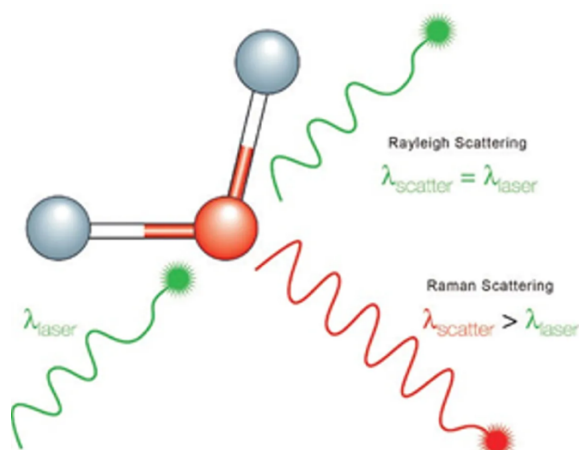
δεδομένα. Η μελέτη έδειξε ότι η διάκριση των δειγμάτων βασίστηκε σε διαφορές που αφορούσαν (α) το σχήμα της πρώτης φασματικής ζώνης, που υπήρχε σε όλες τις περιπτώσεις, (β) την ένταση της δεύτερης ζώνης, η οποία εμφανίστηκε μόνο στην περίπτωση δύο μελανιών και (γ) την απορρόφηση των μελανιών στα άκρα των φασμάτων. Η προτεινόμενη μέθοδος ανιχνεύει τα χρωματικά υλικά στο δείγμα, αλλά αποφεύγει όλα τα χρονοβόρα βήματα που χαρακτηρίζουν τις τεχνικές διαχωρισμού.<sup>61</sup>

### 3.4 Φασματοσκοπία Raman

Το όνομά της προέρχεται από τον ομώνυμο Ινδό Φυσικό, ο οποίος το 1928 διαπίστωσε πως το μήκος κύματος ενός μικρού κλάσματος της ορατής ακτινοβολίας που σκεδάζεται από ορισμένα μόρια, διαφέρει από αυτό της προσπίπτουσας ακτινοβολίας και ότι οι αλλαγές στο μήκος κύματος οφείλονται στη χημική δομή των μορίων που προκαλούν τη σκέδαση. Τα φάσματα λαμβάνονται σε υδατικά διαλύματα και χρησιμοποιούνται κυψελίδες από γυαλί ή χαλαζία. Η φασματοσκοπία Raman είναι μια τεχνική μη καταστροφική, που παρέχει πληροφορίες σχετικά με τη χημική δομή, τη φάση και την πολυμορφία, την κρυσταλλικότητα και τις μοριακές αλληλεπιδράσεις. Βασίζεται στην αλληλεπίδραση του φωτός με τους χημικούς δεσμούς μέσα σε ένα υλικό. Ως εκ τούτου, η φασματοσκοπία Raman μπορεί να χρησιμοποιηθεί μόνη της ή να συμπληρώσει τη φασματοσκοπία υπερύθρων και άλλες αναλυτικές τεχνικές για να βοηθήσει στην αποσαφήνιση της χημικής δομής ενός δείγματος.<sup>62</sup>

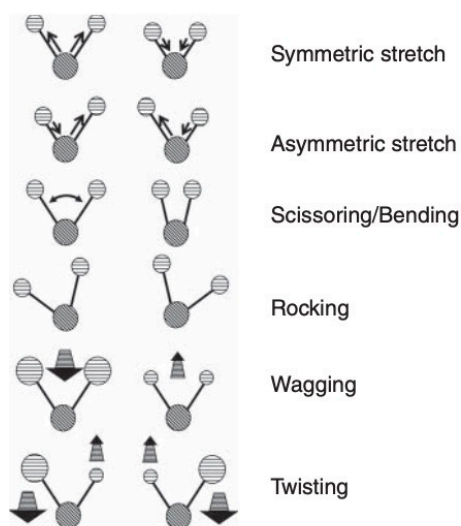
#### Αρχή μεθόδου

Σε αυτή την τεχνική σκέδασης φωτός, ένα μόριο διασκορπίζει το προσπίπτον φως από μια πηγή φωτός λέιζερ με υψηλή ένταση. Το μεγαλύτερο μέρος του φωτός που σκεδάζεται είναι στο ίδιο μήκος κύματος (άρα και χρώμα) με την πηγή λέιζερ και δεν παρέχει χρήσιμες πληροφορίες (σκέδαση Rayleigh). Ωστόσο, μια μικρή ποσότητα φωτός διασκορπίζεται σε διαφορετικά μήκη κύματος, τα οποία εξαρτώνται από τη χημική δομή του αναλύτη (Raman), όπως φαίνεται στην εικόνα 30. Όταν η ακτινοβολία που σκεδάζεται είναι μικρότερης συχνότητας από την ακτινοβολία διέγερσης έχουμε την σκέδαση Stokes, ενώ στη περίπτωση που έχουμε υψηλότερη ενέργεια, λαμβάνουμε σκέδαση αντι Stokes.<sup>63</sup>



Εικόνα 31: σκέδαση Raman και Rayleigh, <https://qvarz.com/el/τι-είναι-η-φασματοσκοπία-raman/>

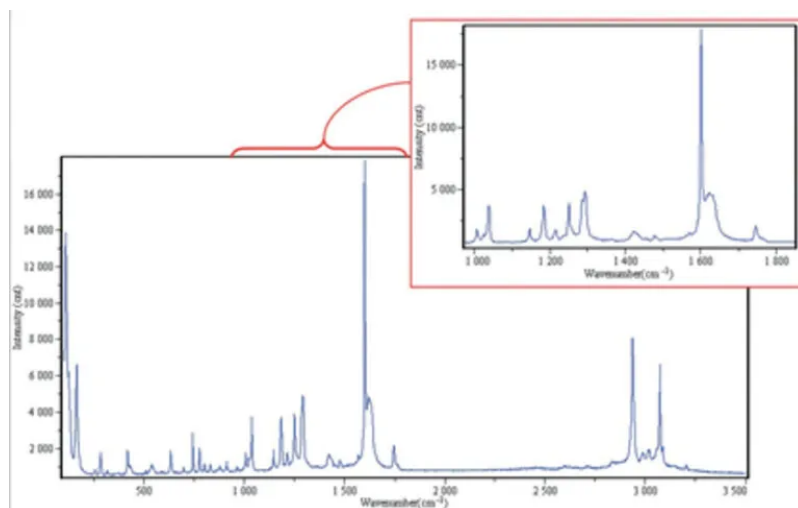
Οι δονήσεις που ασχολούνται με τη φασματοσκοπία Raman είναι αυτές που προκαλούνται από το τέντωμα και την κάμψη των δεσμών σε ένα μόριο. Συγκεκριμένα, συμμετρική και αντισυμμετρική διάταση και τέσσερις τύποι κάμψης, συγκεκριμένα ψαλιδάκι, λίκνισμα, κούνημα και συστροφή (εικόνα 32). Παρόλο που ασχολούνται με τις ίδιες διαφορές στη διεγερμένη κατάσταση ενέργειας και παρέχουν παρόμοιες χημικές πληροφορίες, οι Raman και IR μπορούν να θεωρηθούν ως συμπληρωματικές αναλυτικές τεχνικές. Για να διαπιστωθεί αν μια δόνηση είναι ενεργή Raman ή IR χρησιμοποιούνται μέθοδοι όπως οι υπολογισμοί της θεωρίας συναρτήσεων πυκνότητας (DFT), αλλά αυτό δεν βοηθά απαραίτητα στον εντοπισμό ενός αγνώστου δεδομένου ότι υπάρχουν πολλές ενώσεις με πολύ παρόμοιες δομές και σε ένα εγκληματολογικό πλαίσιο, αυτά τα δεδομένα μπορεί να μην είναι διαθέσιμα.<sup>64</sup>



Εικόνα 32: οι δονήσεις των μορίων <https://qvarz.com/el/τι-είναι-η-φασματοσκοπία-raman/>

Τα φάσματα Raman στα οποία η κάθε κορυφή αντιστοιχεί σε μια συγκεκριμένη δόνηση μοριακού δεσμού, λαμβάνονται ως εξής. Το δείγμα ακτινοβολείται με μια πηγή λέιζερ ορατής ή εγγύς υπεράυθρου μονοχρωματικής ακτινοβολίας. Μετριέται το φάσμα της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας υπό γωνία 90° με ένα φασματοφωτόμετρο. Το μήκος κύματος της διέγερσης πρέπει να είναι μακριά από την περιοχή απορρόφησης του διαλύτη ώστε να αποφύγουμε τον φθορισμό

Μόρια σε δονητικά διεγερμένη κατάσταση εκπέμπουν σκεδαζόμενη ακτινοβολία και παράγουν σήμα Raman ενέργειας  $h(V_{\text{ex}}+V_{\text{v}})$ , όπου  $hV_{\text{ex}}$  είναι η ενέργεια του απορροφούμενου φωτονίου από ένα μόριο στο στη θεμελιώδη κατάσταση. Σε ένα φάσμα χρησιμοποιούμε το τμήμα με τις κορυφές Stokes. Επίσης να αναφέρουμε ότι το μέγεθος των κορυφών Raman είναι ανεξάρτητο από το μήκος κύματος διέγερσης. Παρακάτω παρουσιάζεται ένα φάσμα Raman της ασπιρίνης.<sup>65</sup>



Εικόνα 33: φάσμα Raman ασπιρίνης, <https://qvarz.com/el/τι-είναι-η-φασματοσκοπία-raman/>

Η κορυφή που αποδίδεται σε έναν συγκεκριμένο δεσμό, π.χ. C=O, θα εμφανιστεί περίπου στο ίδιο σημείο, ανεξάρτητα από το μόριο στο οποίο υπάρχει. Υπάρχουν βιβλιοθήκες φασμάτων Raman διάφορων μορίων μέσω των οποίων μπορεί να γίνει σύγκριση και αναγνώριση υλικών. Τα φάσματα αυτά μπορούν να ληφθούν από σχεδόν όλα τα δείγματα που περιέχουν μοριακούς δεσμούς. Άρα δείγματα όπως στερεά, σκόνες, πολτός, υγρά, gel και αέρια μπορούν να αναλυθούν χρησιμοποιώντας τη φασματοσκοπία Raman.<sup>66</sup>

Η οργανολογία ενός φασματοφωτόμετρου Raman είναι πολύ απλή:<sup>66</sup>

- Πηγή , που σχεδόν πάντα είναι πηγή λέιζερ

| Τύπος πηγής λέιζερ | Μήκος κύματος nm |
|--------------------|------------------|
| Ιόντων αργού       | 488 ή 514,5      |
| Ιόντων κρυπτού     | 530,9 ή 647,1    |
| He/Ne              | 632,8            |
| Λέιζερ διόδου      | 785 ή 830        |
| Nd-YAG             | 1064             |

Πίνακας 4: τύποι πηγής λέιζερ, Skoog et. al., Αρχές ενόργανης ανάλυσης, 6η έκδοση, εκδ. Κωσταράκη, Αθήνα, 2002, σελ 557

Οι δυο τελευταίες πηγές εκπέμπουν στην περιοχή του εγγύς υπεράυθρου και χρησιμοποιούνται συνήθως ως πηγές διέγερσης.

- Σύστημα ακτινοβολήσης δείγματος

Συνήθως χρησιμοποιείται ένας υάλινος τριχοειδής σωλήνας μέτρησης σημείου τήξης. Πιο συγκεκριμένα τα αέρια δείγματα τοποθετούνται σε σωλήνες με διάμετρο περίπου 1-2 cm και κλείνονται αεροστεγώς. Τα υγρά δείγματα κλείνονται επίσης

αεροστεγώς σε αμπούλες, υάλινους σωλήνες ή σε τριχοειδείς σωλήνες. Επίσης χρησιμοποιούνται και τριχοειδείς κυψελίδες για δείγματα με όγκο μόλις μερικά νανόλιτρα. Τέλος τα στερεά δείγματα τοποθετούνται συνήθως σε μικρές κοιλότητες. Συνήθως λιοτριβούνται, εκτός από τα πολυμερή που δεν χρειάζονται προετοιμασία.<sup>67</sup>

- Φασματόμετρο

Τα περισσότερα σύγχρονα φασματόμετρα Raman λειτουργούν είτε με μετασχηματισμό Fourier, είτε με όργανα που βασίζονται σε ανιχνευτές σύζευξης φορτίου (CCD). Τα όργανα με μονοχρωμάτορες χρησιμοποιούν και φωτοπολλαπλασιαστές ως μεταλλάκτες, επειδή τα σήματα είναι ασθενή. Πολλά σύγχρονα φασματόμετρα αντί του μονοχρωμάτορα χρησιμοποιούν συστοιχία ανιχνευτών, με πιο σύνθητες τη συστοιχία φωτοδιόδων. Τα όργανα συνδυάζονται με υπολογιστές με ειδικά συστήματα επεξεργασίας των λαμβανόμενων δεδομένων.

Το όργανο FT-Raman χρησιμοποιεί λέιζερ Nd-YAG, μπορούν να μελετηθούν φθορίζουσες ουσίες και οργανικές χρωστικές. Παρέχουν πολύ μεγάλη επαναληψιμότητα σε σχέση με τα συμβατικά. Ωστόσο βασικό μειονέκτημα του συγκεκριμένου οργάνου είναι ότι δεν ενδείκνυται η χρήση υδατικών διαλυμάτων καθώς το νερό απορροφά στα 1000 nm. Όσον αφορά τα όργανα με CCD, μια ζώνη διέλευσης υψηλής ποιότητας, σε συνδυασμό με φίλτρα αποκοπής ζώνης.<sup>67</sup>

Η προετοιμασία δειγμάτων για πολλούς τύπους εγκληματολογικών αποδεικτικών στοιχείων είναι ελάχιστη και συνίσταται στην τοποθέτηση του δείγματος σε μια αντικειμενοφόρο πλάκα ώστε να μπορεί να τοποθετηθεί σε μια σκηνή μικροσκοπίου. Εκτός από την απλότητα της προετοιμασίας του δείγματος, η βαθμονόμηση ενός οργάνου Raman σε καθημερινή βάση είναι απλή. Τυπικά, ένα φάσμα αποκτάται από ένα πυρίτιο στάνταρ με τυπικές ρυθμίσεις οργάνων και το σχήμα και τη θέση της κορυφής, η οποία θα πρέπει να είναι στα  $520\text{ cm}^{-1}$ .<sup>67</sup>

Αναφέρθηκε σε προηγούμενες ενότητες η ανάλυση μελανιών στυλό στα πλαίσια μιας εγκληματολογικής έρευνας, με φασματομετρία uv-vis αλλά και με φασματομετρία Raman. Στις εγκληματολογικές αναλύσεις χρησιμοποιείται συχνότερα ως τεχνική ανάλυσης επιφάνειας σε στερεά δείγματα. Έχει εφαρμοστεί σε μια μεγάλη ποικιλία τύπων εγκληματολογικών αποδεικτικών στοιχείων, όπως μελάνια, βαφές, ίνες, φάρμακα, εκρηκτικά και λιπαντικά προφυλακτικών.

Οι Claybourn & Ansell συνέκριναν και διέκριναν πολλά μαύρα μελάνια χρησιμοποιώντας διέγερση λέιζερ σε μήκη κύματος 514 και 782 nm. Παρατήρησαν ότι τα μαύρα μελάνια καίγονταν εύκολα εκτός εάν χρησιμοποιήθηκαν πολύ χαμηλής ισχύς λέιζερ και ο φθορισμός συναντήθηκε επίσης με το λέιζερ 514 nm αλλά όχι με το

|        |     |                   |
|--------|-----|-------------------|
| λέιζερ | 782 | nm. <sup>68</sup> |
|--------|-----|-------------------|

Περιγράφηκαν επίσης τέσσερις εγκληματολογικές υποθέσεις για να παραδειγματιστεί η δυνατότητα RS για απόδειξη αλλαγών εγγράφων αλλά και οι περιορισμοί της. Οι Savioli et al. μπόρεσαν επίσης να διακρίνουν μονοσήμαντα τα μαύρα και άλλα διαφορετικού χρώματος μελάνια στυλό χρησιμοποιώντας τα μήκη κύματος διέγερσης λέιζερ 633 και 785 nm.<sup>69</sup>

Ο Καλαντζής όμως εστίασε στο πιθανή συμβολή χαρτιού στην ανάλυση μελανιού σε έγγραφα.<sup>70</sup> Οι Morsy et al. συνέκρινε τα RS και SERS(φασματοσκοπία Raman ενισχυμένης επιφάνειας) με εξετάσεις φιλτραρισμένου φωτός,



μικροφασματοφωτογραφία, TLC και EDX για την ανάλυση μπλε και μαύρων μελανιών στυλό. Η RS διαφοροποίησε ένα δείγμα μπλε και ένα μαύρο μελάνι από τα υπόλοιπα μελάνια με βάση αποκλειστικά τον φθορισμό και το SERS διέκρινε δύο άλλα μαύρα μελάνια όταν άλλες τεχνικές απέτυχαν. Αν και η ποιότητα του φάσματος βελτιώθηκε από το SERS, δεν έκανε διακρίσεις στα μπλε μελάνια. Οι συγγραφείς κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι οι RS και το SERS θα πρέπει να χρησιμοποιούνται ως συμπληρωματικά με άλλες μη καταστροφικές τεχνικές.<sup>71</sup>

Τέλος σε άλλη μια έρευνα, ο Kunicki συμφώνησε με τη δυνατότητα σύζευξης του RS ( $\lambda_{exc} = 685 \text{ nm}$ ) με άλλες τεχνικές, όπως φωταύγεια, φασματοσκοπία Απορρόφησης και TLC, στη διαφοροποίηση των υλικών γραφής στις εγκληματολογικές υποθέσεις.<sup>72</sup>

## Κεφάλαιο 4 Βαλλιστική και σύγχρονες προσεγγίσεις της

### 4.1 Γενικά

Βαλλιστική είναι η εξέταση που σχετίζεται με το όπλο και τα φυσίγγια που αυτό δέχεται και μελετά την κίνησή τους αλλά και άλλες παραμέτρους. Διακρίνεται σε:

- Εσωτερική (μελετά το βλήμα ενώ βρίσκεται ακόμα μέσα στο όπλο)
- Εξωτερική (μελετά την κίνηση του βλήματος μέσω του αέρα)
- Τελική (ασχολείται με τη διείσδυση και την αλληλεπίδραση με στερεά από τον πύραυλο)

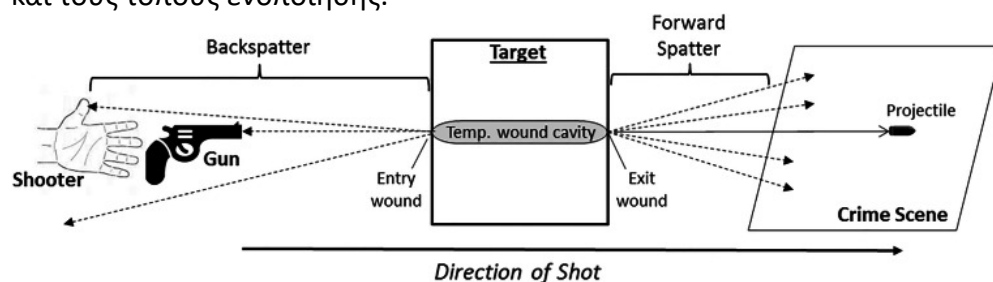
Πιο συγκεκριμένα στην εσωτερική βαλλιστική μελετώνται φαινόμενα από το χρονικό σημείο που ο επικρουστήρας του όπλου κτυπά και πυροδοτεί το καψύλλιο του φυσιγγίου, μέχρι το χρονικό σημείο που το βλήμα εξέρχεται του στομίου της κάννης του όπλου. Στην εξωτερική βαλλιστική μελετώνται τα φαινόμενα της κίνησης του βλήματος από το χρονικό σημείο της εξόδου του από το στόμιο της κάννης του όπλου, μέχρι το χρονικό σημείο της πτώσης (ή της τελικής ακινητοποίησης ή της πρόσκρουσής του σε ένα στόχο). Στην τελική βαλλιστική μελετώνται φαινόμενα από το χρονικό σημείο της πρόσκρουσης, διάτρησης και διαπέρασης ενός βλήματος σε ένα στόχο (αντικείμενο, ανθρώπινο σώμα κ.λπ.), έως και το σημείο της τελικής ακινητοποίησής του. Ασχολείται και με τις επιδράσεις που προκαλούνται στο αντικείμενο-στόχο.<sup>73</sup>

Μια υποδιαίρεση της τελικής βαλλιστικής αποτελεί η τραυματική βαλλιστική που μελετά τις επιδράσεις του βλήματος επί των ανθρωπίνων ιστών, ανάλογα με την πυκνότητα αυτών στο ανατομικό σημείο διέλευσής του βλήματος, σε συνδυασμό με την παρεμβολή οργάνων, οστών, κ.α. Συγκεκριμένα μια σφαίρα μπορεί να προκαλέσει τραυματισμό ή σοβαρότητα τους οποίους εξαρτάται από:<sup>73</sup>

1. Μηχανικός τεμαχισμός ή/και σύνθλιψη του οστού καθώς διατρυπάται ο ιστός
2. Τραυματισμοί διάτμησης, συμπίεσης, διάτασης του ιστού λόγω προσωρινού σχηματισμού κοιλοτήτων (τρυπών)
3. Δευτερογενείς τραυματισμούς λόγω θραύσης της σφαίρας
4. Τη φύση του ιστού που προσβάλλεται

Η βολή ενός βιολογικού στόχου με πυροβόλο όπλο δημιουργεί ένα σύνθετο μοτίβο αποδεικτικών στοιχείων, που περιλαμβάνει κρούσεις, ίχνη και λεκέδες που προκύπτουν από τη βολή του όπλου και τις αλληλεπιδράσεις του βλήματος, του στόχου και του περιβάλλοντος χώρου. Αυτά περιλαμβάνουν, υπολείμματα πυροβολισμού (GSR), μια προσωρινή κοιλότητα τραύματος και μια τροχιά τραύματος εντός του στόχου, καθώς και τα λεγόμενα προς τα εμπρός και προς τα πίσω

πιτσιλίσματα, τις σχετικές ποσότητες, τη σύνθεση, την έκταση, τα πρότυπα κατανομής και τους τόπους ενοποίησης.



