



Σχολή Θετικών Επιστήμων και Τεχνολογίας

Χημική και Βιομοριακή Ανάλυση

Διπλωματική Εργασία

Η χρήση των χρωματογραφιών τεχνικών στην ιατροδικαστική

Ελευθέριος Ραφαήλ Κλεώπας

Επιβλέπων καθηγητής: Σουλτάνα Μαρκόπουλου

Πάτρα, Φεβρουάριος 2024

Η παρούσα εργασία αποτελεί πνευματική ιδιοκτησία του φοιτητή («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.



Η χρήση των χρωματογραφιών τεχνικών στην ιατροδικαστική

Ελευθέριος Ραφαήλ Κλεώπας

Επιτροπή Επίβλεψης Πτυχιακής / Διπλωματικής Εργασίας

Επιβλέπων Καθηγητής:
Σουλτάνα Μαρκόπουλου

Συν-Επιβλέπων Καθηγητής:
Κωνσταντίνα Τζουμάνη

Πάτρα, Φεβρουάριος 2024

«Έχοντας ολοκληρώσει την παρούσα εργασία θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα καθηγήτριά μου κυρία Μαρκοπούλου Σουλτάνα, η οποία με καθοδήγησε με τον καλύτερο δυνατό τρόπο και με τις παρατηρήσεις της, με βοήθησε να ολοκληρώσω αυτό το ταξίδι. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Θεοχάρη Νάζο που ήταν ο λόγος να μπω στον κόσμο των θετικών επιστημών, τον Σιμοδορο Μαστροκαλο που με στήριζε σε αυτό το μεταπτυχιακό μαζί με τους φίλους μου. Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου, η οποία ήταν δίπλα μου και με στήριζε καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου»

«Ευχαριστίες ή Αφιέρωση»

Περίληψη

Οι τεχνικές χρωματογραφίας έχουν χρησιμοποιηθεί εκτενώς στον τομέα της εγκληματολογίας για μια ευρεία γκάμα εφαρμογών. Οι τεχνικές αυτές προσφέρουν υψηλή ανάλυση, αποτελεσματικότητα, ευαισθησία και ειδικότητα, καθιστώντας τις ανεκτίμητα εργαλεία στις εγκληματολογικές έρευνες για τον διαχωρισμό, την ταυτοποίηση και τον ποσοτικό προσδιορισμό πολύπλοκων μειγμάτων ουσιών σε δείγματα. Στην παρούσα εργασία, εξετάζονται τα πλεονεκτήματα των τεχνικών χρωματογραφίας, με ιδιαίτερη έμφαση στην ικανότητά τους να παρέχουν ακριβή και αξιόπιστα αποτελέσματα, καθιστώντας τις αναντικατάστατες στις εγκληματολογικές έρευνες. Ειδικότερα, η υψηλή ανάλυση που παρέχουν αυξάνει την αποτελεσματικότητά τους σε πολύπλοκες αναλύσεις, συμβάλλοντας στην αξιοπιστία των εγκληματολογικών αποδεικτικών στοιχείων. Στις μελλοντικές προοπτικές γίνεται λόγος για τις δυνητικές εξελίξεις, όπως η τεχνολογική πρόοδος, η φορητότητα, η υψηλή αναλυτική ικανότητα, η ενσωμάτωση της τεχνητής νοημοσύνης και η προώθηση διεθνούς συνεργασίας. Αυτές οι εξελίξεις είναι προσανατολισμένες στο να αναβαθμίσουν τις δυνατότητες των τεχνικών χρωματογραφίας, ενισχύοντας περαιτέρω την εφαρμογή και την επίδρασή τους στις εγκληματολογικές έρευνες.

Λέξεις – Κλειδιά

Χρωματογραφία, Εγκληματολογία, Ανάλυση, Τεχνικές.

Abstract

Chromatography techniques have been extensively used in forensic science for a wide range of applications. These techniques offer high resolution, efficiency, sensitivity, and specificity, making them invaluable tools in forensic investigations for the separation, identification, and quantification of complex mixtures of substances in forensic samples. In this paper, we explore the advantages of chromatographic techniques, emphasizing their ability to provide precise and reliable results, making them indispensable tools in forensic investigations. Notably, the high resolution afforded by these techniques enhances their effectiveness in complex analyses, contributing to the robustness of forensic evidence. The future outlook explores potential advancements such as technological progress, portability, high-resolution analysis, integration with artificial intelligence, and the fostering of international collaboration. These developments are poised to elevate the capabilities of chromatographic techniques, further enhancing their application and impact in forensic investigations.

Keywords

Chromatography, Forensics, Analysis, Techniques.

Περιεχόμενα

Περίληψη	vii
Abstract.....	viii
Περιεχόμενα.....	ix
Κατάλογος Εικόνων	xi
Κατάλογος Πινάκων	xii
Συντομογραφίες & Ακρωνύμια.....	xiii
1. Εισαγωγή	1
1.1. Σημασία των Τεχνικών Χρωματογραφίας στην Εγκληματολογική Επιστήμη	1
2. Επισκόπηση διαφορετικών τεχνικών χρωματογραφίας.....	2
2.1. Ιστορική Αναδρομή.....	2
2.2. Γενικές Αρχές της Χρωματογραφίας.....	2
2.3. Είδη Χρωματογραφίας.....	3
2.4. Χρωματογραφικές τεχνικές βάση του υποστρώματος.....	4
2.4.1. Χρωματογραφία στήλης (Column Chromatography).....	4
2.4.2. Επίπεδη Χρωματογραφία (Planar Chromatography).....	6
2.5. Χρωματογραφικές Τεχνικές Βάση της Φυσικής Κατάστασης της Κινητής Φάσης.....	9
2.5.1. Χρωματογραφία Αερίου (Gas Chromatography, GC).....	9
2.5.2. Χρωματογραφία υγρού (Liquid Chromatography, LC)	11
2.6. Χρωματογραφικές τεχνικές βάση του μηχανισμού διαχωρισμού.....	15
2.6.1. Χρωματογραφία Συγγένειας (Affinity Chromatography, AC).....	16
2.6.2. Χρωματογραφία Ιοντοανταλλαγής (Ion-Exchange Chromatography, IEC)	17
2.6.3. Χρωματογραφία μέσω Πηκτώματος (Gel-Filtration Chromatography, GFC) ...	19
3. Εφαρμογές των Χρωματογραφικών Τεχνικών σε Εγκληματολογικές Έρευνες	21
3.1. Ιατροδικαστική Τοξικολογία	21
3.1.1. Η TLC στην Ιατροδικαστική Τοξικολογία.....	21
3.1.2. Η GC στην Ιατροδικαστική Τοξικολογία.....	23
3.1.3. Η HPLC στην Ιατροδικαστική Τοξικολογία.....	24
3.2. Ανάλυση Μελάνης	25
3.2.1. Η TLC στην Ανάλυση Μελάνης	25
3.2.2. Η HPTLC στην Ανάλυση Μελάνης.....	26
3.2.3. Η HPLC στην Ανάλυση Μελάνης	27
3.2.4. Η GC στην Ανάλυση Μελάνης.....	28
3.3. Ανάλυση Εκρηκτικών	29
3.3.1. Η HPLC στην Ανάλυση Εκρηκτικών	29
3.3.2. Η GC στην Ανάλυση Εκρηκτικών.....	31

4. Συμπεράσματα και Μελλοντικές Προοπτικές.....	32
4.1. Συμπεράσματα	32
4.1.1. Ανάλυση Φαρμάκων και Τοξικολογία	32
4.1.2. Ίχνη απόδειξης και ανάλυση υπολειμμάτων πυροβόλου όπλου.....	32
4.1.3. Ανάλυση DNA και Ιατροδικαστική Χημεία	32
4.1.4. Αποδοχή στην αίθουσα του δικαστηρίου και μετέπειτα	33
4.2. Μελλοντικές Προοπτικές.....	34
4.2.1. Προόδους στην τεχνολογία χρωματογραφίας.....	35
4.2.2. Μικρογραφία και φορητότητα	35
4.2.3. Ανάλυση υψηλής απόδοσης.....	35
4.2.4. Metabolomics και Προφίλ.....	36
4.2.5. Πρακτικές πράσινης χρωματογραφίας	36
4.2.6. Αναλύσεις δεδομένων, αυτοματισμός και τεχνητή νοημοσύνη.....	36
4.2.7. Διεπιστημονική συνεργασία και παγκόσμια τυποποίηση.....	36
5. Βιβλιογραφία	38

Κατάλογος Εικόνων

Εικόνα 1. Χρωματογραφικές Μέθοδοι	4
Εικόνα 2. Χρωματογραφία Στήλης	5
Εικόνα 3. Χρωματογραφία Λεπτής Στιβάδας	9
Εικόνα 4. Χρωματογραφία Αερίου	11
Εικόνα 5. Χρωματογραφία Υγρού Υψηλής Απόδοσης	13
Εικόνα 6. Χρωματογραφία Υπερκρίσιμου Υγρού	15
Εικόνα 7. Χρωματογραφία Συγγένειας	17
Εικόνα 8. Χρωματογραφία Ιοντοανταλλαγής	18
Εικόνα 9. Χρωματογραφία μέσω Πηκτώματος	19

Κατάλογος Πινάκων

Πίνακας 1. Ανίχνευση Φαρμάκων μέσω TLC	22
Πίνακας 2. Ανίχνευση φαρμάκων με την χρήση χρωματογραφίας αερίου.	24
Πίνακας 3. Ανίχνευση εκρηκτικών με την χρήση HPLC.	30

Συντομογραφίες & Ακρωνύμια

ΔΕ	Διπλωματική Εργασία
ΕΑΠ	Ελληνικό Ανοικτό Πανεπιστήμιο
ΘΕ	Θεματική Ενότητα
ΠΕ	Πτυχιακή Εργασία
ΠΣ	Πρόγραμμα Σπουδών
ΣΥΝ	Συντονιστής

1. Εισαγωγή

1.1. Σημασία των Τεχνικών Χρωματογραφίας στην Εγκληματολογική Επιστήμη

Η χρωματογραφία είναι μια φυσικοχημική διαδικασία διαχωρισμού που επιτρέπει την ανάλυση περίπλοκων μειγμάτων αποτελώντας μια από τις πιο βασικές και σημαντικές τεχνικές που χρησιμοποιούνται στον τομέα της εγκληματολογικής επιστήμης. Οι μέθοδοι χρωματογραφίας επιτρέπουν τον διαχωρισμό, τον εντοπισμό και τον ποσοτικό προσδιορισμό ουσιών σε δείγματα, πολλές φορές σε πολύ μικρές ποσότητες, πράγμα εξαιρετικά σημαντικό για την εγκληματολογική έρευνα (Butler 2005). Σε περιπτώσεις εγκλημάτων όπου τα στοιχεία είναι περιορισμένα ή σε μικρές συγκεντρώσεις, όπως τα ίχνη ναρκωτικών σε μια σκηνή εγκλήματος ή τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν σε μια βόμβα, οι τεχνικές χρωματογραφίας παρέχουν πολύτιμες πληροφορίες για τη φύση και την προέλευση των ουσιών (Saferstein 2004). Συγκεκριμένα, ο συνδυασμός των χρωματογραφικών τεχνικών με συστήματα δεδομένων και βιβλιοθήκες χημικών ουσιών, επιτρέπουν στους ερευνητές να συγκρίνουν δείγματα με γνωστές ουσίες και να καταλήξουν σε αξιόπιστα συμπεράσματα. Αυτό μπορεί να καθορίσει τον τρόπο διεξαγωγής μιας εγκληματολογικής έρευνας και να συμβάλει σημαντικά στη δικαστική διαδικασία (James and Nordby 2002).

2. Επισκόπηση διαφορετικών τεχνικών χρωματογραφίας

2.1. Ιστορική Αναδρομή

Η παρατήρηση του διαχωρισμού βαφής σε ένα λεπτό χαρτί οδήγησε στην πρώτη παρατήρηση μιας βασικής χρωματογραφικής τεχνικής. Αυτό το φαινόμενο οδήγησε στον εντοπισμό της λεγόμενης τριχοειδούς δράσης. Η τριχοειδής δράση αξιοποιήθηκε με την κηλίδωση μιας σταγόνας χρωστικής σε χαρτί τοποθετημένη σε δοχείο που περιείχε καθαρούς διαλύτες, γεγονός που αποτέλεσε την πρώτη αναφορά για την ανάπτυξη της χρωματογραφίας (Williams 2002). Κατά τη διάρκεια του 1930-50, η προσπάθεια του Archer John Porter Martin και του Richard Laurence Millington Synge, τους απένεμε το Νόμπελ Χημείας (1952) για την αναγνώριση της τεχνικής χρωματογραφίας (Gal 2010). Εν τω μεταξύ, ο Mikhail Semyonovich Tsvet ορμώμενος από την ιδέα της χρωματογραφίας χαρτιού ανέπτυξε μια διαχωριστική στήλη προσρόφησης υγρού (ανθρακικού ασβεστίου) για τον διαχωρισμό των χρωστικών που υπάρχουν σε φυτικά εκχυλίσματα (Livengood 2009). Οι Martin και Synge χρησιμοποίησαν τη βασική αρχή της χρωματογραφίας κατάτμησης για την ταχεία ανάπτυξη μεθόδων χρωματογραφίας όπως η χρωματογραφία χάρτου, η χρωματογραφία λεπτής στιβάδας, η χρωματογραφία αερίου, η χρωματογραφία υγρών υψηλής απόδοσης και η χρωματογραφία συγγένειας (Jennings and Poole 2021).

2.2. Γενικές Αρχές της Χρωματογραφίας

Ως χρωματογραφία ορίζεται η φυσική μέθοδος διαχωρισμού κατά την οποία τα διαχωριζόμενα συστατικά κατανέμονται σε δύο φάσεις εκ των οποίων η μία είναι στάσιμη (στατική φάση) ενώ η άλλη κινείται σε καθορισμένη διεύθυνση (κινητή φάση). Ο διαχωρισμός επιτυγχάνεται εξαιτίας των διαφορών συγγένειας των ουσιών του προς ανάλυση μείγματος ως προς τις δύο φάσεις.