Εικόνα 34: πρόσθια (forward spatter) και οπίσθια (back spatter) πιτσιλίσματα  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8205864/#CR4>

## 4.2 Η μέθοδος

Τα υπολείμματα πυροβολισμών αποτελούνται κυρίως από καμένα και άκαυστα οργανικά ή ανόργανα σωματίδια από το εκρηκτικό αστάρι από το φυσιγγίο, το προωθητικό, και πιθανώς θραύσματα της σφαίρας, του φυσιγγιού, ακόμη και του πυροβόλου όπλου, που συχνά περιέχουν Sb, Ba, Pb ή Zn, Cu και Ti. Μπορούν να ανακτηθούν όχι μόνο από τα χέρια και τα ρούχα αλλά και από τη ρινική βλέννα ενός ατόμου που εκτόξευσε ένα πυροβόλο όπλο καθώς και από τον στόχο που χτυπήθηκε από τη βολή. Η ανάλυσή τους μπορεί να δώσει πληροφορίες σχετικά με τον τύπο των πυρομαχικών, την απόσταση βολής και τη χωρική θέση του πυροβόλου όπλου σε σχέση με το περιβάλλον και τον στόχο του. Είναι κυρίως φυσικά και χημικά ίχνη που ανιχνεύονται, διερευνώνται και ποσοτικοποιούνται χρησιμοποιώντας μικροσκοπία, χημικές αναλυτικές και χημειομετρικές μεθόδους, π.χ., ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης, φασματοσκοπία ακτίνων X διασποράς ενέργειας, φασματοσκοπία ατομικής απορρόφησης χωρίς φλόγα και διασπορά ενέργειας φθορισμός ακτίνων.<sup>74</sup> Η βαλλιστική διερεύνηση τραυμάτων, π.χ. κατά τη διάρκεια ιατροδικαστικής αυτοψίας, τραυμάτων εισόδου και εξόδου, ιχνών τραύματος, μόνιμων κοιλοτήτων και των πιο περιφερειακών ζωνών εξαγγείωσης (όπου δεν έχει συμβεί σύνθλιψη και ρήξη από την άμεση επαφή με το βλήμα), μπορεί να διευκολύνει το συμπέρασμα της γωνίας και της απόστασης βολής, του διαμετρήματος, της κινητικής ενέργειας, του σχήματος (και της παραμόρφωσης), του τύπου και του τρόπου κίνησης (π.χ. ανατροπή) του βλήματος.<sup>75</sup>

Όσον αφορά τον εντοπισμό και τον ποσοτικό προσδιορισμό των μεταλλικών υπολειμμάτων που παράγονται από πυροβολισμούς (GSR) που παρέχουν κρίσιμα στοιχεία στις ιατροδικαστικές έρευνες, έχουν αναπτυχθεί χημικές αναλύσεις με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης σε συνδυασμό με ανάλυση ακτίνων X διασποράς ενέργειας (SEM-EDX).<sup>76</sup>

Η βοήθεια αυτή περιλαμβάνει την εξέταση του τύπου του εγκλήματος, την αναγνώριση του τύπου και της πιθανής μάρκας του όπλου που χρησιμοποιείται σε ένα έγκλημα, τη σύνδεση μιας σφαίρας και φυσιγγίου εγκλήματος με ένα ύποπτο όπλο, την εκτίμηση της εμβέλειας, με βάση την κατανομή υπολείμματα εκκένωσης και εξάπλωση του πυροβολισμού στο στόχο.<sup>77</sup>

Το SEM (ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης) σε συνδυασμό με ανίχνευση ακτίνων Χ με διασπορά μήκους κύματος WDX ή ενέργειας EDX, έχει από τότε εφαρμοστεί εκτενώς στην ανάλυση GSR και έχει γίνει η διεθνώς αποδεκτή μέθοδος ανάλυσης. Η χρήση της ανάλυσης SEM-EDX είναι πλεονεκτική καθώς η χαρακτηριστική στοιχειακή σύνθεση και η μορφολογία των σωματιδίων GSR μπορούν να ληφθούν χρησιμοποιώντας αυτήν τη μη καταστροφική μέθοδο. Η αξιοπιστία των τεχνικών SEM βασίζεται στην ανίχνευση μολύβδου (Pb), αντιμονίου (Sb) και βαρίου (Ba) σε διακριτά σωματίδια που προέρχονται από τον εκκινητή. Τα τελευταία χρόνια, πυρομαχικά χωρίς μόλυβδο και βαρέα μέταλλα διατίθενται στο εμπόριο για να ελαχιστοποιηθεί η έκθεση των σκοπευτών σε επικίνδυνα επίπεδα μολύβδου και άλλων τοξικών μετάλλων που υπάρχουν στα πυρομαχικά. Κατά συνέπεια, υπάρχει πιθανότητα για ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα κατά την ανάλυση του GSR χρησιμοποιώντας SEM-EDX. Ένας άλλος περιορισμός του SEM-EDX για ανάλυση GSR είναι ότι τα σωματίδια που βρίσκονται στο IGSR μπορούν επίσης να προέρχονται από μια σειρά περιβαλλοντικών και επαγγελματικών πηγών, συμπεριλαμβανομένων των επενδύσεων φρένων, πυροτεχνήματα, χρώματα και επαγγέλματα χειρισμού φυσιγγίων. Αυτές οι πηγές έχουν αποδειχθεί ότι δημιουργούν σωματίδια που μοιάζουν με IGSR και μπορεί να συμβάλλουν στον κίνδυνο ψευδώς θετικών σε ορισμένες περιπτώσεις. Έχει καταστεί αναγκαίο να επικεντρωθούμε εκ νέου στο πλήρες ενημερωτικό περιεχόμενο του GSR ως ιατροδικαστικό ίχνος και όχι μόνο σε εκείνες τις ενώσεις που αναλύονται εύκολα από το SEM-EDX. Με άλλα λόγια, μπορεί σε ορισμένες περιπτώσεις να χρειαστεί όχι μόνο η ανάλυση του IGSR αλλά και η ανάλυση του OGSR.<sup>78</sup>

Οι πληροφορίες που προέρχονται από τη συνδυασμένη ανάλυση IGSR (ανόργανων υπολειμμάτων πυροβολισμών) και OGSR έχουν τη δυνατότητα να ξεπεράσουν τα ζητήματα που σχετίζονται με ψευδώς θετικά και ψευδώς αρνητικά που προσδιορίζονται παραπάνω. Ως αποτέλεσμα, έχουν γίνει σημαντικές προσπάθειες για τη βελτίωση της ανίχνευσης του OGSR και πολλές από αυτές τις μεθόδους βασίζονται στη φασματομετρία μάζας (MS). Οι σκόνες χωρίς καπνό αποτελούνται κυρίως από νιτροκυτταρίνη (NC) σε συνδυασμό με άλλες εκρηκτικές ενώσεις και πρόσθετα. Αυτά τα πρόσθετα περιλαμβάνουν σταθεροποιητές, πλαστικοποιητές, αναστολείς φλας, ψυκτικά, συγκρατητικά, λιπαντικά επιφανειών και πρόσθετα κατά της φθοράς. Χρησιμοποιούνται για την αύξηση της σταθερότητας και της εργασιμότητας και για την τροποποίηση του ρυθμού καύσης.<sup>79</sup>

Τα υπάρχοντα επίπεδα πρόσθετων κυμαίνονται από ίχνη έως και 50% του μείγματος. Η μοριακή δομή αυτών των ενώσεων μπορεί να ποικίλλει, κάτι που είναι σημαντικό να λαμβάνεται υπόψη κατά την επιλογή μιας κατάλληλης τεχνικής ιονισμού. Ενώ τα εκρηκτικά είναι κυρίως νιτρικές ενώσεις, πολλοί σταθεροποιητές περιέχουν ομάδες αμίνης και οι πλαστικοποιητές είναι συχνά φθαλικές ενώσεις. Λόγω των διαφορετικών χημικών ιδιοτήτων τους, προτιμώνται διαφορετικές τεχνικές ιονισμού. Οι νιτροομάδες είναι ηλεκτρόφιλες και επομένως τα εκρηκτικά παράγουν συνήθως αρνητικό σήμα ιόντων. Τα περισσότερα από τα πρόσθετα που χρησιμοποιούνται σε σκόνες χωρίς καπνό παράγουν έντονα θετικά σήματα ιόντων, για παράδειγμα, ο σταθεροποιητής διφαινυλαμίνη (DPA) και τα παράγωγά του, παραθέτει κοινά

οργανικά εκρηκτικά και πρόσθετα που χρησιμοποιούνται στην κατασκευή σκονών και ασταριών χωρίς καπνό.<sup>80</sup>

Οι περισσότερες τεχνικές MS και στη συγκεκριμένη περίπτωση, συνδυάζονται με χρωματογραφικά συστήματα όπως GC ή LC.

Οι Thomas et. al. ανέπτυξαν μια μέθοδο UHPLC σε συνδυασμό με ένα QqQ-MS που επέτρεψε την ανίχνευση 20 ενώσεων που υπάρχουν στο OGSR. Αυτές οι ενώσεις περιελάμβαναν διφαινυλαμίνες, κεντρίτες, νιτροτολουένια, νιτρογλυκερίνη και διάφορες φθαλικές ενώσεις. Χρησιμοποιήθηκε ταυτόχρονος θετικός και αρνητικός ιονισμός ηλεκτροψεκασμού (ESI) μαζί με χημικός ιονισμός αρνητικής ατμοσφαιρικής πίεσης (APCI) για την ανίχνευση όλων των ενώσεων σε μία μόνο ανάλυση.<sup>81</sup>

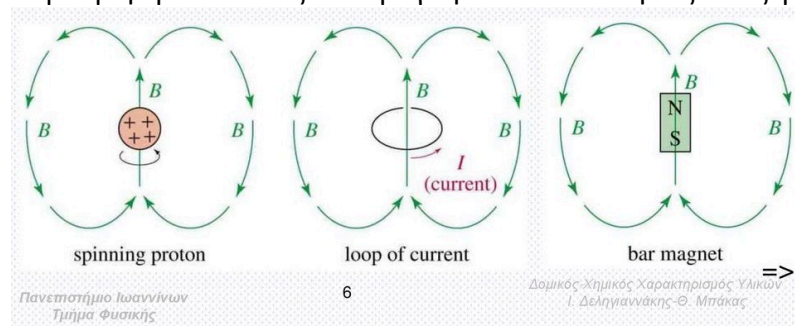
Το GC χρησιμοποιήθηκε από τους Weyermann et al. καθώς επιτρέπει την άμεση εισαγωγή της ίνας SPME στη θύρα έγχυσης, καθιστώντας την κατάλληλη για ανάλυση πτητικών ενώσεων. Πρόσφατα, η μικροεκχύλιση στερεάς φάσης (SPME) ακολουθούμενη από αέρια χρωματογραφία/φασματομετρία μάζας (GC/MS) βρέθηκε ότι είναι επαρκής για την ανάλυση των οργανικών πτητικών υπολειμμάτων που παράγονται από εκκενώσεις κυνηγετικών όπλων. Έξι ενώσεις στόχοι (βενζονιτρίλιο, φαινόλη, 2-αιθυλ-1-εξανόλη, ναφθαλίνη, 1,2-δικυανοβενζόλιο και διφαινυλαμίνη) επιλέχθηκαν και δοκιμάστηκαν ως προς τη σκοπιμότητα ως καθοριστικοί παράγοντες του χρόνου από την απόρριψη σε ένα χρονικό πλαίσιο 32 ωρών. Τα αποτελέσματα ήταν ενθαρρυντικά, ωστόσο η κακή αναπαραγωγικότητα λόγω της χρήσης SPME ήταν ένα σημαντικό μειονέκτημα, ιδιαίτερα για μικρές ποσότητες.<sup>82</sup>

## Κεφάλαιο 5

### Πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός

Όπως σε όλες τις φασματοσκοπίες, έτσι και στον πυρηνικό μαγνητικό συντονισμό μελετάται η αλληλεπίδραση της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας με την ύλη. Το φαινόμενο αυτό συμβαίνει όταν οι πυρήνες ορισμένων ατόμων τοποθετούνται σε ένα ομοιογενές στατικό μαγνητικό πεδίο και διεγείρονται από ένα δεύτερο ταλαντευόμενο μαγνητικό πεδίο. Έτσι μελετώνται φυσικές, χημικές και βιολογικές ιδιότητες. Υπάρχει ο NMR μιας διάστασης, όπου μελετά τις δομές χημικών ενώσεων και ο πολυδιάστατος NMR όπου χρησιμοποιούνται δυο ή περισσότερες διαστάσεις και η χρήση του αφορά τον προσδιορισμό της δομής πολύπλοκων μορίων. Τέλος τεχνικές NMR στο χώρο του χρόνου (πυρηνικής μαγνητική αποδιέγερση) χρησιμοποιούνται για τη μελέτη της δυναμικής ενώσεων σε διαλύματα. Για την διέγερση των πυρήνων πρέπει αυτοί να απορροφήσουν ενέργεια από κάποια πηγή ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας. Η διέγερση αυτή επιτυγχάνεται με την εφαρμογή ενός δεύτερου μαγνητικού πεδίου. Το spin είναι μια θεμελιώδης ιδιότητα της ύλης και αναφέρεται στην αυτοπεριστροφή γύρω από ένα φανταστικό άξονα μεμονωμένων σωματιδίων (ηλεκτρονίων, πρωτονίων, νετρονίων), τα οποία χαρακτηρίζονται από μαγνητικό κβαντικό αριθμό  $+1/2$  ή  $-1/2$ . Οι πυρήνες των ατόμων έχουν πρωτόνια και εκδηλώνουν την ιδιότητα του spin. Η ύπαρξη της αυτοπεριστροφής συνεπάγεται εγγενή πυρηνική μαγνητική ροπή. Δηλαδή οι πυρήνες

συμπεριφέρονται ως ένα μαγνητικό δίπολο ή ως ένας μικροσκοπικός μαγνήτης.

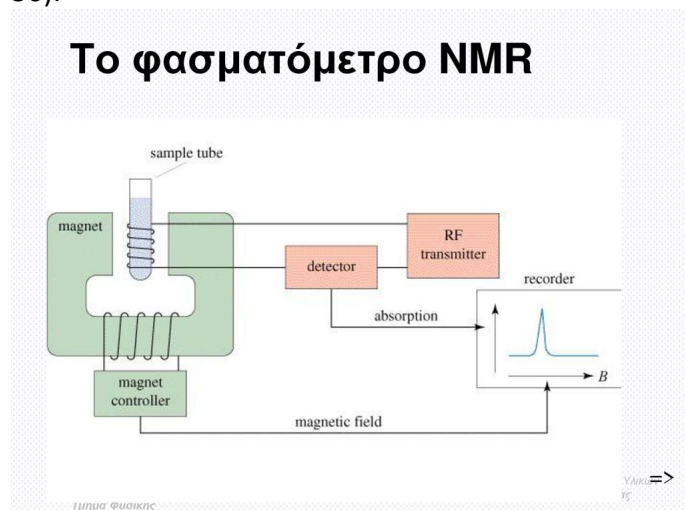


Εικόνα 35: αυτοπεριστροφή (spin) ενός ατόμου, [https://www.researchgate.net/publication/353364635 Benchtop NMR in Forensic Chemistry](https://www.researchgate.net/publication/353364635_Benchtop_NMR_in_Forensic_Chemistry)

Η ένταση του μαγνητικού πεδίου αυξάνεται για ένα προστατευόμενο πρωτόνιο, για να αναστραφεί στην ίδια συχνότητα. Όταν ένας πυρήνας έχει κβαντικό αριθμό μεγαλύτερο από 0 και βρεθεί σε ομογενές μαγνητικό πεδίο με ένταση  $H_0$  ή ισχύ  $B_0$ , συμπεριφέρεται σα μαγνητική ράβδος με γωνιακή ταχύτητα στροφορμής  $\omega$  και στροφορμή  $P$ . Τα φάσματα NMR έχουν την μορφή που βλέπουμε στην εικόνα 35 και παρέχουν τις εξής πληροφορίες:

Ο αριθμός των σημάτων δείχνει τα διαφορετικά είδη πρωτονίων, η θέση των σημάτων δείχνει πόσο προστατευμένο ή απροστάτευτο είναι το πρωτόνιο, η διάσπαση του σήματος δείχνει τον αριθμό των πρωτονίων σε γειτονικά άτομα και η ένταση του σήματος δείχνει τον αριθμό των πρωτονίων.<sup>83</sup>

Το όργανο αποτελείται από τον σωλήνα όπου τοποθετείται το δείγμα, ένα πηνίο σάρωσης, ένα πηνίο δέκτη, έναν μαγνήτη, έναν πομπό και έναν ενισχυτή (εικόνα 36).<sup>83</sup>



Εικόνα 36: τμήματα φασματόμετρου NMR, Δεληγιαννάκης Ι., Δομικός και Χημικός Χαρακτηρισμός των Υλικών: Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού, Ιωάννινα, 2014

Ο πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός (NMR) έχει εξελιχθεί σε μία από τις πιο ευρέως χρησιμοποιούμενες τεχνικές που χρησιμοποιούνται σε διαφορετικά επιστημονικά πεδία. Ωστόσο, μεταξύ των αναλυτικών εργαλείων που είναι διαθέσιμα στους εγκληματολόγους, ο NMR χρησιμοποιείται λιγότερο συχνά, λόγω του τεράστιου κόστους και της πολυπλοκότητας των οργάνων υψηλού πεδίου που χρησιμοποιούν τεχνολογία υπεραγώγιμου μαγνήτη. Τα σύγχρονα φασματόμετρα NMR βασικής βάσης που διατίθενται σήμερα είναι όργανα υψηλής ανάλυσης

που προσφέρουν τα παρακάτω οφέλη:

- Υψηλή αναπαραγωγικότητα και γραμμικότητα
- Μη καταστροφική και απλή προετοιμασία δείγματος
- Δομική αποσαφήνιση ή/και ταυτοποίηση χωρίς δείγμα αναφοράς
- Η ποσοτικοποίηση των ενώσεων σε μια μήτρα είναι δυνατή χωρίς απομόνωση ή υλικό αναφοράς.
- Σύνθετο δακτυλικό αποτύπωμα