Η αρχή λειτουργίας της χρωματογραφίας βασίζεται στον καταμερισμό ή την κατανομή ενός δείγματος, το οποίο περιλαμβάνει μια διαλυμένη ουσία που ρέει μεταξύ μιας κινούμενης και μιας ακινητοποιημένης φάσης. Υπάρχει μια συνεχής κίνηση των μορίων της διαλυμένης ουσίας μεταξύ των δύο φάσεων που παρέχει μια κινητική μοριακή κίνηση για την ανταλλαγή σωματιδίων. Για παράδειγμα, το για πόσο χρόνο ορισμένες διαλυμένες ουσίες που διατηρούνται περισσότερο στη στατική φάση βασίζεται στον συντελεστή διάχυσής τους, ενώ άλλες μεταναστεύουν γρηγορότερα στην κινητή φάση. Υπάρχει πάντα μια ισορροπία μεταξύ της κινητής και της στατικής φάσης. Ο συντελεστής διάχυσης είναι ένας παράγοντας μεταξύ της διαλυμένης ουσίας και των δύο φάσεων, ο οποίος είναι ο λόγος της συγκέντρωσης της διαλυμένης ουσίας στην στατική φάση προς αυτή στην

κινούμενη ή κινητή φάση (Ismail and Nielsen 2010, Lundanes, Reubsaet et al. 2013). Ο συντελεστής διάχυσης (K_d) δίνεται από τον τύπο:

$$K_d = \frac{\text{Συγκέντρωση της διαλυμένης ουσίας στην στατική φάση (} C_s \text{)}}{\text{Συγκέντρωση της διαλυμένης ουσίας στην κινητή φάση (} C_m \text{)}}$$

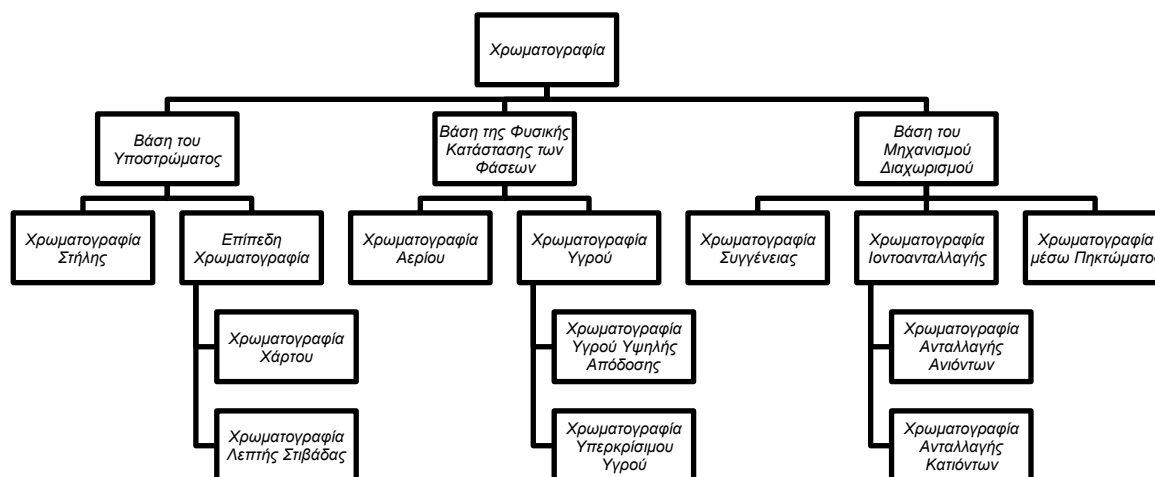
Η στατική φάση στην χρωματογραφία μπορεί να είναι είτε στερεή είτε υγρή, ακινητοποιημένη πάνω σε ένα υπόστρωμα. Η κινητή φάση μπορεί να είναι υγρή ή αέρια και κινείται διαμέσου και κατά μήκος της στατικής φάσης. Εάν η κινητή φάση είναι υγρή τότε η χρωματογραφία ορίζεται ως χρωματογραφία υγρού (liquid chromatography, LC), ενώ εάν είναι αέρια, τότε ορίζεται ως χρωματογραφία αερίου (gas chromatography, GC). Τα μοριακά χαρακτηριστικά που σχετίζονται με την προσρόφιση στερεού-υγρού, την κατανομή και τις διαφορές ή τις συγγένειες μεταξύ των μοριακών τους βαρών είναι οι παράγοντες που επηρεάζουν τη διαδικασία διαχωρισμού. Εξαιτίας αυτής της διαφοράς, όταν η κινητή φάση που περιέχει το μείγμα των ενώσεων περνά πάνω από τη στατική φάση, μερικά από τα συστατικά παραμένουν περισσότερο στις στατικές φάσεις ενώ άλλα περνούν γρήγορα στην κινητή φάση και εγκαταλείπουν το χρωματογραφικό σύστημα (Harris 2012). Ο χρόνος από τη στιγμή της έγχυσης του δείγματος μέχρι τη στιγμή που η κορυφή της ουσίας φθάνει στον ανιχνευτή ορίζεται ως χρόνος κατακράτησης (t_R) και υπολογίζεται από τον ακόλουθο τύπο:

$$t_R = t_s + t_m$$

όπου t_s είναι ο χρόνος που τα συστατικά του μείγματος βρίσκονται στην στατική φάση και t_m είναι ο χρόνος που τα συστατικά του μείγματος βρίσκονται στην κινητή φάση (Bushra 2018).

2.3. Είδη Χρωματογραφίας

Ανάλογα με την ανάγκη διαχωρισμού ή καθαρισμού ενός χημικού ή ενός αναλυτή, υπάρχουν διαφορετικές χρωματογραφικές τεχνικές. Μερικές από αυτές απεικονίζονται στην εικόνα 1 και θα αναλυθούν παρακάτω.



Εικόνα 1. Χρωματογραφικές Μέθοδοι

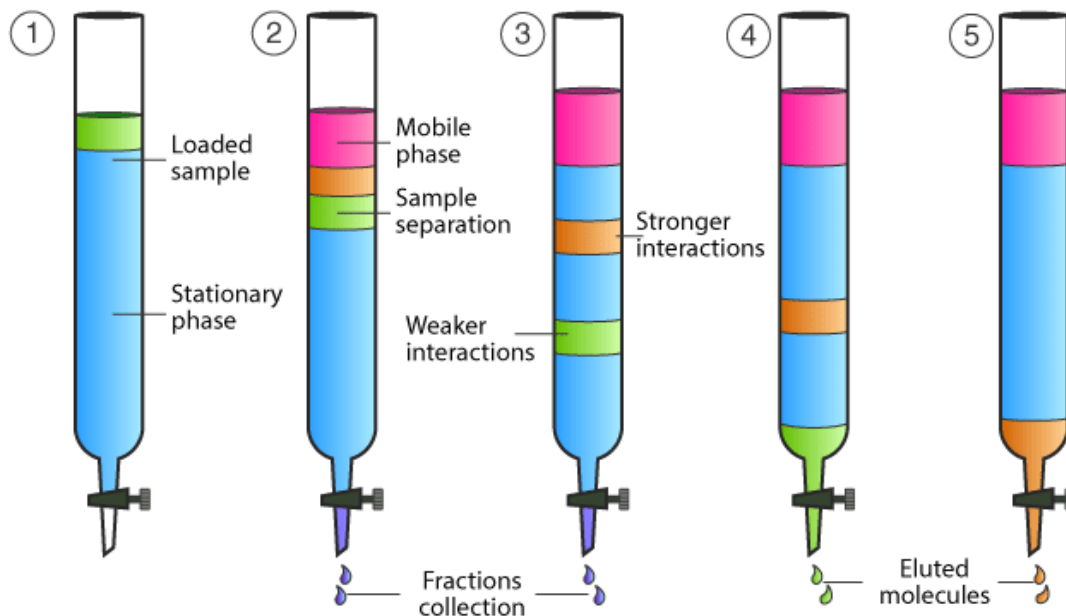
2.4. Χρωματογραφικές τεχνικές βάση του υποστρώματος

2.4.1. Χρωματογραφία στήλης (Column Chromatography)

Η χρωματογραφία στήλης βρίσκει συχνά εφαρμογή στην απομόνωση και των καθαρισμό βιομορίων. Η στατική φάση τοποθετείται σε μία στήλη ενώ το προς ανάλυση δείγμα εφαρμόζεται στην πρώτη στην κορυφή της στήλης. Τα συστατικά του δείγματος διαχωρίζονται καθώς διέρχονται από την στήλη με την χρήση ρυθμιστικών διαλυμάτων και σταδιακών εκλούσεων (Das and Dasgupta 1998). Τα συστατικά της κινητής φάσης που αλληλοεπιδρούν περισσότερο με την στατική φάση, κινούνται πιο αργά στην στήλη ενώ εκείνα με τις ασθενέστερες αλληλεπιδράσεις διέρχονται ταχύτερα από την στήλη (Snyder, Kirkland et al. 2011).

Στην χρωματογραφία στήλης, η στήλη γεμίζεται με σφαιρίδια με βάση το γυαλί ή κάποιο μέταλλο, δημιουργώντας την στατική φάση. Το έκλουσμα (μείγμα αναλυτών που αποτελεί και την κινητή φάση) αντλείται μέσω ενός συστήματος υπό πίεση είτε με υγρό είτε με αέριο. Η στατική φάση γίνεται με τη μορφή υποστρώματος είτε επικαλύπτοντας τα σφαιρίδια και στη συνέχεια τοποθετώντας τα σε στενή επαφή εντός της στήλης, είτε με εφαρμογή λεπτής μεμβράνης στα εσωτερικά τοιχώματα της στήλης. Οι αναλυόμενες ουσίες συλλέγονται ως εκλούσματα όταν εξέρχονται από τη στήλη με βάση τους συντελεστές διάχυσής τους με την κινητή φάση (Coskun 2016).

COLUMN CHROMATOGRAPHY



Εικόνα 2. Χρωματογραφία Στήλης

Στην βάση της στήλης τοποθετείται επίθεμα από ίνες μαλλιού ή αμιάντου πριν από την προσθήκη στατικής φάσης για να διευκολύνεται η ομοιόμορφη συσκευασία των σφαιριδίων. Τα σφαιρίδια στη συνέχεια τοποθετούνται στη στήλη είτε σε ξηρή μορφή είτε ως πολτός. Για τη συσκευασία της στήλης χρησιμοποιούνται συνήθως σιλικαγέλη (οξείδιο του πυριτίου, SiO_2) ή αλουμίνα (οξείδιο του αργιλίου, Al_2O_3) (Okhrimenko, Nielsen et al. 2020). Η στήλη αποτελείται από ένα μακρύ σωλήνα με μήκος 20-50cm και διάμετρο περίπου 4mm κατασκευασμένο από ανοξείδωτο χάλυβα ή γυαλί για την υγρή χρωματογραφία. Στην αέρια χρωματογραφία, χρησιμοποιείται μήκος 1-3m και διάμετρος 2-4mm (Press 2010). Η κινητή φάση είναι πάντα συμπληρωματικής της στατικής φάσης και εισέρχεται στο χρωματογραφικό σύστημα μέσω ενός τον εγχυτήρα. Η έκλυση επιτυγχάνεται με τη χρήση διαλυτών με βάση την πολικότητά της είτε με ισοκρατική έκλυση (χρησιμοποιώντας έναν μόνο διαλύτη) είτε με βαθμιδωτή έκλυση (με την προσθήκη περισσότερων του ενός διαλυτών με πολικότητα που κυμαίνεται από μη πολική έως πολική) (Łacki and Riske 2020). Η ανίχνευση των εκλούσματος γίνεται με την χρήση ενός ανιχνευτή που βασίζεται σε ορατή, υπεριώδη ακτινοβολία ή απορρόφηση φθορισμού. Ορισμένοι περιοριστικοί παράγοντες που επηρεάζουν τη χρωματογραφία στήλης είναι η φύση του διαλύτη, η θερμοκρασία και η πίεση της στήλης. Οι διαστάσεις της στήλης και το μέγεθος των σφαιριδίων είναι επίσης παράγοντες που πρέπει να ληφθούν υπόψη (Grinberg and Carr 2020).

Η χρωματογραφία έχει ευρεία εφαρμογή. Η χρωματογραφία στήλης έχει βοηθήσει στην εξαγωγή φυτοφαρμάκων ζωικής προέλευσης (που αποτελούνται από λιπίδια, κερία και χρωστικές ουσίες) (Castillo, Carbonell et al. 2012). Στον ιατρικό τομέα, η πεπτιδική ορμόνη πραμλιντίδη (ανάλογο αμυλίνης) για τη θεραπεία του διαβήτη συντίθεται με τη βοήθεια χρωματογραφικής τεχνικής (Schmitz, Brock et al. 2004). Συνήθως, η χρωματογραφία στήλης χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό των ακαθαρσιών και τον καθαρισμό βιολογικών μιγμάτων. Χρησιμοποιείται επίσης για την απομόνωση ενεργών μορίων και την εκχύλιση μεταβολιτών από μια μεγάλη γκάμα δειγμάτων. Τα ακατέργαστα εκχυλίσματα (σύνθετα χημικά μείγματα) στη συνέχεια υποβάλλονται σε επεξεργασία με διάφορες χρωματογραφικές τεχνικές όπως η TLC, HPLC και GC, για τη διάκριση και τον ποσοτικό προσδιορισμό των επιθυμητών ενώσεων (Bajpai, Majumder et al. 2016). Επί του παρόντος, η τεχνική χρησιμοποιείται στην ανίχνευση φαρμάκων από ακατέργαστα εκχυλίσματα, τα οποία στη συνέχεια εξετάζονται για να διαχωριστούν και να ποσοτικοποιηθούν διάφορες κατηγορίες αναμενόμενων συστατικών που υπάρχουν. Για παράδειγμα, χρησιμοποιείται για τον καθαρισμό των αντιικών βιοενεργών γλυκολιπιδίων έναντι του HSV-1 (ιός του έρπητα) (Hayashi, Lee et al. 2019).