Αν και μερικές φορές είναι δύσκολο να αναλυθεί με παραδοσιακή έννοια λόγω της μεγάλης πιθανότητας επικάλυψης κορυφής, τα φάσματα  $^1\text{H}$ -NMR χαμηλού πεδίου παράγουν φάσματα που μοιάζουν με δακτυλικά αποτυπώματα κατάλληλα για δομικές συγκρίσεις μεταξύ πολύ όμοιων ισομερών και αναλόγων.<sup>84</sup>

## 5.2 Εφαρμογές στην εγκληματολογία

Σε μια έρευνα των Duffy et al. μπόρεσαν να διαφοροποιήσουν 65 ανάλογα φεντανύλης και σχετικές ουσίες στα 62 MHz. Η φεντανύλη είναι ένα σύνθετο οπιοειδές που χρησιμοποιείται ως αναλγητικό στην ιατρική και την κτηνιατρική. Υπάρχουν όμως και παράνομα ανάλογά της που κατασκευάζονται και χρησιμοποιούνται λαθραία. Μικρές αλλαγές στη χημική δομή τους, π.χ. μετατόπιση της θέσης λειτουργικών ομάδων όπως μεθυλομάδων ή αλογόνων σε έναν αρωματικό δακτύλιο, δεν διαφοροποιούνται εύκολα χρησιμοποιώντας παραδοσιακές μεθόδους (π.χ. GC-MS). Μια ολοκληρωμένη οδός δομικής διευκρίνισης για ανάλογα περιλάμβανε απομόνωση χρησιμοποιώντας εκχύλιση υγρού-υγρού ή υγρή χρωματογραφία και στη συνέχεια φασματοσκοπία υπερύθρου και φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού  $^1\text{H}$ . Μια πιο εκτεταμένη προσέγγιση στα NPS περιλαμβάνει το GC-MS με EI για κατακερματισμό, τη φασματομετρία μάζας υψηλής ανάλυσης LC (LC-HRMS) με ιονισμό ηλεκτροψεκασμού (ESI) για ιόντα ακριβούς μάζας και  $^1\text{H}$  NMR για τη διαφοροποίηση των ισομερών θέσης. Ορισμένες ουσίες χαρακτηρίστηκαν περαιτέρω χρησιμοποιώντας φασματοσκοπία Raman και  $^{13}\text{C}$  NMR. Το NMR υψηλού πεδίου είναι ένα ισχυρό εργαλείο που χρησιμοποιείται για την απόκτηση διακριτικών δομικών χαρακτηριστικών των NPS. Είναι επωφελής ως μη καταστροφική τεχνική που χρησιμοποιείται για τη διαφοροποίηση των τοποϊσομερών που μπορεί να παράγουν το ίδιο αποτέλεσμα σε κλασικό GC-MS με EI. Το NMR χαμηλού πεδίου είναι λιγότερο δαπανηρό, έχει μικρότερο αποτύπωμα, δεν χρησιμοποιεί κρυογόνα και απαιτεί λίγη συντήρηση. Ένα σύνολο εννέα αναλόγων φεντανύλης που περιέχουν υποκαταστάσεις βουτυρυλίου ή ισοβουτυρυλίου της ομάδας N- προπιονυλίου επιλέχθηκαν για να καταδειχθεί ότι οι χρήσιμες τοπικές δομικές πληροφορίες συχνά διατηρούνται σε φάσματα NMR χαμηλού πεδίου όταν γίνονται υποκαταστάσεις σε διαφορετικές θέσεις γύρω από το μόριο. Τα αρωματικά πρωτόνια απεικονίζουν τις χαρακτηριστικές και σταθερές φασματικές υπογραφές που προκύπτουν από τις διάφορες υποκαταστάσεις στον δακτύλιο ανιλίνης: η διαφοροποίηση των ομάδων βουτυρυλίου και ισοβουτυρυλίου είναι σαφής από τη χημική μετατόπιση, την πολλαπλότητα πρωτονίων και τα μοτίβα διάσπασης των τερματικών μεθυλικών ομάδων και της περιοχής χημικής μετατόπισης από περίπου 3–4 ppm προκύπτουν από αρκετούς αλληλοεπικαλυπτόμενους συντονισμούς πρωτονίων από τη δομή του πυρήνα της φεντανύλης.<sup>85</sup>

Σε μια άλλη έρευνα των Assemet et. al., ελέγχθηκαν δείγματα μπαχαρικών για συνθετικά κανναβινοειδή με χρήση NMR χαμηλού πεδίου. Σαράντα ένα δείγματα μπαχαρικών που κατασχέθηκαν εξετάστηκαν αρχικά χρησιμοποιώντας ανάλυση υψηλού πεδίου  $^1\text{H-NMR}$  στην οποία ανιχνεύθηκαν εννέα συνθετικά κανναβινοειδή. Αυτό έδειξε ότι η ανίχνευση και ο ποσοτικός προσδιορισμός των συνθετικών κανναβινοειδών σε μείγματα μπαχαρικών μπορεί να πραγματοποιηθεί με NMR, με τους συγγραφείς να επισημαίνουν ένα πλεονέκτημα του NMR είναι ότι δεν απαιτείται συγκεκριμένο πρότυπο για ποσοτικοποίηση, κάτι που είναι σημαντικό να λαμβάνεται υπόψη με την αυξανόμενη εμφάνιση νέων ψυχοδραστικών ουσιών. Δεκατρία αντιπροσωπευτικά δείγματα μπαχαρικών αναλύθηκαν στη συνέχεια με  $^1\text{H-NMR}$  στα 60 MHz.<sup>86</sup>

## Κεφάλαιο 6

### Ανάλυση DNA από βιολογικά υλικά

#### 6.1 Εισαγωγή

Το 1985 οι Peter Gill και Alex Jeffreys εφάρμοσαν για πρώτη φορά την τεχνολογία DNA σε εγκληματολογικά προβλήματα. Έκτοτε περισσότερες από 50.000 υποθέσεις παγκοσμίως έχουν επιλυθεί μέσω της χρήσης τεχνολογίας που βασίζεται στο DNA και όλο και περισσότερα δικαστήρια αποδέχονται τα αποδεικτικά στοιχεία που βασίζονται στο DNA. Μετά την ανακάλυψη της δομής του DNA το 1953, η τεχνολογική πρόοδος στη βιοϊατρική έχει επιτρέψει την ταυτοποίηση, περισσότερων από 150.000 γονιδίων που κωδικοποιούνται από περίπου 3 δισεκατομμύρια ζεύγη βάσεων DNA που περιέχονται από τα 23 ζεύγη σωματικών χρωμοσωμάτων, μέσω του Έργου Ανθρώπινου Γονιδιώματος. Ορισμένα γονίδια είναι πιο ανεκτικά σε μεταλλάξεις και μπορεί να έχουν περισσότερες από μία μορφές- αλληλόμορφα του συγκεκριμένου γονιδίου. Οι τόποι με αλληλόμορφα που εμφανίζονται σχετικά συχνά ονομάζονται πολυμορφικοί, ενώ εκείνοι που δεν έχουν αλληλόμορφα ονομάζονται μονομορφικοί. Είναι επίσης γνωστό ότι οι αλληλουχίες DNA σε πολλούς τόπους δεν κωδικοποιούν κάποιο γονίδιο. Αυτοί οι τόποι είναι εξαιρετικά πολυμορφικοί λόγω της παρουσίας πολλαπλών αλληλόμορφων που αντιπροσωπεύονται από διαφορετικούς αριθμούς επαναλαμβανόμενων τμημάτων. Αυτά τα επαναλαμβανόμενα τμήματα αναφέρονται ως διαδοχικές επαναλήψεις μεταβλητού αριθμού (VNTR). Η πιο κοινή μέθοδος που χρησιμοποιείται για την ανάλυση των VNTRs είναι ο πολυμορφισμός μήκους θραύσματος (AFLP).<sup>87</sup>

Υπάρχουν δύο κύριες εφαρμογές της ανάλυσης DNA στην ιατροδικαστική: η ποινική έρευνα και ο έλεγχος πατρότητας. Οι επιστήμονες χρησιμοποιούν εργαλεία μοριακής βιολογίας για να χαρακτηρίσουν ιατροδικαστικά βιολογικά στοιχεία. Εκτός της χρήσης της ανάλυσης πολυμορφισμού περιοριστικού μήκους με μεθόδους υβριδισμού με βάση την κηλίδα Southern, χρησιμοποιούνται πλέον τακτικά και μέθοδοι που βασίζονται σε PCR σε συνδυασμό με αυτοματοποιημένες τεχνολογίες ανίχνευσης φθορισμού. Η χρήση βάσεων δεδομένων του παραβάτη και του εγκληματολογικού δείγματος DNA συμβάλλει στην επιφυλακτικότητα για αλλαγές. Αυτές οι βάσεις δεδομένων αναπτύχθηκαν για να βοηθήσουν στη διερεύνηση του εγκλήματος και έχουν τυποποιηθεί σε ένα βασικό σύνολο σύντομων διαδοχικών επαναλήψεων (STR) ή μικροδορυφορικών τόπων. Η επιτυχία και η ευρεία αποδοχή της τυποποίησης DNA

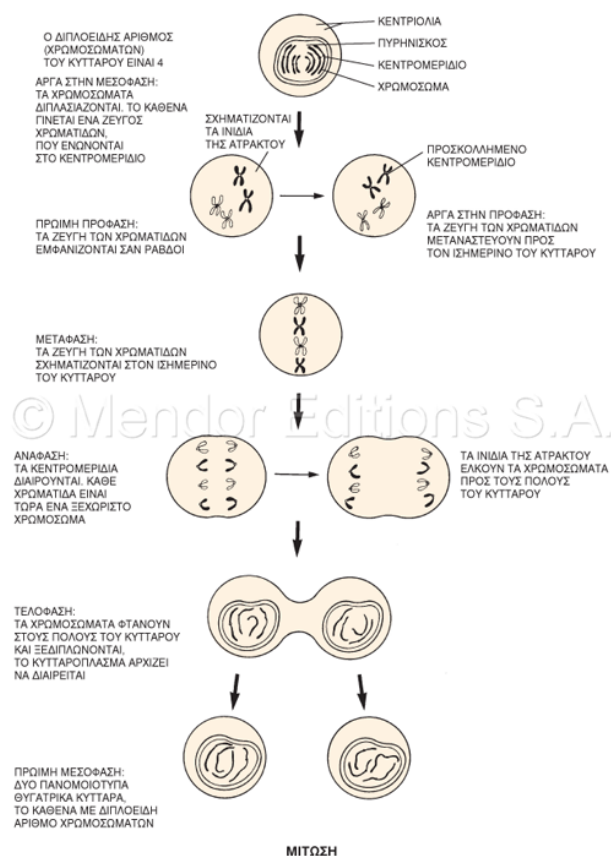


στην εγκληματολογική επιστήμη οφείλεται εν μέρει στην ευαισθησία της ανίχνευσης, με τη χρήση PCR και στην ικανότητά της να αναλύει ελάχιστα δείγματα. Ωστόσο, όταν μόνο λίγα μόρια μήτρας είναι διαθέσιμα για PCR, θα συμβεί στοχαστική ενίσχυση και ο βαθμός του αποτελέσματος σχετίζεται με τον αριθμό των μορίων μήτρας. Για βραχείς τόπους διαδοχικής επανάληψης (STRs) των οποίων τα αλληλόμορφα βασίζονται σε ποικίλο αριθμό διαδοχικών επαναλήψεων, οι στοχαστικές επιδράσεις εκδηλώνονται ως ουσιαστική ανισορροπία δύο αλληλόμορφων σε μια δεδομένη ετερόζυγη θέση, αλληλική εγκατάλειψη και αυξημένο τραυλισμό. Τα δείγματα χαμηλής ποσότητας για την αναγνώριση ανθρώπινων υπολειμμάτων και τα εγκλήματα μεγάλου όγκου (όπως οι διαρρήξεις) είναι άφθονα και θα μπορούσαν να οδηγήσουν στην επίλυση αυτών των εγκλημάτων. Επιπρόσθετα, η πληκτρολόγηση επιπέδων ίχνους DNA για την παρακολούθηση ατόμων ή για τον προσδιορισμό παραβιάσεων ασφαλείας θα ενίσχυε περαιτέρω τις προσπάθειες κατά της τρομοκρατίας. Υπάρχουν πολλές στρατηγικές για να κατασκευαστεί η δημιουργία προφίλ DNA LCN. Αυτές περιλαμβάνουν απλώς την αύξηση του αριθμού των κύκλων PCR από 28 σε 34, η μείωση του όγκου PCR, εφαρμογή ενός σταδίου καθαρισμού μετά την PCR για τη συγκέντρωση του δείγματος για ανάλυση και την απομάκρυνση ανταγωνιστικών ιόντων, η αύξηση του χρόνου ηλεκτροφορητικής έγχυσης και τέλος χρησιμοποιώντας ένθετη PCR ή χρησιμοποιώντας καλύτερη αναλογία σήματος προς θόρυβο φθορίζουσες ετικέτες.<sup>88</sup>

## 6.2 Το DNA και οι πολυμορφισμοί

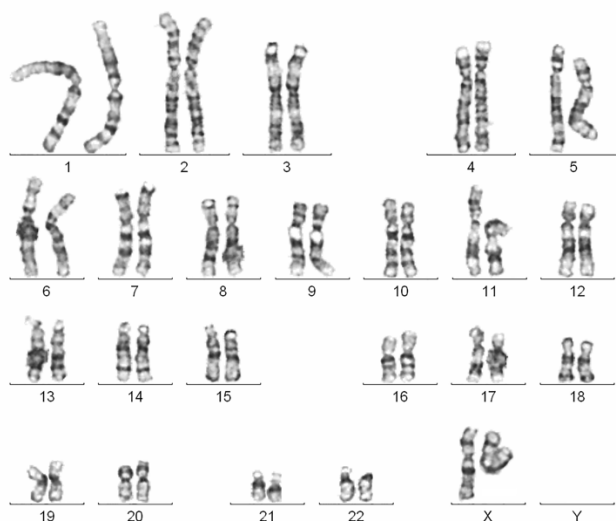
Το ανθρώπινο DNA είναι ένα μόριο που αποτελείται από δυο κλώνους, τις πολυνουκλεοτιδικές αλυσίδες και η κάθε μία αποτελείται από νουκλεοτίδια. Κάθε νουκλεοτίδιο περιλαμβάνει μια δεοξυριβόζη (πεντόζη) ενωμένη με μια φωσφορική ομάδα και μια αζωτούχα βάση εκ των αδενίνη, θυμίνη, γουανίνη και κυτοσίνη. Μια πολυνουκλεοτιδική αλυσίδα σχηματίζεται από την ένωση πολλών νουκλεοτιδίων με έναν ομοιοπολικό δεσμό (φωσφοδιεστερικός δεσμός). Τα ευκαρυωτικά κύτταρα περιέχουν το γενετικό υλικό στον πυρήνα. Τα επίπεδα οργάνωσής του είναι τρία. Αρχικά η διπλή έλικα του DNA ενώνεται με τις πρωτεΐνες που ονομάζονται ιστόνες και δομούν τα νουκλεοσώματα. Αυτά αναδιπλώνονται στην συνέχεια και σχηματίζουν τα ινίδια χρωματίνης. Τα ινίδια κατά την κυτταρική διαίρεση συσπειρώνονται και δημιουργούν τα χρωμοσώματα. Κάθε χρωμόσωμα αποτελείται από ένα ινίδιο χρωματίνης ενώ κάθε διπλασιασμένο χρωμόσωμα περιλαμβάνει δυο ινίδια χρωματίνης, ενωμένα στο κεντρομερίδιο. Το κεντρομερίδιο χωρίζει τα χρωμοσώματα σε δύο βραχίονες, έναν μικρό και έναν μεγάλο. Η κυτταρική διαίρεση ενός κυττάρου ονομάζεται μίτωση. Πριν από την έναρξη της μίτωσης έχει προηγηθεί η αντιγραφή του DNA και συνεπώς ο διπλασιασμός της γενετικής πληροφορίας. Μετά την αντιγραφή κάθε χρωμόσωμα αποτελείται πλέον από τα δύο αντίγραφα του DNA, που ονομάζονται αδελφές χρωματίδες. Στο τέλος της μίτωσης ακολουθεί συνήθως ο διπλασιασμός του κυττάρου έτσι ώστε από το ένα αρχικό κύτταρο να προκύψουν δύο θυγατρικά. Κατά τη μίτωση, τα κύτταρα παραμένουν διπλοειδή.





Εικόνα 37: Τα στάδια της μίτωσης <https://www.iatronet.gr/iatriko-lexiko/mitwsi.html>

Ομόλογα χρωμοσώματα ονομάζονται δυο πανομοιότυπα χρωμοσώματα με ίδιο μήκος, σχήμα και θέση κεντρομεριδίου, το ένα μητρικής και το άλλο πατρικής προέλευσης. Καρυότυπος ονομάζεται η απεικόνιση των μεταφασικών χρωμοσωμάτων ενός κυττάρου σε ζεύγη και κατά ελαττούμενο μέγεθος. Διακρίνονται τα αυτοσωμικά και τα φυλετικά χρωμοσώματα. Κάθε φυσιολογικό άτομο διαθέτει 23 ζεύγη χρωμοσωμάτων. Τα 22 είναι αυτοσωμικά και το ένα είναι φυλετικό και καθορίζει το φύλο. Η απουσία του φυλετικού χρωμοσώματος Y καθορίζει το αρσενικό φύλλο. Τα χρωμοσώματα μελετώνται στο στάδιο της μετάφασης της μίτωσης, όπου εμφανίζουν τον μεγαλύτερο βαθμό συσπείρωσης. Πολυμορφισμοί DNA είναι οι εναλλακτικές μορφές ενός χρωμοσωμικού τόπου οι οποίες διαφέρουν ως προς την αλληλουχία των νουκλεοτιδίων (A, T, G, C).<sup>89</sup>



Εικόνα 38: Καρυότυπος φυσιολογικού ατόμου γένους θηλυκού (διακρίνεται από την απουσία Y φυλετικού χρωμοσώματος, <https://repository.kallipos.gr/handle/11419/602>)

Το γενετικό υλικό περιλαμβάνει αλληλουχίες που περιέχουν γενετικές πληροφορίες (κωδικοποιητικές) αλλά και άλλες περιοχές που καλύπτουν το μεγαλύτερο μέρος του γονιδιώματος που δεν περιέχουν γενετικές πληροφορίες (μη κωδικοποιητικές). Το μη κωδικοποιητικό DNA αποτελείται από το μοναδικό και το επαναλαμβανόμενο DNA. Το επαναλαμβανόμενο DNA μπορεί να υποδιαιρείται σε διαδοχικές επαναλήψεις / tandem repeats (ριβοσωμικό RNA, οικογένειες γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνη, δορυφόροι, τελομερές DNA, κεντρομερές DNA) ή διεσπαρμένες επαναλήψεις/interspersed repeats (κυρίως τρανσποζόνια και ρετροτρανσποζόνια αλλά και ρετρομεταφερόμενες αλληλουχίες και ορισμένες οικογένειες γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες). Οι πρώτες εντοπίζονται ως αντίγραφα μοτίβου επανάληψης το ένα δίπλα στο άλλο, ενώ οι δεύτερες βρίσκονται διασκορπισμένες σε όλο το γονιδίωμα ως μεμονωμένες μονάδες. Σε αυτές τις μη κωδικοποιητικές περιοχές όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, συχνά συμβαίνουν πολυμορφισμοί.<sup>90</sup>

Συγκεκριμένα, το επαναλαμβανόμενο DNA ταξινομείται σε 3 ομάδες:

- Το δορυφορικό (satellites): πολύ επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες DNA μήκους από ένα ως χιλιάδες βάσεις, βρίσκεται άφθονο στα χρωμοσωμικά κεντρομερίδια, στα τελομερή και στην ετεροχρωματίνη εντοπίζεται όμως και στον μακρύ βραχίονα του χρωμοσώματος Y.
- Το μικρό δορυφορικό (micro satellites): μικρές επαναλαμβανόμενες μονάδες STRs, μήκους 1-5 ζευγών βάσεων. Συχνότερη επανάληψη είναι η CA (κυτοσίνη, αδερίνη). Βρίσκονται στο γονιδίωμα αλλά και στην ευχρωματίνη και χρησιμοποιούνται συχνά ως γενετικοί δείκτες. Συχνά εμφανίζουν πολυμορφισμούς.
- Το μίνι δορυφορικό (mini satellites): πολύ μικρές διαδοχικές επαναλήψεις, με εντόπιση κυρίως στα τελομερή των χρωμοσωμάτων. Εμφανίζονται και εδώ πολυμορφισμοί και φέρουν πολλαπλά αλληλόμορφα που χρησιμοποιούνται ως γενετικοί δείκτες VNTRs (μεταβλητός αριθμός διαδοχικών επαναλήψεων).