2.4.2. Επίπεδη Χρωματογραφία (Planar Chromatography)

Η επίπεδη χρωματογραφία είναι μια τεχνική διαχωρισμού κατά την οποία η στατική φάση προετοιμάζεται με τη μορφή μιας επίπεδης επιφάνειας. Ανάλογα της επιφάνειας που χρησιμοποιείται, υπάρχουν παραλλαγές. Για παράδειγμα, όταν η βάση είναι ένα στρώμα στερεών συστατικών που απλώνονται είτε σε γυαλί είτε σε χαρτί, τότε αναφερόμαστε στις τεχνικές χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) ή χρωματογραφία χάρτου, αντίστοιχα. Σε αυτή τη μέθοδο, η ροή της κινητής φάσης επιτυγχάνεται μέσω τριχοειδικών δράσεων και διαφορετικές ενώσεις στο μείγμα εκλύονται ανάλογα με την αλληλεπίδρασή τους με τις στατικές φάσεις (Sherma 2018). Η αναγνώριση των συστατικών ενός μείγματος σχετίζεται με έναν ειδικό συντελεστή κατακράτησης (Retention Factor, R_f) για κάθε ένωση. Η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη επίπεδη χρωματογραφία είναι η TLC, η οποία χρησιμοποιείται συνήθως για τον διαχωρισμό μικρών μορίων και δευτερογενών μεταβολιτών. Αργότερα, η συμβατική TLC τροποποιήθηκε για να αποκτήσει υψηλή ανάλυση, απόδοση και ακρίβεια οδηγώντας στην χρωματογραφία λεπτής στιβάδας υψηλής απόδοσης (high-performance thin-layer chromatography, HPTLC). Παρόμοια τεχνική, με ελαφρώς τροποποιημένο προσροφητικό στρώμα και με την προσθήκη συνεχόμενης, σταθερής περιστροφής (φυγόκεντρος δύναμη) είναι η επίπεδη χρωματογραφία περιστροφής, η οποία οδηγεί σε ταχύτερο διαχωρισμό. Η χρωματογραφία λεπτής στιβάδας υψηλής ταχύτητας (HSTLC) και η υγρή χρωματογραφία

υπερπίεσης (OPLC) είναι οι άλλες τροποποιημένες εκδόσεις των επίπεδων χρωματογραφικών μεθόδων (Argekar 2006).

2.4.2.1. Χρωματογραφία Χαρτιού (Paper Chromatography)

Η χρωματογραφία χαρτιού βασίζεται στην χρήση ενός παχέος διηθητικού χαρτιού (κυτταρίνη). Το πλεονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι ότι ένα σύνθετο μείγμα με παρόμοια πολικότητα (όπως τα αμινοξέα) μπορεί να διαχωριστεί με επιτυχία. Καθώς δίνεται προτίμηση στην καθαρότητα των συστατικών, αυτή η τεχνική είναι χρήσιμη για την αξιολόγηση υλικών περιορισμένης ποσότητας (Block, Durrum et al. 2013).

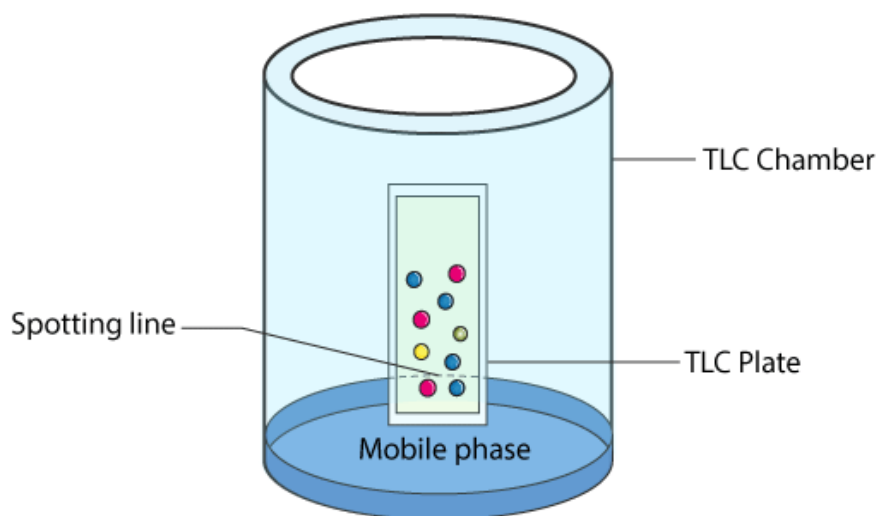
Η αρχή της χρωματογραφίας χαρτιού βασίζεται στον διαφορετικό βαθμό αλληλεπίδρασης μεταξύ των συστατικών του μίγματος και της στατικής φάσης. Αποτελείται από δύο τύπους, την χρωματογραφία προσρόφησης χαρτιού και την χρωματογραφία διαχωρισμού χαρτιού (Block, Durrum et al. 2013). Η πρώτη αφορά στην ικανότητα των ενώσεων που υπάρχουν στο μείγμα να κατανέμονται μεταξύ της στατικής και της κινητής φάσης. Τα συστατικά με χαμηλότερη συγγένεια προς τη στατική φάση κινούνται πιο γρήγορα και διαχωρίζονται ως διαφορετικά κλάσματα. Στην δεύτερη, οι σταγόνες του υγρού στοιχείου της στατικής φάσης καταλαμβάνουν τον χώρο των πόρων του χαρτιού, δημιουργώντας έτσι μια «ακίνητοποιημένη» υγρή στατική φάση που συγκρατεί καλύτερα τα συστατικά του μίγματος που έχουν μεγαλύτερη συγγένεια προς την κινητή φάση και επομένως εμφανίζει καλύτερη ανάλυση (Patil, Ghagare et al. 2020). Το σύστημα χρωματογραφίας χαρτιού αποτελείται από κινητή φάση (μείγμα μη πολικού οργανικού διαλύτη), στατική φάση (πολικός ανόργανος διαλύτης όπως το νερό) και η αλληλεπίδραση μεταξύ των δύο φάσεων προέρχεται κυρίως από τριχοειδικά φαινόμενα (Stoddard, Nguyen et al. 2007). Σε αυτή την τεχνική, εφαρμόζεται ο συντελεστής κατακράτησης και οι τιμές των διαφορετικών συστατικών του μίγματος προσδιορίζεται από τον λόγο της απόστασης που διανύουν τα συστατικά προς την απόσταση που διανύει η κινητή φάση. Με τις διαφορετικές και μοναδικές τιμές του συντελεστή κατακράτησης, τα συστατικά προσδιορίζονται και διαφοροποιούνται. Ως στατική φάση χρησιμοποιείται λεπτό χαρτί κυτταρίνης υψηλής ποιότητας και ως κινητή φάση χρησιμοποιούνται διάφοροι οργανικοί και ανόργανοι διαλύτες (Basha 1988). Μια μικρή ποσότητα του ακατέργαστου δείγματος (2-200μL) τοποθετείται στο χαρτί και αφήνεται να στεγνώσει. Ακολουθεί εμβάπτιση του χαρτιού στην κινητή φάση σε ύψος 1cm. Όταν η κινητή φάση έχει διανύσει πάνω από τα δύο τρίτα του χαρτιού, ο συντελεστής κατακράτησης υπολογίζεται από τα αναπτυγμένα χρωματογραφήματα και τα συστατικά ανιχνεύονται και προσδιορίζονται (Block, Durrum et al. 2013).

Η χρωματογραφία χαρτιού χρησιμοποιείται κυρίως για τον προσδιορισμό της καθαρότητας διαφόρων φαρμακευτικών προϊόντων. Σε τρόφιμα και ποτά, χρησιμοποιείται για την ανίχνευση μόλυνσης, ενώ σε άλλες βιομηχανίες, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για ποικίλους σκοπούς διαχωρισμού. Στα χημικά εργαστήρια, η χρωματογραφία χάρτου χρησιμοποιείται για την ανάλυση μίγματος αντιδράσεων (Bilek and Namieśnik 2016, Lakka and Kuppan 2019).