Ο αριθμός των θέσεων σύντομης διαδοχικής επανάληψης που επικυρώθηκαν για εγκληματολογική χρήση έχει πλέον αυξηθεί σε τουλάχιστον 13 όπως θα δούμε και παρακάτω. Η επισκόπηση των παγκόσμιων δεδομένων σχετικά με την έκταση του πολυμορφισμού σε αυτούς τους 13 τόπους STR, επί του παρόντος επικυρωμένα για ιατροδικαστική και ανάλυση πατρότητας, δείχνει ότι αυτοί οι τόποι μαζί έχουν επαρκή ισχύ για την επίλυση των περισσότερων ιατροδικαστικών υποθέσεων και υποθέσεων πατρότητας. Ωστόσο, τα δεδομένα που συλλέγονται για την επικύρωση αυτών των τόπων για εγκληματολογική χρήση έχουν χρησιμότητα πέρα από την ανθρώπινη αναγνώριση. Η εγκληματολογία DNA περιλαμβάνει συγκρίσεις προφίλ DNA αποδεικτικών δειγμάτων με αυτά ενός ή περισσότερων γνωστών υποκειμένων, προκειμένου να εντοπιστεί, να περιοριστεί ή να αποκλειστεί η πηγή προέλευσης των συστατικών των δειγμάτων αποδεικτικών στοιχείων.<sup>91</sup>

Οι λειτουργικές συνέπειες των επαναλήψεων περιλαμβάνουν τη δημιουργία μεταβλητότητας με κίνηση και εισαγωγή στο γονιδίωμα (δίνοντας χρήσιμους γενετικούς δείκτες), τον ορισμό των κεντρομερών, την έκφραση υπό συνθήκες στρες και τη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης μέσω τμημάτων RNA.<sup>92</sup>

|   |         |      |
|---|---------|------|
| Η | ανάλυση | RFLP |
|---|---------|------|

Μια κατηγορία δεικτών DNA που χρησιμοποιούνται συχνά στην εγκληματολογική ανάλυση DNA είναι πολυμορφισμοί μήκους περιοριστικού θραύσματος (RFLP). Το DNA απομονώνεται με οργανικούς διαλύτες και εκχυλίζεται με αιθανόλη, στην συνέχεια χωνεύεται με περιοριστικές ενδονουκλεάσες και τα θραύσματα που δημιουργούνται διαχωρίζονται με ηλεκτροφόρηση συνήθως σε αгарόζη. Στη συνέχεια το DNA μετουσιώνεται με υδροξειδίου του νατρίου, ώστε να δημιουργηθούν μονόκλωνα τμήματα DNA και μεταφέρεται σε μεμβράνη θετικά φορτισμένη με αλκαλικό μέσο. Το ρυθμιστικό διάλυμα ρέει μέσα από διηθητικά χαρτιά, τη γέλη, τη μεμβράνη και ξανά διηθητικά χαρτιά τα οποία βρίσκονται πάνω από τη μεμβράνη και τέλος στο στεγνό απορροφητικό χαρτί και έτσι δημιουργεί ένα στύπωμα (κατά Southern). Αφού ολοκληρωθεί η μεταφορά ελέγχεται ξανά η γέλη υπό υπεριώδες φως ώστε να ελεγχθεί ότι όλα τα τμήματα του DNA έχουν μεταφερθεί επιτυχώς στη μεμβράνη. Έπειτα το DNA επώαζεται με ανιχνευτές οι οποίοι υβριδοποιούνται με συγκεκριμένες περιοχές VNTR και στην συνέχεια ακολουθούν πλύσεις για την απομάκρυνση της περίσσειας ανιχνευτών. Για την οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων η μεμβράνη εκτίθεται σε φιλμ ακτίνων Χ.<sup>93</sup> Με την τεχνολογία RFLP μελετώνται δύο κύριοι τύποι πολυμορφισμού DNA: οι αλλαγές μιας βάσης και οι μικροδορυφορικοί τόποι VNTR. Ανώνυμοι γονιδιωματικοί κλώνοι χαμηλού αριθμού αντιγράφων χρησιμοποιούνται συχνά για την απεικόνιση πολυμορφισμών. Η ανίχνευση RFLP με υβριδοποίηση στύπωσης κατά Southern όμως είναι ασυμβίβαστη με την υψηλή αναλυτική απόδοση που απαιτείται για πολλές εφαρμογές καθώς απαιτείται μεγάλη ποσότητα DNA (δείγματα που περιείχαν τουλάχιστον 10-25 ng DNA).<sup>93</sup>

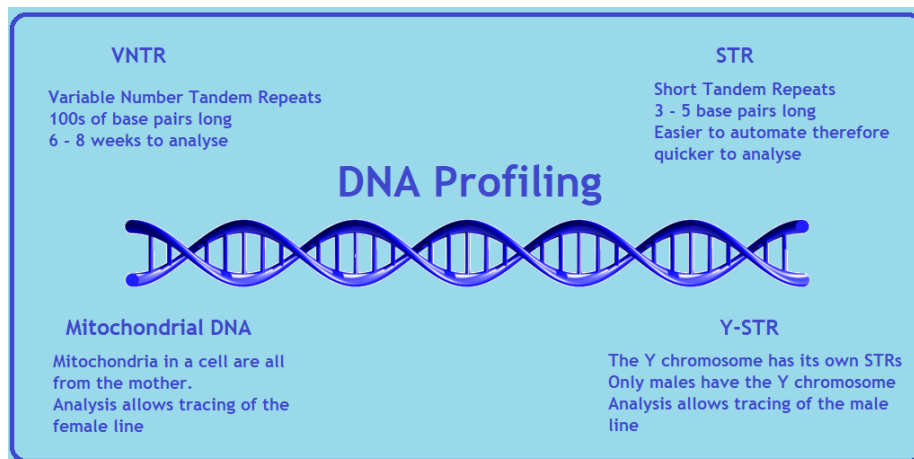
Έτσι από τα μέσα της δεκαετίας του 1980, η πιο κοινή μέθοδος που χρησιμοποιείται στην ιατροδικαστική ανάλυση DNA ήταν η ανάλυση των μικροδορυφορικών θέσεων VNTR. Αυτοί οι τόποι ποικίλλουν σε μήκος λόγω της διακύμανσης στον αριθμό των επαναλαμβανόμενων τμημάτων DNA σε έναν συγκεκριμένο τόπο. Οι

χρησιμοποιούμενοι τόποι VNTR περιέχουν επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες που ποικίλλουν μεταξύ 15 και 70 ζευγών βάσεων. Η τυποποίηση των συστημάτων δοκιμής στη επιστημονική επιστήμη οδήγησε στη χρήση του περιοριστικού ενζύμου HaeIII στις Ηνωμένες Πολιτείες και του ενζύμου HinfI στην Ευρώπη, με άλλες χώρες να επιλέγουν ένα από τα δύο συστήματα. Ωστόσο, αυτή η τεχνική απαιτεί σχετικά μεγάλη ποσότητα DNA, είναι εντατική και χρονοβόρα, και σε ορισμένες περιπτώσεις απαιτεί τη χρήση ραδιοδραστικότητας. Άλλες δοκιμασίες πολυμορφισμού που βασίζονται στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR), απαιτούν πληροφορίες αλληλουχίας DNA στόχου για το σχεδιασμό των εκκινητών ενίσχυσης.<sup>94,95</sup>

Για να ξεπεραστούν ορισμένοι από αυτούς τους περιορισμούς, αναπτύχθηκε το προφίλ ενός τόπου. Εδώ ένας μοναδικός μεταβλητός τύπος ανιχνεύεται από έναν ειδικό ανιχνευτή μονής θέσης (SLP) χρησιμοποιώντας υβριδισμό υψηλής αυστηρότητας. Όλες αυτές οι διαφορετικές μέθοδοι που βασίζονται στον πολυμορφισμό μήκους θραυσμάτων περιορισμού (RFLP) εξακολουθούσαν να περιορίζονται από τη διαθέσιμη ποιότητα και ποσότητα του DNA και επίσης να παρεμποδίζονται από τις δυσκολίες αξιόπιστης σύγκρισης γενετικών προφίλ από διαφορετικές πηγές, εργαστήρια και τεχνικές. Αυτό που χρειαζόταν ήταν ένας κωδικός DNA, ο οποίος θα μπορούσε ιδανικά να δημιουργηθεί ακόμη και από ένα μόνο πυρηνωμένο κύτταρο και από εξαιρετικά υποβαθμισμένο DNA, έναν κώδικα που θα μπορούσε να δημιουργηθεί γρήγορα, να κρυπτογραφηθεί αριθμητικά ακριβή και να υποστηριχθεί εύκολα στο δικαστήριο.<sup>94</sup>

### Η ανάλυση DNA fingerprinting

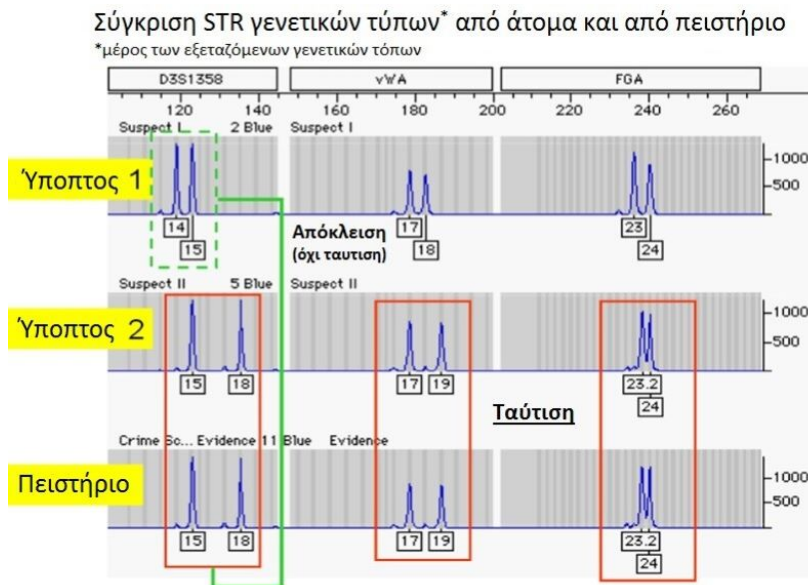
Στο DNA fingerprinting, γνωστό και ως DNA profiling ή DNA typing, μια συγκεκριμένη περιοχή του DNA ενός ατόμου αναλύεται για να δημιουργηθεί ένα μοναδικό αναγνωριστικό, όπως ένα δακτυλικό αποτύπωμα. Αυτές οι περιοχές είναι οι σύντομες διαδοχικές επαναλήψεις (STR) ή μικροδορυφορικοί τόποι, μέρος μιας υποκατηγορίας των εξαιρετικά πολυμορφικών τύπων VNTR και έχουν αντικαταστήσει τους πρώιμους γενετικούς δείκτες. Οι ιατροδικαστικά σημαντικοί αυτοσωμικοί τόποι STR αποτελούνται από διαδοχικά επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες, καθεμία από τις οποίες έχει μήκος μόνο τεσσάρων bp (με δύο τύπους να αποτελούνται από επαναλαμβανόμενες μονάδες πεντανουκλεοτιδίου). Ο αριθμός των αλληλόμορφων των ιατροδικαστικά σχετικών τύπων STR κυμαίνεται συνήθως από 5 έως 20 κοινά αλληλόμορφα. Τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα δείγματα DNA για αυτήν την ανάλυση λαμβάνονται από βιολογικά υλικά, όπως αίμα, σάλιο, σπέρμα, τρίχες ή άλλους ιστούς που περιέχουν πυρηνωμένα κύτταρα.



Εικόνα 39: γενετικοί δείκτες ανάλυσης DNA, <https://mozartcultures.com/en/a-short-history-of-dna-profiling/>

Στην κλασική μέθοδο δακτυλικών αποτυπωμάτων DNA, ραδιοσημασμένοι ανιχνευτές DNA που περιέχουν μικροδορυφόρους ή ολιγονουκλεοτιδικές αλληλουχίες υβριδίζονται με DNA που έχει υποστεί πέψη με ένα ένζυμο περιορισμού, διαχωρίζεται με ηλεκτροφόρηση αгарόζης και ακινητοποιείται σε μεμβράνη με κηλίδωση Southern ή σε η περίπτωση των ολιγονουκλεοτιδικών ανιχνευτών, ακινητοποιημένοι απευθείας στο αποξηραμένο πήκτωμα. Ο ραδιοσημασμένος ανιχνευτής υβριδίζεται με ένα σύνολο μινιδορυφόρων ή ολιγονουκλεοτιδικών εκτάσεων στο γονιδιωματικό DNA που περιέχεται σε θραύσματα περιορισμού των οποίων το μέγεθος διαφέρει λόγω της διακύμανσης του αριθμού των επαναλαμβανόμενων μονάδων. Μετά την απομάκρυνση της περίσσειας του ανιχνευτή με πλύση, η έκθεση σε φιλμ ακτίνων X (αυτοακτινογραφία) επιτρέπει την οπτικοποίηση αυτών των μεταβλητών θραυσμάτων και τη σύγκριση των προφίλ τους μεταξύ ατόμων.

Τα ενισχυμένα θραύσματα στη συνέχεια διαχωρίζονται με ηλεκτροφόρηση, τα ακατέργαστα δεδομένα αναλύονται χρησιμοποιώντας λογισμικό που καθορίζει το μέγεθος κάθε ενισχυμένου θραύσματος και γονότυπους σε σύγκριση με αλληλόμορφα σε μια αλληλική κλίμακα που εκτελούνται στην ίδια πλάκα. Από τις αρχές της δεκαετίας του 1990, οι μέθοδοι δακτυλικών αποτυπωμάτων DNA που βασίζονταν στην ανάλυση RFLP αντικαταστάθηκαν σταδιακά από μεθόδους που βασίζονται στην ενίσχυση με PCR λόγω της βελτιωμένης ευαισθησίας, ταχύτητας και ακρίβειας γονότυπου. Το ιατροδικαστικό προφίλ DNA εκτελείται επί του παρόντος χρησιμοποιώντας ένα πάνελ πολυαλληλικών δεικτών STR που είναι δομικά ανάλογοι με τους αρχικούς μικροδορυφόρους αλλά με πολύ μικρότερες επαναλαμβανόμενες οδούς και επομένως είναι πιο εύκολο να ενισχυθούν και να πολλαπλασιαστούν με PCR. Μπορούν να ανιχνευθούν έως και 30 STR σε μία μόνο τριχοειδική ένεση ηλεκτροφόρησης, δημιουργώντας για κάθε άτομο έναν μοναδικό γενετικό κώδικα.<sup>96</sup>



Εικόνα 40: ταυτοποίηση ύποπτου με ανάλυση STR, <https://www.offlinepost.gr/2022/07/27/analysh-dna-sthn-egklhmatologia-kai-thn-iatrodikastikh/>

Σύμφωνα με τα πρότυπα που ζητούνται από βάσεις εγκληματικών δεδομένων σε όλο τον κόσμο: το ευρωπαϊκό πρότυπο σύνολο 12 δεικτών STR και το πρότυπο CODIS των ΗΠΑ των 13 δεικτών. Λόγω της μερικής επικάλυψης, σχηματίζουν μαζί ένα πρότυπο 18 δεικτών STR συνολικά. Η ενσωμάτωση αυτών των δεικτών STR σε εμπορικά κιτ έχει βελτιώσει την εφαρμογή αυτών των δεικτών για όλα τα είδη στοιχείων DNA με αναπαραγώγιμα αποτελέσματα από λιγότερα από τρία πυρηνωμένα κύτταρα. Η πιθανότητα δύο άτομα να έχουν πανομοιότυπους δείκτες σε καθένα από τους 13 διαφορετικούς τόπους STR εντός του DNA τους υπερβαίνει το ένα στα δισεκατομμύρια. Εάν προκύψει αντιστοίχιση DNA μεταξύ ενός κατηγορούμενου και ενός λεκέ από τη σκηνή του εγκλήματος, η σωστή έκφραση στην αίθουσα του δικαστηρίου θα ήταν ότι η πιθανότητα το δείγμα της σκηνής του εγκλήματος να προέρχεται από κάποιον άλλο εκτός από τον ύποπτο είναι μια στο δισεκατομμύριο.<sup>97</sup> Η διαδικασία περιλαμβάνει συνήθως τα εξής βήματα:<sup>98</sup>

1. Συλλογή δειγμάτων: Ένα βιολογικό δείγμα που περιέχει πυρηνωμένα κύτταρα συλλέγεται από το άτομο. Το αίμα και το σάλιο χρησιμοποιούνται συνήθως επειδή είναι πλούσιες πηγές DNA, αλλά μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν και άλλοι ιστοί.
2. Εξαγωγή DNA: Το DNA εξάγεται από το δείγμα που συλλέγεται. Αυτό το βήμα περιλαμβάνει το άνοιγμα των κυττάρων και το διαχωρισμό του DNA από άλλα κυτταρικά συστατικά.
3. Ενίσχυση: Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) χρησιμοποιείται συχνά για την επιλεκτική αντιγραφή ή την ενίσχυση συγκεκριμένων περιοχών του DNA. Οι περιοχές σύντομης διαδοχικής επανάληψης (STR) στοχεύονται συνήθως για ενίσχυση στη λήψη δακτυλικών αποτυπωμάτων DNA.
4. Κατακερματισμός: Το ενισχυμένο DNA στη συνέχεια κατακερματίζεται σε μικρότερα κομμάτια χρησιμοποιώντας διάφορες μεθόδους.

5. Διαχωρισμός: Τα θραύσματα διαχωρίζονται με βάση το μέγεθος χρησιμοποιώντας μια τεχνική διαχωρισμού όπως η ηλεκτροφόρηση γέλης.
6. Οπτικοποίηση: Τα διαχωρισμένα θραύσματα DNA οπτικοποιούνται, συχνά χρησιμοποιώντας μια χρωστική που συνδέεται με το DNA και μπορεί να ανιχνευθεί κάτω από το υπεριώδες φως.
7. Ανάλυση: Στη συνέχεια αναλύεται το προκύπτον μοτίβο θραυσμάτων DNA, γνωστό ως προφίλ DNA ή δακτυλικό αποτύπωμα. Το σχέδιο είναι μοναδικό για κάθε άτομο (εκτός από τα πανομοιότυπα δίδυμα), καθιστώντας το ένα ισχυρό εργαλείο αναγνώρισης.

Κατά την εξαγωγή του DNA χρησιμοποιούνται μέθοδοι ανάλογα με την καθαρότητα που επιθυμούμε, το μέγεθος και την ηλικία του γενετικού υλικού. Σε γενικές γραμμές απαιτείται:<sup>99</sup>

- λύση των κυττάρων με χρήση απορρυπαντικών SDS, Triton X-100 τα οποία διαλύουν τη μεμβράνη και αποδιατάσσουν τις πρωτεΐνες και απελευθερώνουν το DNA από τις ιστόνες. Μπορεί να προστεθούν ένζυμα (π.χ πρωτεϊνάση K) που αποικοδομούν κυτταρικά συστατικά, προστατεύοντας το DNA από αποικοδόμηση.
- ο διαχωρισμός του από τα υπόλοιπα συστατικά του κυττάρου (π.χ πρωτεΐνες, λιπίδια, RNA) με οργανικούς διαλύτες, ανιοντανταλλακτικές ρητίνες, πρόσδεση σε μεμβράνες πυριτίου κ.α.
- η έκλουσή του σε καθαρή μορφή και η αποθήκευσή του (συνήθως σε διάλυμα Tris-EDTA).