2.4.2.2. Χρωματογραφία Λεπτής Στιβάδας (Thin-Layer Chromatography)

Η χρωματογραφία λεπτής στιβάδας είναι μια τεχνική διαχωρισμού όπου μία λεπτή επίστρωση εφαρμόζεται σε ένα πλακίδιο και δρα ως στατική φάση, ενώ η κινητή φάση είναι υγρή. Η TLC κατατάσσεται στις τεχνικές προσρόφησης στερεού-υγρού όπου η στατική φάση δρα ως στερεό προσροφητικό (αλουμίνα, σιλικάγέλη, κυτταρίνη) και η κινητή φάση ρέει ως υγρό που λειτουργεί με την αρχή της τριχοειδούς δράσης. Είναι πιο γρήγορη, ευαίσθητη και εξαιρετικά αναπαραγωγίσιμη τεχνική συγκριτικά με την χρωματογραφία χαρτιού, αποτελώντας ως εκ τούτου μια αποτελεσματική αντικατάστασή της. Συγκριτικά, η ανάλυση TLC είναι πολύ μεγαλύτερη από την τροποποίηση στο μέγεθος των σφαιριδίων της πλάκας σε σχέση με τις ίνες χαρτιού στη χρωματογραφία χαρτιού (Swarbrick). Η επίστρωση της στατικής φάσης καλύπτεται από ένα λεπτό στρώμα πηκτής πυριτίου (σιλικαγέλη) που μετατρέπεται σε πολτό, ενώ το μίγμα του δείγματος σχηματίζει κηλίδες πάνω σε αυτό το ξηρό στρώμα. Τα δείγματα διαχωρίζονται με βάση τη συγγένειά τους προς τη στατική φάση, ενώ τα άλλα συστατικά με χαμηλή συγγένεια στη στατική φάση εκκλούνται μαζί με την κινητή φάση (Basu, C Dey et al. 2016). Περίπου 1cm πάνω από την άκρη της πλάκας το δείγμα τοποθετείται με την μορφή σταγόνας στη στατική φάση, η οποία γενικά αποτελείται από γυαλί, λεπτή πλάκα ή φύλλο αλουμινίου. Περαιτέρω, αυτή η πλάκα στεγνώνει προσεκτικά και τοποθετείται σε ένα βάζο/θάλαμο που περιέχει την κινητή φάση με τον διαλύτη γεμάτο όχι περισσότερο από 1 cm σε ύψος. Καθώς η κινητή φάση ρέει προς το άλλο άκρο της πλάκας, αναμένεται να μεταφέρει τα δείγματα με βάση τη συγγένειά τους. Μόλις ο διαλύτης κινηθεί γύρω στα δύο τρίτα της πλάκας, αποσπάται από το χρωματογραφικό σύστημα, αποξηραίνεται και ο συντελεστής κατακράτησης υπολογίζεται αντίστοιχα όπως στην χρωματογραφία χάρτου (Fair and Kormos 2008, Wang, Chen et al. 2016).

THIN LAYER CHROMATOGRAPHY



Εικόνα 3. Χρωματογραφία Λεπτής Στιβάδας

Η TLC επιτρέπει την αξιολόγηση διαφόρων φαρμακολογικών προϊόντων και την ταυτοποίηση φαρμακευτικών φυτών και των συνθέσεων τους (Fried and Sherma 2003, Reich and Schibli 2007). Χρησιμοποιείται επίσης στη διερεύνηση των ινών (βαμμένο μαλλί και βαμβάκι) στην εγκληματολογία (Wiggins, Holness et al. 2005) και τον προσδιορισμό ενεργών φαρμακευτικών συστατικών όπως η ταζαροτένη (προφάρμακο ρετινοειδούς εκλεκτικού υποδοχέα) που χρησιμοποιείται για τη θεραπεία της ακμής (Gaikwad, Sharma et al. 2020). Στα φαρμακευτικά προϊόντα, βοηθά στον προσδιορισμό του περιεχομένου των δόσεων, της καθαρότητας, της συνοχής των φαρμάκων και των προϊόντων τους και στην παρακολούθηση της διαδικασίας των σκευασμάτων και της ανάλυσης φυτικών φαρμάκων (Argekar 2006).

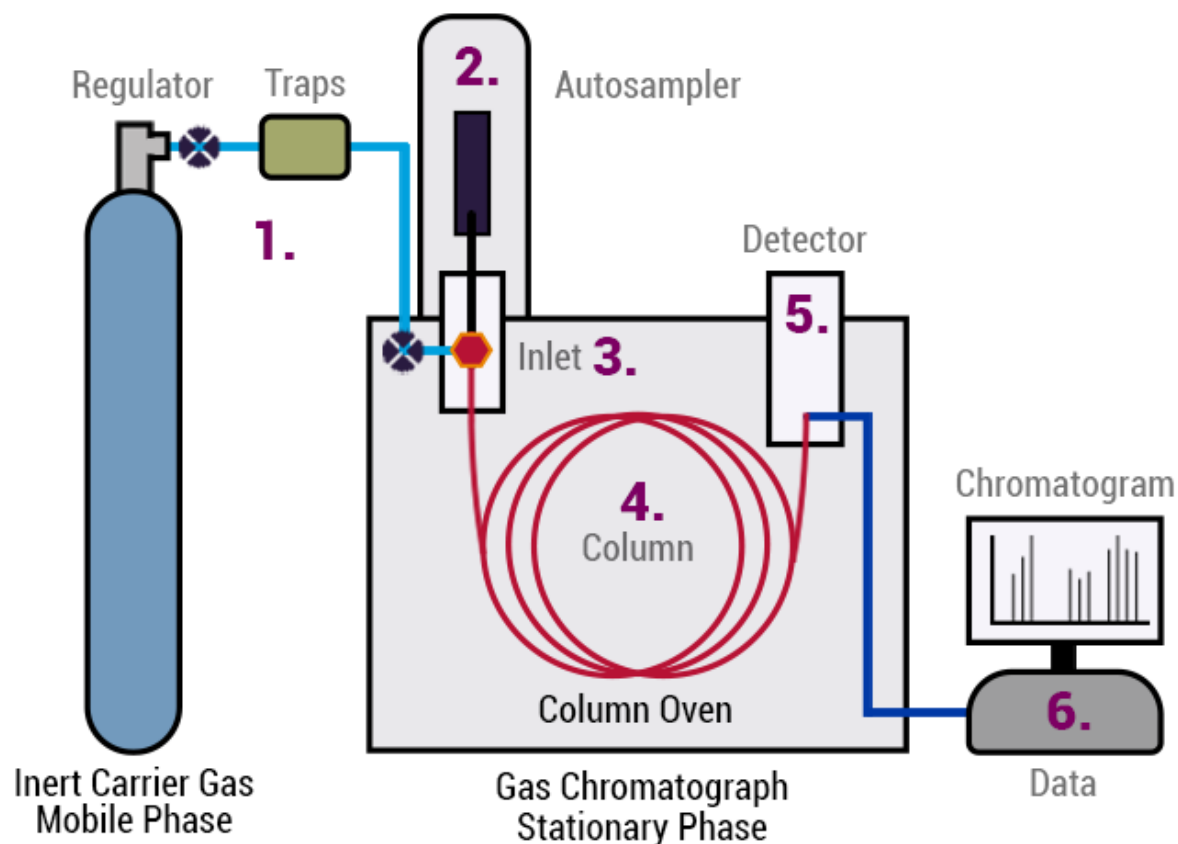
2.5. Χρωματογραφικές Τεχνικές Βάση της Φυσικής Κατάστασης της Κινητής Φάσης