Στην συνέχεια ακολουθεί ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης για τον διαχωρισμό του DNA με βάση το μέγεθος και η φωτομέτρηση σε φασματοφωτόμετρο στα 260 nm (όπου απορροφούν τα νουκλεϊκά οξέα). Προκειμένου να ελεγχθεί περαιτέρω η ποιότητα του γονιδιωματικού DNA που εκχυλίστηκε με αυτή τη μέθοδο, πραγματοποιήθηκε ενίσχυση PCR και ενζυμική πέψη. Η ενίσχυση PCR υποδεικνύει επίσης ότι το DNA ήταν καλής ποιότητας, απαλλαγμένο από παρεμβαλλόμενες ενώσεις και ότι θα ήταν κατάλληλο για άλλες αναλύσεις DNA όπως στύπωμα Southern και RFLP.<sup>99</sup>

Να σημειώσουμε πως ανάλογα το δείγμα από το οποίο θα απομονωθεί το γενετικό υλικό απαιτείται ειδική κατεργασία.<sup>99</sup>

Ενδεικτικά αναφέρεται στον παρακάτω πίνακα:

| Δείγμα  | Κατεργασία   |
|---------|--|
| Ιστός   | Τρίψτε τον ιστό σε σκόνη υπό υγρό άζωτο ή σε λουτρό πάγου. Μεταφέρετε έως και 50 mg ιστού σε σωληνάριο μικροφυγοκέντρησης 1,5 ή 2,0 mL. Προσθέστε ρυθμιστικό διάλυμα εκχύλισης και αποθηκεύστε για 5-10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. |
| Κύτταρα | Τα κύτταρα που αναπτύσσονται σε μονοστιβάδα θα πρέπει να υποβάλλονται σε λύση απευθείας σε ένα τρυβλίο καλλιέργειας.   |



|                                   |  |
|-----------------------------------|--|
|                                   | Αδειάστε τα μέσα και μετά προσθέστε buffer εξαγωγής.   |
| Κυτταρικά σφαιρίδια ή εναιωρήματα | Προσθέστε 1 mL ρυθμιστικού διαλύματος εκχύλισης σε 107 κύτταρα (εναιωρημένα σε 0,2 mL PBS) και λύστε τα κύτταρα με επαναλαμβανόμενη πιπέτα. Μειώστε το ρυθμιστικό διάλυμα εκχύλισης κατά το ήμισυ εάν χρησιμοποιείτε λιγότερα από 5×10 <sup>6</sup> κύτταρα. |
| Λευκά αιμοσφαίρια                 | Προσθέστε 1 mL ρυθμιστικού διαλύματος εκχύλισης στα κύτταρα από περισσότερα από 0,5 mL φυσιολογικού πλήρους αίματος.   |
| DNA                               | Για να ελαχιστοποιηθεί η διάτμηση των μορίων DNA, αποφεύγουμε την έντονη ανακίνηση ή τον στροβιλισμό και χρησιμοποιούμε την αναστροφή  |

Πίνακας 5 κατεργασία διαφόρων δειγμάτων για ανάλυση DNA  
<https://www.funpecrp.com.br/gmr/year2011/vol10-1/pdf/gmr1055.pdf>

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) είναι μια μέθοδος κατά την οποία μια συγκεκριμένη περιοχή DNA αντιγράφεται, παράγοντας με βέλτιστο τρόπο δισεκατομμύρια αντίγραφα που είναι απολύτως πανομοιότυπα με το πρωτότυπο και χρησιμοποιείται ευρέως στην ενίσχυση των STRs. Αυτή η τεχνολογία έχει πολλά πλεονεκτήματα σε σχέση με το RFLP. Απαιτεί λιγότερο DNA, είναι γρήγορη (αποτελέσματα λαμβάνονται σε 10 ως 24 ώρες) και δεν απαιτεί ραδιοενεργούς ισότοπους. Ωστόσο, έχει δύο πιθανά μειονεκτήματα: την ευαισθησία στη μόλυνση και το γεγονός ότι πολλοί από τους τύπους της PCR έχουν λιγότερα αλληλόμορφα από ό,τι οι μικροδορυφορικοί VNTR. Το πρώτο ιατροδικαστικά χρησιμοποιημένο σύστημα PCR ανίχνευσε τον τύπο HLA-DQA1, μια περιοχή που είναι γνωστό ότι αποτελεί μέρος του συστήματος ανθρώπινης ιστοσυμβατότητας. Οι ερευνητές βρήκαν μια άφθονη κατηγορία πολυμορφισμών VNTR με μικρές επαναλήψεις (2 έως 9 επαναλήψεις) που ονομάζεται STR όπως αναφέρθηκε στην ενότητα 6.2. Τα συστήματα που επιλέχθηκαν για εγκληματολογικές δοκιμές έχουν κυρίως επαναλήψεις 4 bp (τετρανουκλεοτίδιο) που επαναλαμβάνονται από 5 έως περίπου 50 φορές, ανάλογα με τους τύπους. Αυτά τα STR είναι πολύ μικρά σε μέγεθος (100-400 bps) και είναι πολύ χρήσιμα στην ανάλυση του αποικοδομημένου DNA, σε σύγκριση με τις ζώνες RFLP που μπορεί να ποικίλουν σε μήκος από 500 έως 12.000 bps.<sup>100</sup>

Πως πραγματοποιείται μια αντίδραση PCR; Τα απαιτούμενα υλικά για την αντίδραση πολυμεράσης είναι το DNA στόχος, η DNA πολυμεράση, ένα ζεύγος εκκινήτων, μείγμα δεοξυριβονουκλεοτιδίων dNTPs, ένα ρυθμιστικό διάλυμα που περιλαμβάνει Tris-HCl, KCl, MgCl<sub>2</sub> και τέλος ιόντα μαγνησίου τα οποία διευκολύνουν την ενσωμάτωση των dNTPs στην αλυσίδα DNA. Στην PCR ακολουθούνται τρία βασικά βήματα η αποδιάταξη του γενετικού υλικού σε θερμοκρασία 90-95°C για περίπου 15 λεπτά, κατά την οποία σπάνε οι δεσμοί υδρογόνου μεταξύ των αζωτούχων βάσεων και τη διάνοιξη της διπλής έλικας. Στην συνέχεια το DNA υβριδοποιείται σε θερμοκρασία 50-70°C για περίπου 36 δευτερόλεπτα, με τους εκκινητές να προσδένονται στο μονόκλωνο DNA και



συγκεκριμένα στο 3' άκρο κάθε αλυσίδας. Τέλος πραγματοποιείται επιμήκυνση σε θερμοκρασία 72°C (βέλτιστη θερμοκρασία δράσης Taq πολυμεράσης) κατά την οποία προστίθενται νέα νουκλεοτίδια με τη βοήθεια των dNTPs. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται για 25-30 κύκλους με αποτέλεσμα να παίρνουμε από ένα DNA εκμαγείο περίπου 8,6 δισεκατομμύρια αντίγραφα. Στις PCR που χρησιμοποιούνται για ανάλυση STR, ένας εκκινητής από κάθε σετ εκκινητών έχει μια φθορίζουσα ετικέτα κολλημένη σε αυτόν, έτσι ώστε οι πολυπλέκτες PCR να μπορούν να μας εντοπίσουν διαφορετικά μήκη κύματος φωτός. Αυτό επιτρέπει την ταυτόχρονη ηλεκτροφόρηση και ανίχνευση οκτώ έως δέκα τόπων κάθε φορά. Περαιτέρω, η χρήση φθορισμού καθιστά τα συστήματα επιδεκτικά αυτοματοποιημένης ανίχνευσης. Μετά την ενίσχυση του γενετικού υλικού, γίνεται η ανάλυσή του συνήθως με ηλεκτροφόρηση. Αρχικά χρησιμοποιήθηκε για τον διαχωρισμό τμημάτων DNA η ηλεκτροφόρηση σε γέλη πολυακρυλαμίδης και χρήση χρωστικής αργύρου για την παρατήρηση των αποτελεσμάτων. Χρησιμοποιήθηκαν επίσης εκκινητές σημασμένοι με φθορίζουσα χρωστική οι οποίοι ανιχνεύονταν μέσω ειδικών οργάνων φθορισμού αυξάνοντας την ευαισθησία και την ευκολία της μεθόδου. Μια άλλη μέθοδος πέραν αυτών που χρησιμοποιείται ευρέως είναι η τριχοειδική ηλεκτροφόρηση (capillary electrophoresis, CE). Βασίζεται στην αρχή μεθόδου της ηλεκτροφόρησης σε gel αλλά μέσα σε τριχοειδή αγγεία τηγμένου πυριτίου (silica). Το gel αντικαθίσταται από μια υγρή μήτρα με πολυμερή. Η φύση των τριχοειδών τοιχωμάτων, η εσωτερική διάμετρος, η θερμοκρασία, το ρεύμα, η μήτρα κοσκινίσματος και η σύνθεση του δείγματος συμβάλλουν στη διακύμανση της μετανάστευσης μεταξύ των τριχοειδών αγγείων. Το όργανο της τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης περιέχει τριχοειδή φιαλίδια γεμισμένα με ρυθμιστικό διάλυμα και ηλεκτρόδια ενωμένα με παροχή ηλεκτρικού ρεύματος υψηλής τάσης. Το προϊόν της PCR εισάγεται απευθείας στο όργανο με αυτόματο δειγματολήπτη. Καθώς το δείγμα DNA εισέρχεται στο τριχοειδές, το διάλυμα του πολυμερούς δημιουργεί ένα φιλμ στο τείχος του τριχοειδούς σχηματίζοντας μια σίτα διαχωρισμού. Με την εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου τα τμήματα DNA μετακινούνται προς την πλευρά του θετικού φορτίου και την έξοδο του τριχοειδούς. Τα τμήματα αυτά φέρουν μια φθορίζουσα χρωστική στο 5' άκρο τους και έτσι ανιχνεύονται μέσω φθορισμού που προκαλείται από λέιζερ κατά την έξοδό τους. Διαφορετικές φθορίζουσες χρωστικές διακρίνονται από το φάσμα εκπομπής τους κατά την ανίχνευσή τους από το λέιζερ.<sup>101</sup>

Η μοναδικότητα του CE έγκειται στο γεγονός ότι ανόργανα ιόντα, οργανικά μόρια και μακρομόρια μπορούν να διαχωριστούν στο ίδιο όργανο και στις περισσότερες περιπτώσεις στο ίδιο τριχοειδές, ενώ αλλάζει μόνο η σύνθεση του ρυθμιστικού διαλύματος και του μέσου διαχωρισμού. Έτσι, η CE είναι η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη αναλυτική μέθοδος που αντικαθιστά την ηλεκτροφόρηση γέλης, την υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC), τη χρωματογραφία αερίου και άλλες μεθόδους διαχωρισμού. Πιο συγκεκριμένα τα πλεονεκτήματα της CE έναντι των συμβατικών ηλεκτροφορήσεων σε μια ανάλυση DNA στα πλαίσια μιας εγκληματολογικής έρευνας είναι:<sup>101</sup>

- Η έγχυση, ο διαχωρισμός και η ανίχνευση των ενισχυμένων θραυσμάτων DNA είναι πλήρως αυτοματοποιημένη.
- Η υψηλή τάση και η αποτελεσματική απαγωγή θερμότητας στο τριχοειδές επιτυγχάνει γρήγορο διαχωρισμό, οδηγώντας σε ταχύτερους χρόνους

λειτουργίας. Διατίθενται προϊόντα λογισμικού για αυτοματοποιημένη συλλογή και χειρισμό των δεδομένων.

- Είναι δυνατή η προβολή δεδομένων σε πραγματικό χρόνο.
- Μπορούν να προκύψουν ποσοτικές πληροφορίες.
- Αυξάνεται η ακρίβεια.
- Παρέχεται διαχωρισμός υψηλής ανάλυσης.
- Τα αποτελέσματα είναι εξαιρετικά αναπαραγώγιμα.
- Οι πιθανότητες διασταυρούμενης μόλυνσης/μεταφοράς είναι ελάχιστες αφού το τριχοειδές ξεπλένεται μετά από κάθε εκτέλεση και τα δείγματα περιέχονται μέσα στο τριχοειδές.
- Μόνο ένα μικρό μέρος ενός δείγματος καταναλώνεται, έτσι ώστε να μπορεί να επανεξεταστεί εάν χρειάζεται.
- Μειώνεται δραστικά η παραγωγή επικίνδυνων αποβλήτων.
- Καταργούνται οι χειροκίνητες διαδικασίες έγχυσης γέλης και φόρτωσης δείγματος που απαιτούν εργασία.

Μια εφαρμογή της CE έχει γίνει στη δημιουργία προφίλ STR. Το προφίλ STR είναι η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη μέθοδος για εφαρμογές όπως ο έλεγχος πατρότητας, η δημιουργία προφίλ για τη δημιουργία βάσεων δεδομένων, η ανάλυση δειγμάτων εγκληματολογικών υποθέσεων, η ταυτοποίηση αγνοουμένων, η αναγνώριση θυμάτων μαζικών καταστροφών κ.λπ. Οι εκκινητές για την ενίσχυση των τόπων STR στα συστήματα πολυπλεξίας έχουν σχεδιαστεί έτσι ώστε τα αλληλόμορφα των τόπων που έχουν ενισχυθεί με τους εκκινητές που έχουν επισημανθεί με την ίδια βαφή να μην επικαλύπτονται μεταξύ τους. Χρησιμοποιώντας εκκινητές επισημασμένους με διαφορετικές βαφές, είναι δυνατό να αναλυθούν οι τόποι που δημιουργούν ενισχυμένα αλληλόμορφα με παρόμοια μεγέθη θραυσμάτων. Ένας βασικός παράγοντας για την ακριβή τυποποίηση STR με ανάλυση θραυσμάτων είναι η ενίσχυση των τόπων STR σε δείγματα, μάρτυρες και αλληλόμορφες σκάλες χρησιμοποιώντας πανομοιότυπους εκκινητές που βρίσκονται εκτός της περιοχής STR με τις ίδιες συνθήκες PCR, έτσι ώστε η διακύμανση στο μήκος του το ενισχυμένο θραύσμα σχετίζεται άμεσα με το μήκος της περιοχής STR και ως εκ τούτου με τον γονότυπο. Κατά τη διάρκεια της τυποποίησης STR με CE, το μέγεθος του ενισχυμένου προϊόντος προσδιορίζεται από την καμπύλη βαθμονόμησης που δημιουργείται χρησιμοποιώντας θραύσματα τυπικού μεγέθους που εκτελούνται ταυτόχρονα με το δείγμα στην ίδια έγχυση. Η καμπύλη βαθμονόμησης δημιουργείται σχεδιάζοντας το μέγεθος των θραυσμάτων που υπάρχουν στο πρότυπο μεγέθους έναντι του σημείου δεδομένων μετανάστευσης. Ο χαρακτηρισμός του αλληλόμορφου στη συνέχεια εκχωρείται συγκρίνοντας το μέγεθος του ενισχυμένου αλληλόμορφου στο δείγμα με το μέγεθος του ίδιου αλληλόμορφου στην αλληλική κλίμακα, η οποία περιέχει κοινά αλληλόμορφα από κύριες ομάδες ανθρώπινου πληθυσμού που έχουν προηγουμένως προσδιοριστεί η αλληλουχία για να επιβεβαιωθεί ο αριθμός των επαναλαμβανόμενων μονάδων. Αν και τα περισσότερα από τα αλληλόμορφα STR διαφέρουν σε μέγεθος από το μήκος της επαναλαμβανόμενης μονάδας, υπάρχουν ορισμένα σπάνια αλληλόμορφα που διαφέρουν ως προς το μέγεθος κατά μια ημιτελή επαναλαμβανόμενη μονάδα (π.χ τα αλληλόμορφα 9.3 και 10 στον τόπο TH01). Για ακριβή πληκτρολόγηση αλληλόμορφων που ποικίλλουν σε μήκος κατά 1 βάση, είναι επιθυμητό το μέγεθος

ενός αλληλόμορφου να μην απέχει περισσότερο από 0,5 ζεύγη βάσεων από το μετρούμενο αλληλόμορφο στην αλληλική κλίμακα. Ο προσδιορισμός του μεγέθους των ενισχυμένων προϊόντων και η εξακρίβωση του αλληλόμορφου είναι κρίσιμα βήματα στον προσδιορισμό του γονότυπου.<sup>102</sup>

Το μέγεθος του θραύσματος DNA καθορίζεται σε σχέση με το πρότυπο μεγέθους χρησιμοποιώντας μία από τις πολλές μεθόδους για τη δημιουργία μιας καμπύλης κλήσης μεγέθους. Μια εξ αυτών είναι η μέθοδος Global Southern, η οποία δημιουργεί μια καμπύλη μεγέθους που ταιριάζει καλύτερα μέσα από όλα τα επιλεγμένα πρότυπα μεγέθους και στη συνέχεια υπολογίζει το μέγεθος των άγνωστων θραυσμάτων. Άλλη μια τέτοια μέθοδος είναι η Local Southern που επιλέγει τέσσερα σημεία με πρότυπο μέγεθος που είναι

πλησιέστερο σε μέγεθος στο άγνωστο θραύσμα για να εξαχθεί η καμπύλη που ταιριάζει καλύτερα. Η μέθοδος Local Southern παρέχει μια καλύτερη εκτίμηση του μεγέθους δεδομένου ότι δεν υπάρχει γραμμική σχέση μεταξύ μεγέθους και κινητικότητας σε ένα ευρύ φάσμα μεγεθών.

Elder, J. K., E. M. Southern, Measurement of DNA length by gel electrophoresis: Part II: Comparison of methods for relating mobility to fragment length, *Anal Biochem* 128: 227–31, 1983.

Η ερμηνεία των προφίλ DNA από πολλούς δότες είναι πολύ πιο περίπλοκη από τα προφίλ μιας πηγής, όχι μόνο λόγω του δυνητικού αριθμού αλληλόμορφων που υπάρχουν στο προφίλ, αλλά και επειδή αυτά τα προφίλ είναι συχνά χαμηλού επιπέδου με περίπλοκα χαρακτηριστικά όπως η πτώση αλληλόμορφων/απόρριψη και η ετερόζυγη ανισορροπία. Η αυξανόμενη ευαισθησία των τεχνικών δημιουργίας προφίλ STR σημαίνει ότι η ανάκτηση μικτών προφίλ DNA έχει γίνει πιο συνηθισμένη, όχι μόνο από δείγματα όπου ενδέχεται να αναμένονται μείγματα (π.χ. δείγματα σεξουαλικών αδικημάτων), αλλά και από δείγματα χαμηλής ποιότητας/ποσότητας που ανακτώνται από αντικείμενα χειρισμού. Η ικανότητα αναγνώρισης της παρουσίας ενός συγκεκριμένου σωματικού υγρού μπορεί να είναι εξαιρετικά πολύτιμη για μια έρευνα, παρέχοντας κρίσιμες πληροφορίες για τις δραστηριότητες που εμπλέκονται σε ένα περιστατικό, ιδιαίτερα εάν σημαίνει ότι ένα προφίλ DNA μπορεί να συνδεθεί με μια συγκεκριμένη βιολογική πηγή. Όλες οι πιθανές/επιβεβαιωτικές δοκιμές που χρησιμοποιούνται επί του παρόντος για τον εντοπισμό ορισμένων σωματικών υγρών έχουν περιορισμούς, συμπεριλαμβανομένης της έλλειψης ευαισθησίας και ειδικότητας, καθώς και την απαίτηση για τη διενέργεια πολλαπλών δοκιμών που καταστρέφουν τα δείγματα. Αυτό οδήγησε στην ανάλυση του RNA σε κηλίδες σωματικού υγρού, δεδομένου ότι το RNA μπορεί να συνεκχυλιστεί με το DNA, επιτρέποντας την παράλληλη παραγωγή ενός προφίλ DNA παράλληλα με τη δοκιμή σωματικού υγρού. Η αναγνώριση των σωματικών υγρών με τη χρήση προφίλ RNA βασίζεται στην αρχή ότι, αν και το περιεχόμενο DNA είναι το ίδιο στους περισσότερους κυτταρικούς τύπους, το RNA διαφέρει ανάλογα με τον τύπο και τη λειτουργία του κυττάρου. Η παρουσία ειδικών για τον ιστό τύπων RNA σε ένα δείγμα μπορεί επομένως να υποδηλώνει την παρουσία συγκεκριμένων σωματικών υγρών. Πολλές από αυτές τις αναλύσεις χρησιμοποιούν τελικού σημείου αντίστροφης μεταγραφής PCR (RT-PCR) ή ποσοτική σε πραγματικό χρόνο PCR (RT-qPCR), οι οποίες έχουν το πλεονέκτημα της συμβατότητας με τις υπάρχουσες τεχνολογίες στα εγκληματολογικά εργαστήρια, αν

και όλο και περισσότερες μελέτες χρησιμοποιούν τη δύναμη του MPS για ταυτοποίηση και ανάλυση ιστού-ειδικών RNA. Οι αρχικές αναλύσεις επικεντρώθηκαν στον εντοπισμό δεικτών αγγελιαφόρου RNA (mRNA) ειδικών για το σωματικό υγρό και στην ανάπτυξη πολυπλεξών που υποδεικνύουν την παρουσία ενός ή πολλαπλών τύπων σωματικών υγρών, ο τελευταίος από τους οποίους είναι ιδιαίτερα χρήσιμος όταν αναλύονται μικτά δείγματα. Η ευαισθησία των mRNAs στην αποικοδόμηση ωστόσο έχει περιορίσει την εφαρμογή τους σε εγκληματολογικά δείγματα. Πιο πρόσφατα, η εστίαση επικεντρώθηκε στα micro RNA (miRNAs) ως εναλλακτικούς δείκτες για την αναγνώριση σωματικών υγρών. Πολλά από αυτά τα ρυθμιστικά RNA, τα οποία στοχεύουν τα mRNA για αποικοδόμηση ή σίγαση, εμφανίζουν επίσης ειδική για τον ιστό έκφραση και έχουν το πλεονέκτημα της αυξημένης σταθερότητας σε σύγκριση με το mRNA ως αποτέλεσμα του μικρότερου μεγέθους και της ενσωμάτωσής τους σε ένα πρωτεϊνικό σύμπλεγμα εντός του κυττάρου. Μια ποικιλία miRNAs έχει αναγνωριστεί ως πιθανοί δείκτες για ιατροδικαστικά σχετικά σωματικά υγρά και παρόλο που είναι απίθανο κάποια miRNA να είναι ειδικά για μεμονωμένους τύπους σωματικών υγρών, έχει αναπτυχθεί ένας αριθμός αναλύσεων που ενσωματώνουν πάνελ πολλαπλών διαφορετικά εκφραζόμενων miRNA που φαίνεται να αναγνωρίζουν συγκεκριμένα σωματικά υγρά. Οι δείκτες micro RNA υπόσχονται επίσης άλλες εγκληματολογικές εφαρμογές, συμπεριλαμβανομένης της εκτίμησης του χρόνου εναπόθεσης κηλίδων σωματικού υγρού και του διαστήματος μετά τη θανάτωση.<sup>103,104</sup>

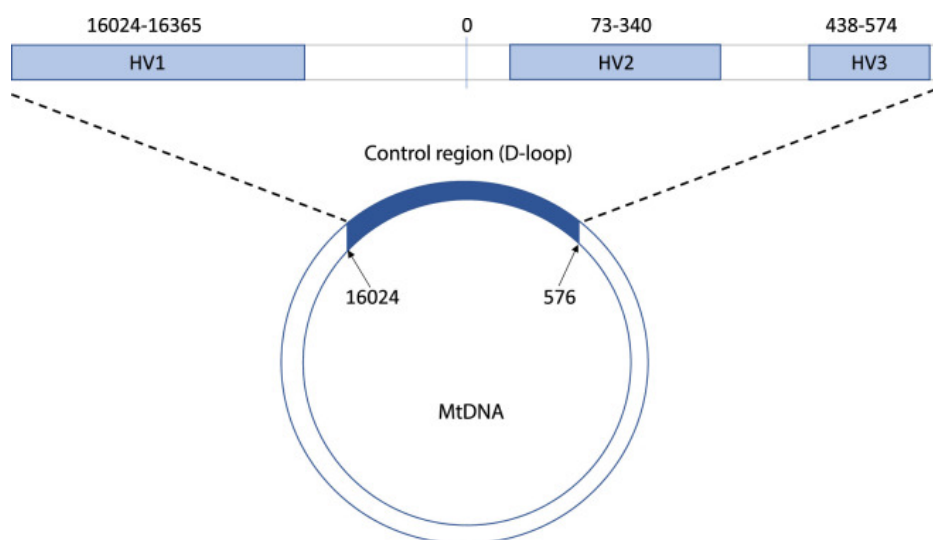
#### Λίγα λόγια για το σύστημα CODIS του FBI

Είναι η μεγαλύτερη βάση δεδομένων που διαθέτουμε και κατασκευάστηκε από το FBI στην Αμερική. Το ακρωνύμιο "CODIS" χρησιμοποιείται για να περιγράψει το λογισμικό που χρησιμοποιείται για τη διατήρηση και εκτέλεση βάσεων δεδομένων DNA, που περιλαμβάνουν τα προφίλ καταδικασμένων παραβατών ενός κράτους και χρησιμοποιείται για την επίλυση εγκλημάτων για τα οποία δεν υπάρχουν ύποπτοι. Δημιουργώντας μια βάση δεδομένων με τα προφίλ DNA καταδικασμένων σεξουαλικών παραβατών και άλλων βίαιων εγκληματιών, τα εγκληματολογικά εργαστήρια θα μπορούν να αναλύουν αυτές τις υποθέσεις χωρίς ύποπτους και να αναζητούν αυτά τα προφίλ DNA σε σχέση με τη βάση δεδομένων των καταδικασθέντων δραστών και άλλων σκηνών εγκλήματος και να προσδιορίζουν εάν πρόκειται για σίριαλ ή υποτροπή εμπλέκεται βιαστής ή δολοφόνος. Το CODIS ξεκίνησε το 1990 ως πιλοτικό έργο με 12 κρατικά και τοπικά εγκληματολογικά εργαστήρια και σήμερα έχει 153 συμμετέχοντα εργαστήρια που εκπροσωπούν 49 πολιτείες και την Περιφέρεια της Κολούμπια. Από τον Μάρτιο του 2002, η CODIS έχει βοηθήσει σε περισσότερες από 4.719 έρευνες σε 32 πολιτείες και δύο ομοσπονδιακά εργαστήρια.<sup>105</sup>

### 6.3 Το μιτοχονδριακό DNA και το χρωμόσωμα Y

Το μιτοχονδριακό DNA (mtDNA) είναι άλλη μια πηγή DNA που παρουσιάζει ενδιαφέρον σε μια ιατροδικαστική έρευνα και μπορεί να αναλυθεί ακόμα και όταν δεν υπάρχει μεγάλη διαθεσιμότητα σε γενετικό υλικό ώστε να πραγματοποιηθεί ανάλυση STR. Κληρονομείται από τη μητέρα και αντιπροσωπεύει τη γυναικεία καταγωγή ενός ατόμου. Έχει μήκος 16.569 bp, είναι κυκλικό, χωρίς την ύπαρξη

εσωνίων. Επιπλέον σε ένα δεδομένο κύτταρο μπορεί να υπάρχει σε χιλιάδες αντίγραφα, σε σύγκριση με μόνο δύο αντίγραφα πυρηνικού DNA, με κάθε μιτοχόνδριο να έχει περίπου 2-5 αντίγραφα ολόκληρου του γονιδιώματός του. Οι δύο μη κωδικοποιητικές υπερμεταβλητές περιοχές παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον για την εγκληματολογική ανάλυση είναι οι HV1 και HV2. Η μόνη περίπτωση παραλλαγής στο mtDNA είναι οι μεταλλάξεις που αλλάζουν την αλληλουχία ζεύγους βάσεων του mtDNA. Το γεγονός ότι το mtDNA είναι μητρικά κληρονομημένο αποκλείει ένα άτομο από το να είναι ετερόζυγο, καθιστώντας το χρήσιμο για την ανίχνευση μητρικών γενεαλογιών εντός των οικογενειών και των πληθυσμών. Έτσι το mtDNA χρησιμοποιείται κυρίως σε εγκληματολογικές υποθέσεις για τη δοκιμή αποδεικτικών στοιχείων που δεν περιέχουν επαρκή ποσότητα ή ποιότητα DNA για δοκιμές πυρηνικού DNA (π.χ επαναπατρισμένα λείψανα από τάφους).<sup>106</sup>

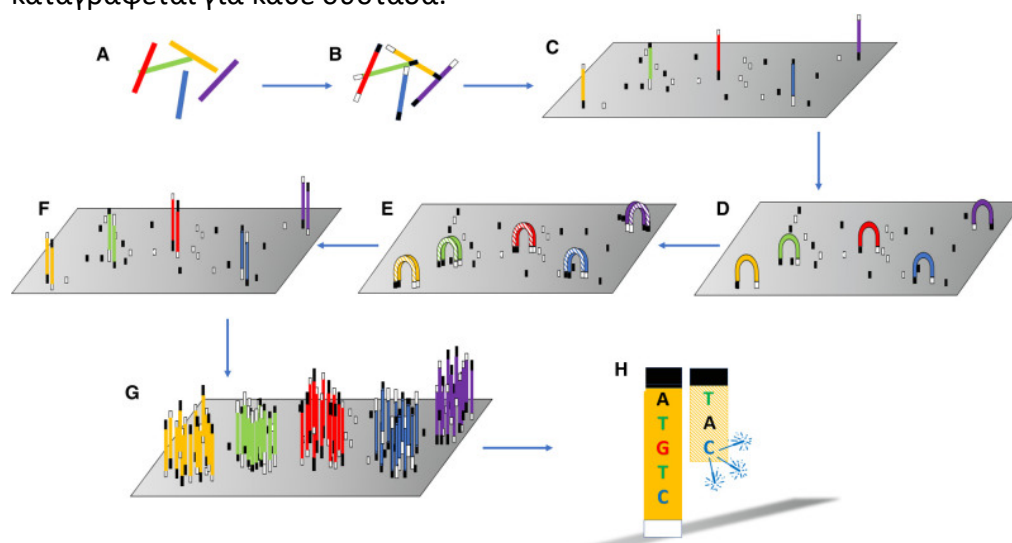


Εικόνα 41: οι μεταβλητές περιοχές του mtDNA που παρουσιάζουν ενδιαφέρον για τους εγκληματολόγους, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8457767/>

Μια τυπική ροή εργασίας για τον προσδιορισμό αλληλουχίας mtDNA περιλαμβάνει απομόνωση DNA, ενίσχυση θραυσμάτων για περιοχές HV1 και HV2 σε θραύσματα 400 bp ή λιγότερο με βάση την έκταση της αποικοδόμησης του δείγματος, αλληλούχιση κύκλου των ενισχυμένων προϊόντων, αφαίρεση μη ενσωματωμένων τερματιστών φθορισμού από ολοκληρωμένους αντιδράσεις προσδιορισμού αλληλουχίας κύκλου και διαχωρισμός προϊόντων αλληλουχίας κύκλου σε τριχοειδική ηλεκτροφόρηση, χρησιμοποιώντας πολυμερές POP-6.<sup>106</sup>

Η αλληλούχιση στην εγκληματολογία χρησιμοποιείται για την ταυτόχρονη ανάλυση πολλαπλών περιοχών σε διαφορετική μήτρα. Προτιμάται η αλληλούχιση νέας γενιάς NGS λόγω του χαμηλού κόστους και της υψηλής ικανότητας επεξεργασίας. Κατά την NGS επιτρέπεται η αλληλουχία εκατομμυρίων έως δισεκατομμυρίων σύντομων αναγνώσεων σε μία μόνο εκτέλεση. Κατά τη διαδικασία παράγεται μια βιβλιοθήκη ενισχυμένων, δεσμευμένων, μονόκλωνων θραυσμάτων του μορίου στόχου, τα οποία στη συνέχεια αλληλουχούνται με την προσθήκη συμπληρωματικών νουκλεοτιδίων ταυτόχρονα. Οι δυο ευρέως χρησιμοποιούμενες πλατφόρμες στην εγκληματολογική γενετική είναι η Illumina MiSeq FGx και τα όργανα ThermoFisher Ion Torrent PGM και Ion S5. Και στις δυο πραγματοποιείται μια προσέγγιση προσδιορισμού αλληλουχίας κατά σύνθεση στην οποία χρησιμοποιείται μια πολυμεράση μαζί με ένα σήμα. Για τον προσδιορισμό της ενσωμάτωσης ενός νουκλεοτιδίου στην Illumina χρησιμοποιείται

ένα φθοροφόρο ενώ στο Ion Torrent η αλλαγή στο pH. Πιο συγκεκριμένα στην πλατφόρμα Illumina φορτώνεται η βιβλιοθήκη σε μια ειδική επιφάνεια με στόχο την πρόσδεση των θραυσμάτων της βιβλιοθήκης σε αυτή την επιφάνεια με τη βοήθεια των προσαρμοστών. Μετά την υβριδοποίηση με τα ολιγονουκλεοτίδια που υπάρχουν αγκυροβολημένα, το DNA εκμαγείο ενισχύεται με την bridge pcr (τα μόρια DNA κάμπτονται και σχηματίζουν γέφυρα με τα ολιγονουκλεοτίδια). Δημιουργούνται έτσι συστάδες οι οποίες αποδιατάσσονται και σχηματίζουν μονόκλωνο εκμαγείο το οποίο υβριδοποιείται με έναν εκκινητή. Σε κάθε κύκλο αλληλούχισης οι συστάδες που έχουν ενισχυθεί αναμιγνύονται με τέσσερα νουκλεοτίδια (A, T, C, G) καθένα από τα οποία φέρει φθορίζον μόριο. Αυτά έχουν χημικά αδρανές το 3' άκρο τους ώστε να εμποδίζεται η ενσωμάτωση άλλου νουκλεοτιδίου. Το σήμα που εκπέμπεται καταγράφεται για κάθε συστάδα.<sup>106,107</sup>

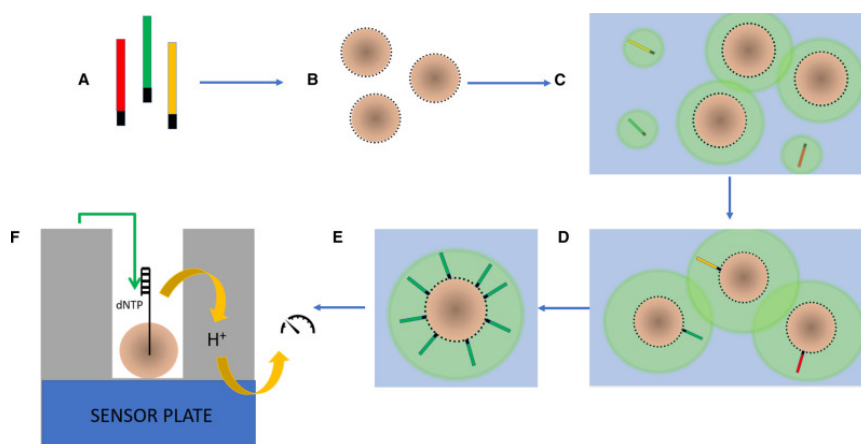


Εικόνα 42: αλληλούχιση μέσω της πλατφόρμας Illumina.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8457767/>

Στην Ion Torrent χρησιμοποιείται ένας αγωγός που διαθέτει βοθρία, στα οποία υπάρχουν ενσωματωμένα σφαιρίδια αλληλούχισης, καθένα από τα οποία είναι ενσωματωμένο με έναν κλώνο της βιβλιοθήκης. Σε κάθε βοθρίο, λόγω απελευθέρωσης ιόντων  $H^+$  ως παραπροϊόν σε κάθε ενσωμάτωση ενός νουκλεοτιδίου στην αλυσίδα που συντίθεται, ανιχνεύεται η αλλαγή του pH. Κατά την αντίδραση αλληλούχισης τέσσερα διαλύματα που φέρουν τα νουκλεοτίδια A, T, C και G προστίθενται στον ημιαγωγό και ακολουθεί έκπλυση μετά την προσθήκη καθενός από αυτά.<sup>107</sup>

Εκτός από τις μεθόδους προσδιορισμού αλληλουχίας επόμενης γενιάς (NGS) έχουν αναπτυχθεί και μέθοδοι αλληλουχία 3ης γενιάς οι οποίες έχουν αρκετά πλεονεκτήματα σε σχέση με την NGS. Πιο συγκεκριμένα έχουν υψηλότερη απόδοση, απευθείας ανίχνευση απλότυπου, μεγαλύτερα μήκη ανάγνωσης, καλύτερη συναινετική ακρίβεια για τον εντοπισμό σπάνιων παραλλαγών, ολόκληρη φάση χρωμοσώματος και μικρή ποσότητα δείγματος. Η πιο διάσημη προσέγγιση είναι η Αλληλούχιση Μεμονωμένων Μορίων (SMS), δηλαδή η αλληλούχιση σε πραγματικό χρόνο ενός μορίου (SMRT) από την Pacific Biosciences (PacBio). Αυτή η μέθοδος χρησιμοποιεί αλληλούχιση με χημεία σύνθεσης παρόμοια με ορισμένες μεθόδους προσδιορισμού αλληλουχίας 2ης γενιάς, αλλά χρειάζεται λιγότερο υλικό έναρξης και ενίσχυση PCR του προτύπου DNA που οδηγεί σε χαμηλό ποσοστό σφάλματος και

παράγει μεγάλες αναγνώσεις με μικρότερο χρόνο εκτέλεσης.<sup>118</sup> Τέτοιες πλατφόρμες για μαζικά παράλληλη αλληλούχιση (MPS) απαιτούν διαφορετική αναλυτική ροή εργασιών από την γνωστή (ενίσχυση με PCR ηλεκτροφόρηση), καθώς και νέους βιοπληροφορικούς πόρους, λόγω του τεράστιου όγκου δεδομένων που παράγονται. Ως μαζική παράλληλη αλληλούχιση ορίζεται μια μέθοδος υψηλής απόδοσης που χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό ενός τμήματος της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του γονιδιώματος ενός ατόμου σε πραγματικό χρόνο. Δηλαδή, εκατομμύρια αναγνώσεις ανά δείγμα μπορούν να ληφθούν από ένα μόνο πείραμα προσδιορισμού αλληλουχίας. Εκτός από τα STR που αναφέρθηκαν παραπάνω, μπορούν να αναλυθούν διαφορετικοί τύποι εγκληματολογικών δεικτών με την τεχνολογία MPS, όπως πολυμορφισμοί μονονουκλεοτιδίου (SNPs), μιτοχondριακό DNA, πρότυπα μεθυλίωσης DNA και έκφραση γονιδίου mRNA για αναγνώριση σωματικού υγρού.<sup>119</sup> Οι sequencers τρίτης γενιάς ξεκίνησαν με την κυκλοφορία του συστήματος Helicos το 2007. Τα συστήματα PacBio® (ανίχνευση σήματος φθορισμού) και Oxford Nanopore (μετρήσεις ρεύματος) βασίζονται επίσης σε SMS. Άλλα συστήματα αλληλούχισης τρίτης γενιάς είναι το Heliscope, το VisiGen (αργότερα Life Technologies/Invitrogen™) και το Starlight (γνωστό και ως VisiGen). Το εγκληματολογικό εργαστήριο στο Πανεπιστήμιο του Leiden είναι το πρώτο ινστιτούτο στον κόσμο που διαπιστεύτηκε να χρησιμοποιεί την τεχνολογία NGS στην εγκληματολογική ανάλυση DNA. Ως αποτέλεσμα, η πιθανότητα ψευδώς θετικών αντιστοιχιών στο προφίλ DNA μειώθηκε και έχει γίνει ευκολότερο να διακρίνουμε τα διαφορετικά προφίλ DNA σε ένα σύνθετο μείγμα. Με τη χρήση της τεχνολογίας NGS ο διακριτικός χαρακτήρας των προφίλ αυξάνεται και επομένως και η αξία των αποδεικτικών στοιχείων. Τα τελευταία 2-3 χρόνια το MPS συγκέντρωσε επίσης μεγάλη προσοχή. Κιτ, όπως το HID-Ion AmpliSeq™ Identity (SNP) Panel (Thermo Fisher Scientific) και το ForenSeq™ DNA Signature Prep Kit (Illumina® for (X/Y-)STRs και SNPs για εφαρμογές ταυτότητας, βιογεωγραφικής καταγωγής και φαινοτύπου είναι εμπορικά διαθέσιμα και ελέγχονται πλήρως από εγκληματολογικούς ερευνητές.<sup>120</sup>