2.5.1. Χρωματογραφία Αερίου (Gas Chromatography, GC)

Η χρωματογραφία αερίου είναι ιδιαίτερα χρήσιμη για την ανάλυση πτητικών συστατικών (Jacobs, Hilder et al. 2013). Σε αυτή την μέθοδο, η στατική φάση αποτελείται από μια στήλη που περιέχει κάποιο υγρό, ενώ η κινητή φάση βρίσκεται σε μορφή αερίου. Συνεπώς, η χρωματογραφία αερίου ανήκει στην κατηγορία αερίου-υγρού. Για την κινητή φάση, χρησιμοποιούνται κυρίως αδρανή αέρια, όπως He ή N₂. Η χρωματογραφία αερίου είναι μια απλή αλλά ταυτόχρονα υψηλής ευαισθησίας τεχνική με δυνατότητα εφαρμογής για τον διαχωρισμό πολύ μικρών μορίων, ενώ για

την επίτευξή της απαιτούνται μικρές ποσότητες αναλυτών (Coskun 2016). Η κινητή φάση διέρχεται μέσω της στήλης υπό υψηλή πίεση. Το προς ανάλυση μίγμα μετατρέπεται σε αέριο και έπειτα εισέρχεται στην αέρια κινητή φάση (Coskun 2016).

Η αρχή είναι παρόμοια με αυτή της τεχνικής χρωματογραφίας στήλης με ορισμένες διακριτές διαφορές. Σε αυτή την περίπτωση, το υγρό είναι η στατική φάση και το αέριο είναι η κινητή φάση. Μια άλλη διαφορά από τη χρωματογραφία στήλης είναι ο έλεγχος θερμοκρασίας που υπάρχει για τη θέρμανση της αέριας φάσης αλλά απουσιάζει σε μια τυπική χρωματογραφία στήλης (Coskun 2016). Η GC είναι επίσης γνωστή ως χρωματογραφία φάσης ατμού (Vapor-Phase Chromatography, VPC), όταν το υγρό στη στατική φάση μετατρέπεται σε ατμούς και επίσης χρωματογραφία κατανομής αερίου-υγρού (Gas-Liquid Partition Chromatography, GLPC), επειδή τα συστατικά συγκεντρώνονται κυρίως από την πίεση που ασκείται από τους ατμούς του αερίου. Ο χρόνος κατακράτησης υπολογίζεται για την εκτίμηση της συγγένειας των συστατικών στο μείγμα. Όσο μεγαλύτερη είναι η συγγένεια με τη στατική φάση, τόσο μεγαλύτερος είναι ο χρόνος κατακράτησης. Εδώ, η κινητή αέρια φάση είναι συνήθως ήλιο που μεταφέρει το μίγμα του δείγματος μέσω της στήλης που μετατρέπεται σε ατμούς και περνά μέσα από τους ανιχνευτές για να προσδιοριστεί ο χρόνος κατακράτησης, που συλλέγεται χωριστά σε διαφορετικούς χρόνους καθώς εκλύεται έξω από το σύστημα. Το μίγμα του δείγματος στη συνέχεια εισάγεται στη στήλη με τη μορφή ατμών. Τα εξατμισμένα συστατικά αναμιγνύονται με το αέριο και μεταφέρονται στη στήλη ενώ η στήλη στατικής φάσης οργανώνεται με βάση τη συγγένεια των συστατικών που πρόκειται να διαχωριστούν σε διαφορετικούς χρόνους. Η αναλυόμενες ουσίες φτάνουν στον ανιχνευτή σε διαφορετικούς χρόνους λόγω της διαφοράς στη συγγένειά τους και με βάση αυτή τη διαφορά υπολογίζεται ο συντελεστής κατακράτησης (Vazquez-Roig and Pico 2012).



Εικόνα 4. Χρωματογραφία Αερίου

Η GC χρησιμοποιείται στην ανάλυση ατμοσφαιρικών ρύπων και πετρελαιοκηλίδων (Sinha and Venkatakrishna-Bhatt 2004). Η συγκέντρωση διαφορετικών χημικών ουσιών από διάφορα δείγματα μπορεί να υπολογισθεί με αυτήν την τεχνική. Στην εγκληματολογική επιστήμη, χρησιμοποιείται για τον εντοπισμό και την ποσοτικοποίηση διαφόρων δειγμάτων που συλλέχθηκαν στον τόπο του εγκλήματος (Zadora and Zuba 2006). Οι μεταβολίτες βιολογικών δειγμάτων και δειγμάτων ιστού αναλύονται με χρωματογραφία αερίου και φασματοσκοπία μάζας (Zeki, Eylem et al. 2020). Χρησιμοποιώντας την GC για την ανάλυση επιφανειακών υδάτων μπορούν να εντοπιστούν οι πολικές ενώσεις (φυτοκτόνα), τα πρόσθετα τροφίμων και τα ίχνη φαρμακευτικών προϊόντων που υπάρχουν σε αυτά (Dolan and Snyder 2013).

2.5.2. Χρωματογραφία υγρού (Liquid Chromatography, LC)

Η χρωματογραφία υγρού είναι η μέθοδος διαχωρισμού που περιλαμβάνει το υγρό ως κινητή φάση και τη στήλη ή την απλή επιφάνεια ως στατική φάση. Αυτή η μέθοδος βοηθά στην εκτέλεση

δομικών και λειτουργικών αναλύσεων. Ο διαχωρισμός και η αναγνώριση βιομορίων, στεροειδών και άλλων βιολογικά ενεργών συστατικών ή μορίων γίνεται συνήθως με αυτήν την τεχνική (Dolan and Snyder 2013).

Η αρχή αυτής της τεχνικής βασίζεται στην συγγένεια των συστατικών ή των μορίων του αναλυόμενου μίγματος προς την κινητή φάση. Τα μόρια με υψηλότερη συγγένεια προς την κινητή φάση ρέουν γρηγορότερα κατά μήκος της κινητής φάσης, ενώ αυτά με χαμηλότερη συγγένεια κινούνται αργά και χρειάζονται περισσότερο χρόνο για να εκλουστούν έξω από τη στήλη. Ένα μίγμα που έχει δύο ή περισσότερα μόρια με διαφορετικές πολικότητες θα κινηθεί με ανόμοια ταχύτητα στη στατική φάση και θα αναλυθεί διαφορετικά (Mariottini 2018). Ένα διάλυμα έκλυσης απλώνεται στο χρωματογραφικό σύστημα για να διαχωριστούν τα μόρια των συστατικών από τη στατική φάση (Mohrig, Hammond et al. 2010).