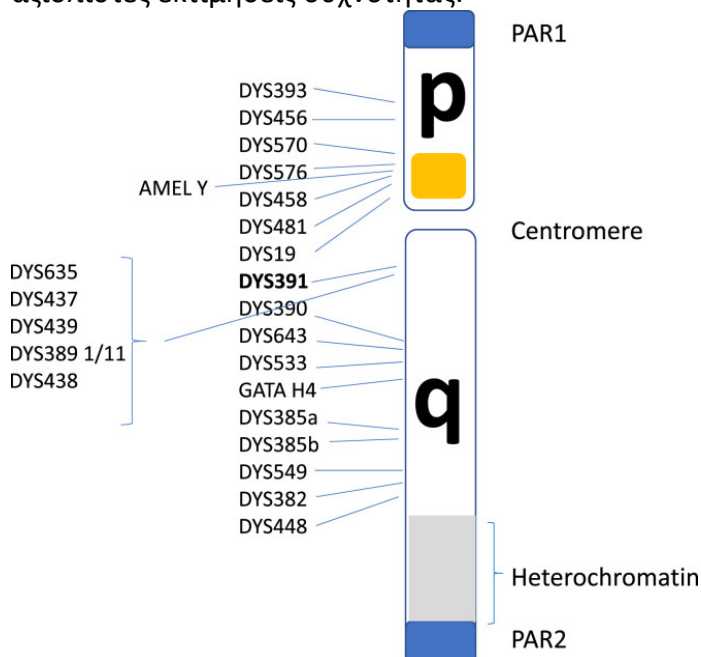
Εικόνα 43: αλληλούχιση Ion Torrent, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8457767/>

Ενώ λοιπόν το μιτοχondριακό DNA δεν προσφέρεται για αναγνώριση ή ταυτοποίηση, προσφέρει πλεονεκτήματα όταν επιθυμούμε την επιβεβαίωση της μητρικής καταγωγής ή όταν το πυρηνικό DNA είναι περιορισμένο, όπως στην ανάλυση οστών, δοντιών και μαλλιών, λόγω του μεγάλου αντιγράφου του αριθμός. Χρησιμοποιείται



έτσι συχνά στην ανάλυση του αρχαίου DNA και στη διαλογή της αναγνώρισης θυμάτων καταστροφής.<sup>108</sup>

Το χρωμόσωμα Y είναι το φυλετικό χρωμόσωμα που καθορίζει το φύλο ενός ατόμου και συγκεκριμένα τα άτομα με χρωμόσωμα X και Y είναι φυσιολογικά φαινοτυπικά αρσενικά. Το ανθρώπινο χρωμόσωμα Y έχει δύο ψευδοαυτοσωματικές περιοχές (PARs) με κοντό βραχίονα Yp και μακρύ βραχίονα Yq, που χωρίζονται από ένα κεντρομερίδιο. Τα PARs, ο βραχύς βραχίονας και το εγγύς τμήμα του μακριού βραχίονα αποτελούνται από ελαφρά συσκευασμένη χρωματίνη εμπλουτισμένη με γονίδια PAR1 και PAR2, και τα δύο ανασυνδυάζονται με περιοχές στο χρωμόσωμα X. Οι υπόλοιπες περιοχές δεν ανασυνδυάζονται και περιέχουν περίπου 70 γονίδια στην ειδική για τον άνδρα περιοχή MSY. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον στον εγκληματολογικό τύπο DNA είναι η ανίχνευση δεικτών που σχετίζονται με την αμελογενίνη (AMEL). Ο τύπος έχει δύο ομόλογα γονίδια στα χρωμοσώματα X και Y. Το AMELY κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη που εμπλέκεται στην απομετάλλωση του σμάλτου των δοντιών και έχει έναν παράλογο στο χρωμόσωμα X ( AMELX ). Το πρώτο εσώνιο του AMELX είναι έξι ζεύγη βάσεων (bp) μικρότερο και οι εκκινητές που στοχεύουν και τα δύο γονίδια περιλαμβάνονται σε πολλά kit εγκληματολογικού DNA προκειμένου να αποκαλυφθεί το φύλο του δότη. Τα STR στο χρωμόσωμα Y δεν έχουν περισσότερες πιθανότητες να μεταλλαχθούν από εκείνα που επιλέχθηκαν για εγκληματολογική ανάλυση σε αυτοσώματα, επιλέγονται μεμονωμένα με βάση σημαντικά μέτρα ποικιλομορφίας, αποτελούν την πιο κανονική εμφάνιση μεταλλάξεων μεταξύ πατέρα και γιου και είναι πιθανό να αντικατοπτρίζουν τον υψηλό αριθμό μιτωτικών συμβάντων στη σπερματογένεση. Έτσι οι απλότυποι Y-STR θα είναι πολύ πιο μεταβλητοί από ό,τι φαίνεται σε ένα μεμονωμένο αυτοσωμικό STR και οι βάσεις δεδομένων αναφοράς απλότυπου Y-STR απαιτείται να είναι σημαντικά μεγαλύτερες από τις βάσεις δεδομένων αναφοράς αυτοσωμικών αλληλόμορφων STR προκειμένου να παρέχονται αξιόπιστες εκτιμήσεις συχνότητας.<sup>113</sup>



Εικόνα 44: βραχίονες p και q του χρωμοσώματος Y και οι ειδικές περιοχές του, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8457770/>



Οι κύριοι κατασκευαστές αυτοσωμικών κιτ πολυπλεξίας ανέκαθεν περιλάμβαναν το AMEL ως δείκτη φύλου, αλλά τώρα προσθέτουν πρόσθετους δείκτες προκειμένου να αποφευχθεί η μηδενική εμφάνιση AMELY στην υπόθεση. Αυτοί οι πρόσθετοι δείκτες είναι συνήθως Y-STR, αλλά χρησιμοποιείται μια ειδική θέση εισαγωγής/διαγραφής.<sup>113</sup> Όσον αφορά τα κιτ πολυπλεξίας Y-STR που χρησιμοποιούνται στην ιατροδικαστική εξέταση σήμερα, δύο κατασκευαστές τα παράγουν και χρησιμοποιούν έως και 23 και 27 τύπους. Η κύρια χρησιμότητα της ανάλυσης Y-STR αφορά ποινικές υποθέσεις με περιπτώσεις υποτιθέμενης σεξουαλικής επίθεσης στις οποίες η συμβολή ενός άνδρα μπορεί να ανιχνευθεί όταν υπάρχει σε μικρή ποσότητα σε ένα μείγμα με γυναικείο DNA. Μερικές φορές μπορεί επίσης να αποκαλύψει ότι περισσότερα από ένα αρσενικά έχουν συμβάλει σε ένα μείγμα, το οποίο μπορεί να μην είχε αποκαλυφθεί στην τυπική αυτοσωμική ανάλυση.

#### 6.4 Ανάλυση SNPs

Τα SNPs είναι υποκαταστάσεις, εισαγωγές ή διαγραφές βάσεων που συμβαίνουν σε μεμονωμένες θέσεις στο γονιδίωμα. Συγκριτικά με τους υπόλοιπους πολυμορφισμούς διαφέρουν στην αλληλουχία DNA κατά μια βάση, ενώ έχουν συνήθως δυο αλληλόμορφα. Το ένα επικρατεί με υψηλότερη συχνότητα εμφάνισης και ονομάζεται κύριο, ενώ το άλλο ονομάζεται δευτερεύον. Γνωρίζουμε πως το ανθρώπινο γονιδίωμα είναι διπλοειδές, άρα ένα άτομο μπορεί να είναι ομόζυγο (δυο αντίγραφα του ίδιου αλληλόμορφου) ή ετερόζυγο (ένα αντίγραφο κάθε αλληλόμορφου) για ένα χαρακτηριστικό ή ιδιότητα. Τα SNP είναι σχετικά σταθεροί δείκτες που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για μελέτες περιπτώσεων που βασίζονται σε γενεαλογική βάση, όπως ταυτοποίηση αγνοουμένων, υποθέσεις κληρονομιάς και υποθέσεις όπου δεν υπάρχει διαθέσιμο δείγμα άμεσης αναφοράς. Υπερτερούν του προφίλ STR σε ορισμένους τύπους δειγμάτων, όπως δείγματα υψηλής υποβάθμισης και όταν επιθυμούμε επιπλέον γενετικές πληροφορίες. Το σημαντικό μειονέκτημα όμως είναι η διαλληλική τους φύση, δηλαδή ότι μόνο τρεις πιθανοί τύποι γονιδίων παρατηρούνται μεταξύ διαφορετικών πληθυσμιακών ομάδων σε μια δεδομένη θέση SNP. Αυτό σημαίνει ότι παρέχει πολύ χαμηλότερη ισχύ διάκρισης ανά τόπο από τους εξαιρετικά πολυμορφικούς τύπους STR. Εκτιμάται ότι απαιτούνται 50–100 SNP για να επιτευχθεί μια δύναμη διάκρισης αντίστοιχη με αυτή των 13 τόπων STR. Επίσης όλες οι μέθοδοι ανίχνευσης SNPs απαιτούν ειδικό εξοπλισμό και εξειδικευμένο προσωπικό καθώς συνοδεύονται και από πολύ μεγάλο κόστος ανάλυσης. Τα SNP για εγκληματολογική ανάλυση ομαδοποιούνται σε τέσσερις κατηγορίες:

- SNP ελέγχου ταυτότητας
- SNP με πληροφόρηση γενεαλογίας
- SNP με πληροφόρηση για την καταγωγή
- SNP με πληροφορίες για τον φαινοτύπο

Η κοινοπραξία SNPforID επέλεξε 52 διαλληλικά SNP με υψηλό επίπεδο πολυμορφισμού στις κύριες ομάδες πληθυσμού. Αυτοί οι δείκτες είναι χρήσιμοι για ιατροδικαστικές υποθέσεις, υποθέσεις πατρότητας και υποθέσεις μετανάστευσης. Τα SNP ελέγχου ταυτότητας λειτουργούν όπως τα STR καθώς παρέχουν πληροφορίες προς αποκλεισμό υπόπτων και δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως αποδεικτικό υλικό. Ο Kidd και η ομάδα του αναγνώρισαν μια ομάδα 92 SNP για την ταυτοποίηση του ανθρώπου μετά από εκτεταμένες πληθυσμιακές μελέτες. Μέχρι σήμερα, έχουν

αναφερθεί μερικές προσπάθειες ανάπτυξης πάνελ SNP ταυτότητας, όπως ένα πάνελ 21 SNP και ένα πάνελ 52 από ευρωπαϊκά εγκληματολογικά εργαστήρια.<sup>110</sup> Τα SNP με πληροφόρηση γενεαλογίας χρησιμοποιούνται κυρίως σε περιπτώσεις αγνοούμενων ή σε ταυτοποιήσεις μαζικών καταστροφών. Έχουν ταυτοποιηθεί αυτά που βρίσκονται στο γονιδίωμα του mtDNA και στο χρωμόσωμα Υ. Η επιτυχής ταυτοποίηση με γενετικό έλεγχο χρησιμοποιώντας ανάλυση συγγένειας περιορίζεται από την ποσότητα του διαθέσιμου DNA για ανάλυση, τον αριθμό των μελών της οικογένειας για σύγκριση και τους διαθέσιμους γενετικούς δείκτες. Παραδείγματος χάρη ο Coble και η ομάδα του ανέπτυξαν 59 SNP οργανωμένα σε 8 διαφορετικά πάνελ πολυπλεξίας που στοχεύουν 18 συγκεκριμένους κοινούς τύπους HVI/HVII του Καυκάσου για να επιλύσουν περαιτέρω κοινούς απλότυπους mtDNA.<sup>109,110</sup> Η βιογεωγραφική καταγωγή ενός ατόμου μπορεί να παρέχει έμμεσα ορισμένες περιορισμένες πληροφορίες σχετικά με τη γενική εμφάνιση ενός ατόμου. Οι ενημερωτικοί δείκτες των καταγωγής κατανέμονται σε όλο το ανθρώπινο γονιδίωμα που εμφανίζονται σε διαφορετικές συχνότητες στους διαφορετικούς πληθυσμούς παγκοσμίως. Μπορούν να αποκαλύψουν την προγονική προέλευση ενός ατόμου, αλλά δεν κάνουν δοκιμές για φυσικά χαρακτηριστικά. Αυτή η έμμεση μέθοδος αξιολόγησης του φαινοτύπου βασίζεται στη συσχέτιση της φαινοτυπικής έκφρασης με ορισμένα στοιχεία της δομής των καταγωγών του ανθρώπινου πληθυσμού. Ένα παράδειγμα πραγματοποίησης ελέγχου γενετικής καταγωγής των αποδεικτικών στοιχείων εφαρμόστηκε με επιτυχία στην Έρευνα της Ομάδας Εργασίας Ανθρωποκτονιών πολλών υπηρεσιών της Λουιζιάνα την άνοιξη του 2003 που αφορούσε έναν κατά συρροή δολοφόνο. Με βάση μια ομάδα 73 ενημερωτικών δεικτών προγόνων (AIM), οι εκτιμήσεις καταγωγής παρουσιάστηκαν ως αναλογίες με διαστήματα εμπιστοσύνης πολλαπλών μεταβλητών. Η ανάλυση έδειξε ότι η πηγή του δείγματος αποδεικτικών στοιχείων ήταν κυρίως η αφρικανική καταγωγή (85%) με μια μικρή ποσότητα ινδιάνικης πρόσμειξης (15%). Αυτό το κατασκευάσμα πρόσμειξης συσχετίστηκε με ένα άτομο που είχε σκούρο χρώμα και παρείχε διερευνητικές πληροφορίες αποκλειστικά από αυτή την άποψη.<sup>110,111</sup> Ο περιορισμός των AIM είναι πως είναι έμμεσα μέτρα του φαινοτύπου ενός ατόμου που μεταφέρουν μόνο βιογεωγραφική καταγωγή οπότε δεν έχουν αξία στην περιγραφή της φυσικής εμφάνισης ενός ατόμου. Μια ακριβέστερη γενετική πρόβλεψη της εμφάνισης προσφέρουν οι δείκτες με πληροφορίες φαινότυπου. Τα πιο προφανή περιγραφικά χαρακτηριστικά της εμφάνισης ενός ατόμου είναι ο χρωματισμός, το ύψος και τα χαρακτηριστικά του προσώπου, τα οποία είναι όλα εξαιρετικά κληρονομήσιμα. Θα πρέπει επομένως να είναι δυνατός ο προσδιορισμός των γενετικών πολυμορφισμών που ευθύνονται για αυτά τα διαφορετικά φαινοτυπικά γνωρίσματα. Οι περισσότερες εργασίες για τα SNP φαινοτύπου έχουν επικεντρωθεί στη μελάγχρωση, καθώς η γενετική βάση του χρώματος των μαλλιών, του δέρματος και των ματιών είναι καλά κατανοητή από μελέτες μοντέλων σε ζώα. Τα SNP σε έναν αριθμό γονιδίων μελάγχρωσης έχουν συσχετιστεί με διάφορους φαινότυπους χρώματος ανθρώπινων μαλλιών, δέρματος και ματιών.<sup>110</sup> Το πρώτο ανθρώπινο γονίδιο που αποδείχθηκε ότι σχετίζεται με φυσιολογική παραλλαγή χρωστικής ήταν το γονίδιο του υποδοχέα μελανοκορτίνης 1 ( MC1R ). Πολυάριθμα SNP σε αυτό το γονίδιο έχουν συνδεθεί με κόκκινα μαλλιά και ανοιχτόχρωμο δέρμα. Τρεις είναι οι κοινοί πολυμορφισμοί του MC1R , οι R151C, R160W και D294H, οι οποίοι αντιπροσωπεύουν περίπου το 90% των φαινοτύπων των κόκκινων μαλλιών και του ανοιχτού δέρματος σε ορισμένους πληθυσμούς.<sup>112</sup>

Αναπτύχθηκε μια ταχεία ιατροδικαστική δοκιμασία διαλογής για 12 παραλλαγές MC1R για τον φαινότυπο των κόκκινων μαλλιών ως εργαλείο για την παροχή διερευνητικών οδηγιών σχετικά με την εμφάνιση του δότη ενός αποδεικτικού δείγματος. Τα άτομα που δεν φέρουν τις παραλλαγές συνήθως δεν έχουν κόκκινα μαλλιά. Περίπου το 84% των κοκκινομάλλων είναι ανιχνεύσιμα με αυτή τη δοκιμή.<sup>110</sup> Είναι δύσκολο λοιπόν όπως βλέπουμε να αντικατασταθεί η ανάλυση STR με τα SNP, ωστόσο αυτά χρησιμοποιούνται ευρέως για ανάλυση δύσκολων ιατροδικαστικών δειγμάτων. Τα SNP ελέγχου ταυτότητας χρησιμοποιούνται συχνότερα, ενώ τα SNP της καταγωγής και τα φαινοτυπικά SNP θα χρησιμοποιηθούν σε πιο εξειδικευμένες εφαρμογές.

## Συμπεράσματα

Κάνοντας μια ανασκόπηση σε όσα αναφέρθηκαν στην παρούσα εργασία βλέπουμε πόσες μεθόδους διαθέτει η επιστήμη της εγκληματολογίας προκειμένου να εξιχνιάσει ένα έγκλημα τα τελευταία τουλάχιστον σαράντα χρόνια. Συλλέγοντας από τη σκηνή του εγκλήματος οτιδήποτε αποτελεί πειστήριο και μπορεί να κρύβει δακτυλικά αποτυπώματα και γενετικό υλικό, ενδέχεται να οδηγηθούμε στον δράστη. Η μοναδικότητα του DNA κάθε ατόμου καθώς και η δυνατότητα ανάλυσης σε πολύ μικρής ποσότητας δείγματα, αποτελεί σημαντικό όπλο προς την επίλυση του εγκλήματος με την μελέτη των γενετικών δεικτών (STR, VNTR) και τη σύγκριση με βάσεις δεδομένων όπως την CODIS του FBI. Αναλύονται οι πολυμορφισμοί του γενετικού υλικού και μελετώνται ακόμα και φαινοτυπικά και γεωγραφικά δεδομένα του δράστη. Δεν αρκεί όμως μόνο το DNA για να οδηγήσουμε τον δράστη ενώπιον της δικαιοσύνης. Άλλες ενόργανες μέθοδοι βοηθούν να διαπιστώσουμε εγκληματικές πράξεις όπως η βεβαιωμένη χρήση ναρκωτικών ουσιών από το θύμα με τεχνικές όπως MALDI-MS, HPLC-MS, η κατάχρηση πρωτότυπων εγγράφων μέσω φασματοσκοπίας υπεριώδους ορατού, η ανάλυση δειγμάτων από τόπους εγκλήματος με χρώμα και πολλές άλλες εφαρμογές. Οι επιστήμονες πάντοτε σε συμφωνία με τα πρωτόκολλα και τις διεθνείς οδηγίες φέρουν σε πέρας τις έρευνες και καταλήγουν στην επίλυση εγκλημάτων. Οι συνεχείς εξελίξεις στις επιστήμες οδηγούν σε όλο και νεότερα δεδομένα που διευκολύνουν όλο και περισσότερο το έργο των ερευνητών και της δικαιοσύνης.

## Βιβλιογραφία

1. Clarence R. J., Η ιστορική εξέλιξη της Εγκληματολογίας, Scribd, 2023
2. Longley R., Criminology Definition and History, ThoughtCo, 2020
3. [https://web.archive.org/web/20210709182404/http://www.justice.gr/site/el/ΓΙΑΤΟΝ\\_ΠΟΛΙΤΗ/Πληροφορίες/ΙατροδικαστικέςΥπηρεσίες.aspx](https://web.archive.org/web/20210709182404/http://www.justice.gr/site/el/ΓΙΑΤΟΝ_ΠΟΛΙΤΗ/Πληροφορίες/ΙατροδικαστικέςΥπηρεσίες.aspx) Υπουργείο Δικαιοσύνης, Διαφάνειας και Ανθρωπίνων Δικαιωμάτων (Τελευταία ενημέρωση 22/02/2024)
4. Γιώργου Χασιάκου, Ερμηνευτικό Λεξικό των -ισμών, εκδόσεις Επικαιρότητα, Αθήνα, 1992
5. Wolstenholme R., Jickells S., Forbes S., Analytical Techniques in Forensic Science, John Wiley & Sons Ltd, 2021
6. Deborah A. Kleypas, Ashish Badiye, Evidence Collection, NIH, 2023
7. Μανιάτης Κ. Πώς είναι να καθαρίζεις τον τόπο ενός εγκλήματος, 2020 oneman.gr
8. Svetlana Skobeleva, Alana Banyard, Brian Rooney, et. Al., Near-infrared spectroscopy combined with chemometrics to classify cosmetic foundations from a crime scene, science and justice, 2022, 62(3): 327-335
9. Analytical Techniques in Forensic Science, 2021, John Wiley & Sons Ltd, p. 54-55
10. S. P. Cram, S. B. Hawthorne, K. P. Hupe, and C. G. Markell, New Sample Preparation Methods for Chemical Analysis, American Chemical Society, 1991
11. Ann Clin, The laboratory management of a medicolegal specimen, 1976, 6(3):251-5
12. M.S. Tswett and the Invention of Chromatography, Lcgc North America, 2003, 21(5)
13. Robert L. Grob, Eugene F. Barry, Modern practice of gas chromatography, John Wiley & Sons, Inc., 2014
14. Current Research in Bioorganic & Organic Chemistry: Forensic Analysis of a Confiscated Illicit Heroin Sample Badria FA, et al. Curr Res Bioorg Org Chem: CRBOC-105, 2018
15. Coates V. J., Noebels H. J., Fagerson I. S., Gas Chromatography, Academic Press, New York, 1958
16. Gas Chromatography Explained: What It Is and How It Works, Perkin Elmer, 2022

17. Skoog D., Holler F. J., Crouch R. S., Αρχές ενόργανης ανάλυσης 6<sup>η</sup> έκδοση, εκδ. Κωσταράκη, 2007
18. Modern Practice of Gas Chromatography Robert L. Grob, Eugene F. Barry, 2004, John Wiley & Sons, Inc.
19. Chester T., Recent Developments in HPLC Stationary Phases, Milner Library: Illinois State University, 2012
20. Dolan J., A Guide to HPLC and LC-MS Buffer Selection, ACE
21. G. McCulloch, R.M. Morgan, P.A. Bull, High Performance Liquid Chromatography as a valuable tool for geoforensic soil analysis, 2016, Australian Journal of Forensic Sciences 49(4): 421-448
22. Loong Chuen Lee, Ab Aziz Ishak, Ameeta A/P Nai Eyan, et. al., Forensic profiling of non-volatile organic compounds in soil using ultra-performance liquid chromatography: a pilot study, Forensic Sci Res, 2021, 7(4): 761-773
23. Thanasoulas C. N., Piliouris E. T, Kotti E. M. S., Evmiridis P. N., Application of multivariate chemometrics in forensic soil discrimination based on the UV-Vis spectrum of the acid fraction of humus, Forensic Science International, 130:73–82, 2002
24. G. McCulloch, R.M. Morgan, High Performance Liquid Chromatography as a valuable tool for geoforensic soil analysis, 49(4): 421-448, 2017
25. McCulloch G., Dawson L.A., Ross J.M., Morgan R.M., The discrimination of geoforensic trace material from close proximity locations by organic profiling using HPLC and plant wax marker analysis by GC, 288: 310-326, 2018
26. Votaw R. V., Geyer R., Rieselbach M., McHugh R. K., The epidemiology of benzodiazepine misuse: A systematic review, Drug Alcohol Depend, 2019
27. Behnouth B., Sheikhezadi A., et. al., Comparison of UHPLC and HPLC in Benzodiazepines Analysis of Postmortem Samples, Medicine (Baltimore), 94(14), 2015
28. Steinkellner T., Freissmuth M., Sitte H., et. al., The ugly side of amphetamines: short- and long-term toxicity of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, 'Ecstasy'), methamphetamine and D-amphetamine, Biol Chem., 392(1-2):103-15, 2011
29. Jakobsson G., Kronstrand R., Segmental analysis of amphetamines in hair using a sensitive UHPLC-MS/MS method, Drug Testing and Analysis, 6(S1):22-29, 2014
30. Sachs H., Theoretical limits of the evaluation of drug concentrations in hair due to irregular hair growth, Forensic Science International, 70(1-3): 53-61, 1995
31. Cooper A. G., Kronstrand R., Kintz P., Society of Hair Testing guidelines for drug testing in hair, Forensic Science International, 218(1-3): 20-24, 2012

32. Jakobsson G., Kronstrand R., Segmental analysis of amphetamines in hair using a sensitive UHPLC-MS/MS method, *Drug Testing and Analysis*, 6(S1): 22-29, 2014
33. Bogusz M. J., Hyphenated liquid chromatographic techniques in forensic toxicology, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 733(1-2): 65-91, 1999
34. Capistrana B. A., Sisco E., Rapid GC-MS as a Screening Tool for Forensic Fire Debris Analysis, *Forensic Chem*, 2022
35. Harrison J. A., Diederich F., et. al., Temperature-Controlled Electrospray Ionization: Recent Progress and Applications, *Chemistry – A European Journal*, 27(72): 18015-18028, 2021
36. Murayama C., Kimura Y., et. al., Imaging mass spectrometry: principle and application, *Biophys Rev*, 1(3): 131, 2009
37. Ferguson L., Wulfert F, Wolstenholme R. et al Direct detection of peptides and small proteins in fingerprints and determination of sex by MALDI mass spectrometry profiling, *analyst*, 2012
38. Throck Watson, David Sparkman *Introduction to Mass Spectrometry: Instrumentation, Applications and Strategies for Data Interpretation*, 4th edition, John Wiley & Sons, 2007
39. *Introduction to Mass Spectrometry Instrumentation, Applications and Strategies for Data Interpretation* J.T. Watson and O.D. Sparkman, © 2007, John Wiley & Sons
40. Throck Watson, David Sparkman *Introduction to Mass Spectrometry: Instrumentation, Applications and Strategies for Data Interpretation*, 4<sup>th</sup> edition, John Wiley & Sons, 2007
41. Alan G. Marshall, Christopher Roe, Theory of Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectroscopy: Response to frequency-sweep excitation, 2008, *J. Chem. Phys.* 73, 1581–1590
42. Throck Watson, David Sparkman *Introduction to Mass Spectrometry: Instrumentation, Applications and Strategies for Data Interpretation*, 4<sup>th</sup> edition, John Wiley & Sons, 2007
43. J.T. Watson and O.D. Sparkman *Introduction to Mass Spectrometry Instrumentation, Applications and Strategies for Data Interpretation*, 2007, John Wiley & Sons
44. Legg M. K., Powell R., Reisdorph N. et al, Discovery of highly specific protein markers for the identification of biological stains, 2014, *journals*, 35 (21-22): 3069-3078
45. Sharif M., Jalees M. I., et. al., Discrimination of Pakistani Fountain Pen Inks by Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS), *Int J Anal Chem.*, 2022

46. Zlotnick J.A., Smith F.P., Chromatographic and electrophoretic approaches in ink analysis, *Journal of Chromatography B*, 733: 265–272, 1999
47. Lin H., Zeng X., Wan Q.g et al, Identification and imaging of indole-3-carboxamide cannabinoids in hair using matrix-assisted laser-desorption/ionization mass spectrometry, *Japanese Association of Forensic Toxicology* , 2019
48. Emma Beasley, Simona Francese, Tom Bassindale, Detection and Mapping of Cannabinoids in Single Hair Samples through Rapid Derivatization and Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry, ACS publications, 2016
49. Min Shen, Ping Xiang, Yan Shi et al, Mass imaging of ketamine in a single scalp hair by MALDI-FTMS, Springer link, 2014
50. G. Groeneveld et al., Detection and mapping of illicit drugs and their metabolites in fingerprints by MALDI MS and compatibility with forensic techniques, scientific reports, 2015
51. Pomara C., Neri M., Bello S., et. al. Neurotoxicity by synthetic androgen steroids: oxidative stress, apoptosis, and neuropathology: A review, 13(1):132-45, 2015
52. L Reyes-Vallejo, Current use and abuse of anabolic steroids, 44(5):309-313, 2020
53. Hernández-Guerra A. I., Tapia J., et. al., Sudden cardiac death in anabolic androgenic steroids abuse: case report and literature review, 19;4(3):267-273 , 2019
54. Integrated methodological approach to the gas chromatographic-mass spectrometric analysis of anabolic steroid metabolites in urine, *Journal of Chromatography*, 4489 (1989) 23-50
55. Cooper J.W., Spectroscopic Techniques for Organic Chemists, Wiley, 1980
56. Jaffé, H.H., Orchin M. Theory and Applications of Ultraviolet Spectroscopy, Wiley, 1962
57. Kumar R., Kumar V., Sharma V., Discrimination of Various Paper Types Using Diffuse Reflectance Ultraviolet–Visible Near-Infrared (UV-Vis-NIR) Spectroscopy: Forensic Application to Questioned Documents, 69(5), 2005
58. Can Hu, Hongcheng Mei, et. Al., Color analysis of textile fibers by microspectrophotometry, Forensic Chemistry, 2020
59. Jolanta Was-Gubala, Roza Starczak UV–Vis microspectrophotometry as a method of differentiation between cotton fibre evidence coloured with reactive dyes, 2015, 142: 118-125
60. Roux C., Novotny M., Evans I., Lennard C., A study to investigate the evidential value of blue and black ballpoint pen inks in Australia, *Forensic Science International*, 101(3): 167-176, 1999
61. Thanasoulas N. C., Parisi A. N., Evmiridis P. N., Multivariate chemometrics for the forensic discrimination of blue ball-point pen inks based on their Vis spectra, *Forensic*



62. Τι είναι η Φασματοσκοπία Raman, Qvarz: Custom Quartz Cuvettes & Cells ,2022
63. J. R. Ferraro, K. Nakamoto, “Introductory Raman Spectroscopy, 2<sup>nd</sup> edition, Elsevier, 2003
64. Nogueira, F., Castro, A., and Marques, M.A. (2003). A Tutorial on Density Functional Theory. A Primer in Density Functional Theory, Springer, 218–256
65. J. R. Ferraro, K. Nakamoto, “Introductory Raman Spectroscopy, 2<sup>nd</sup> edition, Elsevier, 2003
66. C. N. Banwell, Fundamentals of Molecular Spectroscopy, Tata McGraw-Hill, New Delhi, 1972
67. Skoog et. al., Αρχές ενόργανης ανάλυσης, 6η έκδοση, εκδ. Κωσταράκη, Αθήνα, 2002, σελ 558-560
68. M. Claybourn, M. Ansell, Using Raman spectroscopy to solve crimes: inks questioned documents and fraud, Sci. Justice 40 (2000) 261–271
69. S. Savioli, D. Bersani, et. al., Forensic applications of Raman spectroscopy: investigation of different inks and toners, in: G. Messina, S. Santangelo, GNSR 2001: State of Art and Future Development in Raman Spectroscopy and Related Techniques, IOS Press, Netherlands, 36–42, 2002
70. N.D. Kalantzis, Paper interference in ink Raman spectra at 685 nm: a preliminary report, presented at the XIII Scientific Symposium of Handwriting Expertise, Poland, 2008
71. F.A. Morsy, S.I. El-sherbiny, M. Awadalla, A systematic approach to Egyptian ballpoint ink analysis for forensic science application, Forensic Sci. J., 4: 1–13, 2005
72. M. Kunicki, Differentiating blue ballpoint pen inks, Probl. Forensic Sci. 51: 56–70, 2002
73. DiMaio VJ. Gunshot wounds: practical aspects of firearms, ballistics and forensic techniques, 2nd. Boca Raton, FL, USA: CRC Press, 1999
74. Euteneuer J., Courts C., Ten years of molecular ballistics: a review and a field guide, NIH, 135(4): 1121–1136, 2021
75. Kneubuehl B, Coupland RM, Rothschild MA, et al. Wound Ballistics. Basics and Applications. Berlin, Springer, 2011
76. Basu. S, Formation of Gunshot Residues, New York State Police Crime Laboratory, NY, 27(1), 1982
77. Price G., Recent Advances in Ballistics Laboratory Methods, England

78. Taudte R. V., Beavis A., et. al. Detection of Gunshot Residues Using Mass Spectrometry, 2014
79. M. H. Mach, A. Pallos, and P. F. Jones, "Feasibility of gunshot residue detection via its organic constituents. Part I: analysis of smokeless powders by combined gas chromatography chemical ionization mass spectrometry," *Journal of Forensic Sciences*, 23 (3): 433–445, 1978
80. H. Meng and B. Caddy, «Gunshot residue analysis—a review», *Journal of Forensic Sciences*, 42 (4): 553–570, 1997
81. J. L. Thomas, D. Lincoln, B. R. McCord, Separation and Detection of Smokeless Powder Additives by Ultra Performance Liquid Chromatography with Tandem Mass Spectrometry (UPLC/MS/MS), *Journal of Forensic Sciences*, 58 (3): 609–615, 2013 H. Meng and B. Caddy, «Gunshot residue analysis—a review», *Journal of Forensic Sciences*, 42 (4): 553–570, 1997
82. C. Weyermann, V. Belaud, F. Riva και F. S. Romolo, «Analysis of organic volatile residues in 9 mm spent cartridges», *Forensic Science International*, 186(1–3): 29–35, 2009
83. Δεληγιαννάκης Ι., Δομικός και Χημικός Χαρακτηρισμός των Υλικών: Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού, Ιωάννινα, 2014
84. McCarney R. E., Draper L. S., Benchtop nuclear magnetic resonance spectroscopy in forensic chemistry, 61(2): 106-129, 2021
85. Duffy J., Urbas A., Niemitz M., et.al., Differentiation of fentanyl analogues by low-field NMR spectroscopy, 1049:161-169, 2019
86. G. Assemet, F. Dubocq, S. Balayssac, et. al., Screening of "spice" herbal mixtures: From high-field to low-field proton NMR, *Forensic Sci. Int.*, 279:88, 2017
87. V. W. Weedn, S. S. Rogers, B. E. Henry, DNA Testing in the Forensic Laboratory, *Laboratory Medicine*, 29 (8): 484–489, 1998
88. B. Budowle, A. van Daal, Extracting evidence from forensic DNA analyses: Future molecular biology directions, *BioTechniques*, 46 (5): 339–350, 2009
89. Watson, Baker, Bell et.al., Μοριακή βιολογία του γονιδίου, 2<sup>η</sup> ελληνική έκδοση, εκδ Utopia, Αθήνα, 2021
90. Manuel A. Garrido-Ramos, Satellite DNA: An Evolving Topic, 8(9): 230, 2017
91. Chakraborty R, Stivers DN, Su B, Zhong Y, Budowle B. The utility of short tandem repeat loci beyond human identification: Implications for development of new DNA typing systems. *Electrophoresis* 1999; 20: 1682-1696

92. Biscotti M. A., Olmo E., Heslop-Harrison P., Repetitive DNA in eukaryotic genomes, Chromosome Research 23:415–420, 2015
93. Bruce Budowle, Angela van Daal, Forensically relevant SNP classes, Biotechniques, 44 (5), 2018
94. Williams J., Kubelik R. A, Livak J. K., et.al., DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers, Nucleic Acids Research, 18(22): 6531 USA, 1990
95. Wang, L. Wang, J.H. Zhang, W.H. Dong, A simplified universal genomic DNA extraction protocol suitable for PCR, Genet. Mol. Res. 10(1): 519-525, 2011
96. Penelope R. Haddrill, Developments in forensic DNA analysis, Emerg Top Life Sci, 5(3): 381–393, 2021
97. Lutz Roewer, DNA fingerprinting in forensics: past, present, future, Investigative Genetics 4, 2013
98. Alex Van Belkum, DNA Fingerprinting of Medically Important Microorganisms by Use of PCR, Clinical Microbiology Reviews, 7(2): 174-184, 1994
99. Wang, L. Wang, J.H. Zhang, W.H. Dong, A simplified universal genomic DNA extraction protocol suitable for PCR, Genet. Mol. Res. 10(1): 519-525, 2011
100. Hammond HA, Jin L, Hong Y, Caskey CT, Chakraborty R. Evaluation of 13 short tandem repeat loci for use in personal identification applications. Am J Hum Genet, 55:175-89, 1994
101. Buel E, Schwartz MB, LaFountain MJ., Capillary electrophoresis STR analysis: comparison to gel-based systems., J Forensic Sci., 43:164-70, 1998
102. Jaiprakash G. Shewale, Liwei Qi, Lisa M. Calandro, Principles, Practice, and Evolution of Capillary Electrophoresis as a Tool for Forensic DNA Analysis
103. A.T. Mohammed, S.R. Khalil, et. al., Validation of mRNA and microRNA profiling as tools in qPCR for estimation of the age of bloodstains, Life Sci. J. 15:1–7, 2018
104. Penelope R. Haddrill, Developments in forensic DNA analysis, Emerg Top Life Sci, 5(3): 381–393, 2021
105. Dwight E. Adams, Before the Senate Judiciary Committee Subcommittee on Crime and Drugs, Washington, D.C., 2002
106. Niamh Nic Daeid, Lucina Hackman, Mitochondrial DNA in forensic use, Emerg Top Life Sci., 5(3): 415–426, 2021
107. Σκορίλας Α., κλινική βιοχημεία και μοριακή διαγνωστική, εκδ Broken Hill, Κύπρος 2020

108. Niamh Nic Daeid, Lucina Hackman, Mitochondrial DNA in forensic use, *Emerg Top Life Sci.*, 5(3): 415–426, 2021
109. Jaiprakash G. Shewale, Liwei Qi, Lisa M. Calandro, Principles, Practice, and Evolution of Capillary Electrophoresis as a Tool for Forensic DNA Analysis
110. Bruce Budowle, Angela van Daal, Forensically relevant SNP classes, 44 (5), 2018
111. Frudakis T., K. Venkateswarlu, M.J. Thomas, et. al., A classifier for the SNP-based inference of ancestry, *J. Forensic Sci.*, 48:771–782, 2003
112. Rees, J.L., The melanocortin 1 receptor (MC1R): more than just red hair, *Pigment Cell Res.* 13:135–140, 2000
113. Denise Syndercombe Court, The Y chromosome and its use in forensic DNA analysis, *Emerg Top Life Sci.*, 5(3): 427–441, 2021
114. A. C. Ponce, M. Á. Seguí, M. M. Feucht, F.A. Pascual, Revelado de manchas latentes: efectividad del luminol y evaluación de su efecto sobre el estudio del DNA, *Cuad. med. Forense*, Málaga, 2002
115. Gomes M. F., Claudio Martin Pereira de Pereira , Kristiane de Cássia Mariotti et. al., Study of latent fingerprints : A review, *Forensic Chemistry*, 2023
116. The forensics Library: Crime scenes
117. Bradshaw R., Wolstenholme R., Ferguson L. S., et.al., Spectroscopic imaging based approach for condom identification in condom contaminated fingermarks, 138: 2546-2557, 2013
118. Pervez M. T., Hasnain M. J., A Comprehensive Review of Performance of Next-Generation Sequencing Platforms, *Hindawi*, 2022
119. Gross E. T., Fleckhaus J., Schneider M. P., Progress in the implementation of massively parallel sequencing for forensic genetics: results of a European-wide survey among professional users, *International Journal of Legal Medicine*, 135: 1425–1432, 2021
120. Bruijns B., Tiggelaar R., Gardeniers H., Massively parallel sequencing techniques for forensics: A review, *Electrophoresis*, 39(21): 2642-2654, 2018