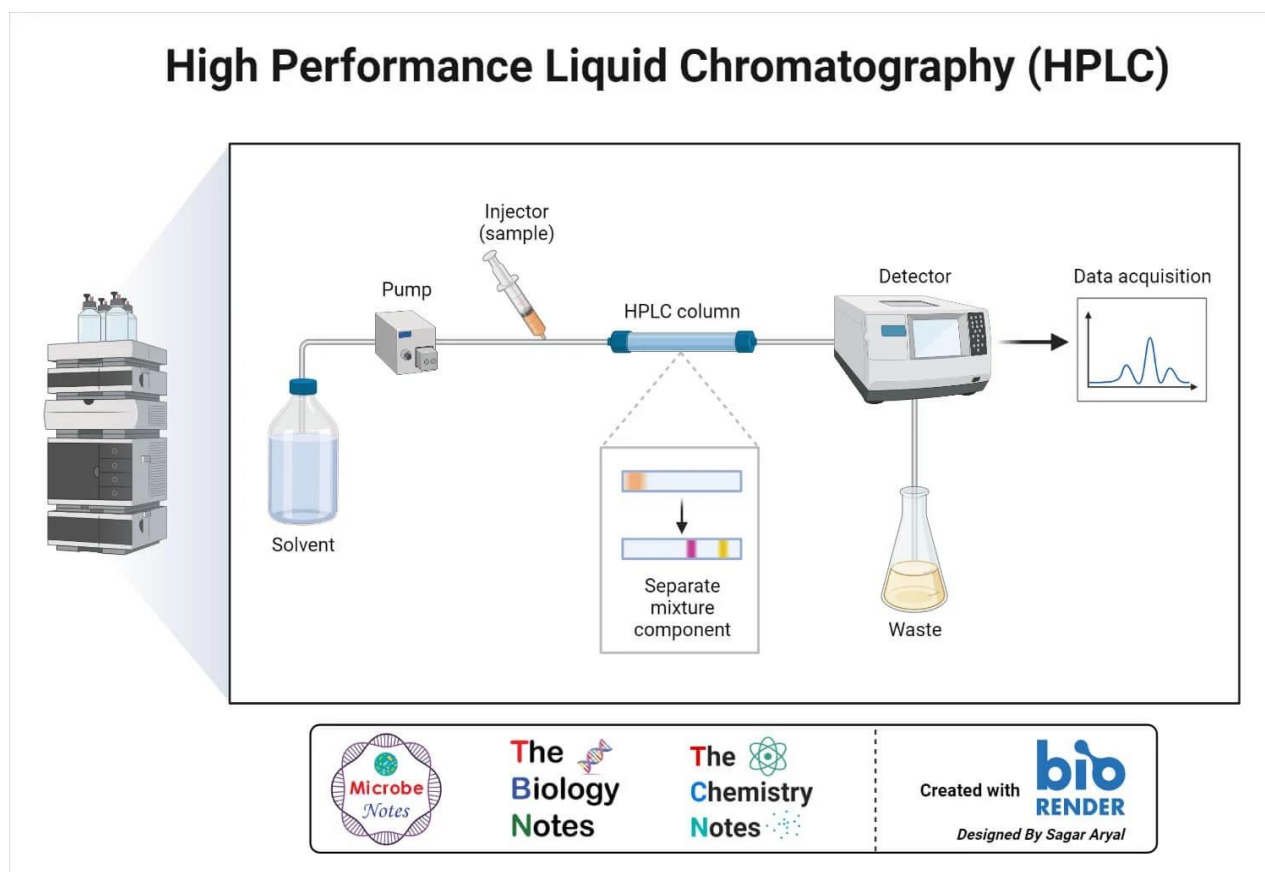
Μία αποτελεσματική μέθοδος στην LC είναι ο διαχωρισμός ενός διαλύματος που φέρει κάποια χρωστική και σχηματίζει διακριτές λωρίδες μετά τον διαχωρισμό των συστατικών του (MacKintosh 2006). Όντας απλή από άποψη λειτουργίας και οικονομικά προσιτή, αυτή η τεχνική έχει προβάδισμα έναντι των άλλων. Με τη χρωματογραφία υγρού μπορούν να διαχωριστούν στερεά μόρια/συστατικά που είναι αδιάλυτα στο νερό (Hamilton and Sewell 1982). Τα ακατέργαστα εκχυλίσματα από φυτά που μπορούν να ποσοτικοποιηθούν εξάγονται με την χρήση χρωματογραφίας υγρού (Aliaño-González, Richard et al. 2020).

2.5.2.1. Χρωματογραφία Υγρού Υψηλής Απόδοσης (High-Performance Liquid Chromatography, HPLC)

Η HPLC είναι μια βελτιωμένη εκδοχή της χρωματογραφίας υγρού και της χρωματογραφίας στήλης που βασίζεται επίσης στην αρχή του διαχωρισμού. Σε αυτή την τεχνική, η ανάλυση ολοκληρώνεται γρήγορα και χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό μικρών συστατικών υπό υψηλή πίεση με μεγαλύτερο ρυθμό ροής διαλύτη, προκειμένου να αυξηθεί η απόδοση διαχωρισμού. Σε αυτή την μέθοδο, η ταχύτητα ροής είναι 0,1-5cm/δευτερόλεπτο υπό 10-400atm πίεση; το μίγμα τροφοδοτείται στη στήλη με την χρήση ενός ηλεκτρονικού συστήματος που χρησιμοποιείται για τον έλεγχο της διάρκειας του διαχωρισμού (Majors 2007).

Τα μείγματα που περιέχουν ανόμοια μόρια ή διαφορετικά συστατικά έχουν και διαφορετικό βαθμό αλληλεπίδρασης με το απορροφητικό που υπάρχει στη στατική φάση. Η διατήρησή τους στη στατική φάση ή η κίνησή τους εντός της κινητής φάσης καθορίζεται από τη συγγένεια κάθε μορίου

που υπάρχει στο μείγμα σε σχέση με την στατική και κινητή φάση. Η διαφορά έγκειται στο γεγονός ότι αντί η κίνηση του διαλύτη (κινητή φάση) να βασίζεται στην βαρυτική δύναμη, εισάγεται στο σύστημα υπό υψηλές πιέσεις έως και 400 atm, για να έχει πιο γρήγορο και αποτελεσματικό αποτέλεσμα σε σύγκριση με αυτό της χρωματογραφίας στήλης (Carr, Stoll et al. 2011).



Εικόνα 5. Χρωματογραφία Υγρού Υψηλής Απόδοσης

Όπως και στην περίπτωση της χρωματογραφίας στήλης, η στήλη της HPLC αποτελείται από γυάλινο σωλήνα που περικλείει κυτταρίνη ή πυρίτιο, ομοιόμορφα κατανεμημένα στο εσωτερικό του. Στη συνέχεια, το δείγμα παρασκευάζεται προσθέτοντας τα συστατικά ή το μείγμα στην κινητή φάση. Μια αντλία υψηλής πίεσης χρησιμοποιείται για να ωθεί το δείγμα με σταθερό ρυθμό στην στήλη από την αρχή της. Ο ανιχνευτής που βρίσκεται στο τέλος της στήλης ανιχνεύει μόρια σε ένα καθορισμένο μήκος κύματος απορρόφησης καθώς η κινητή φάση εξέρχεται από την στήλη. Τα διαχωρισμένα μόρια στη συνέχεια υποβάλλονται σε περαιτέρω ανάλυση (Moldoveanu and David 2013).

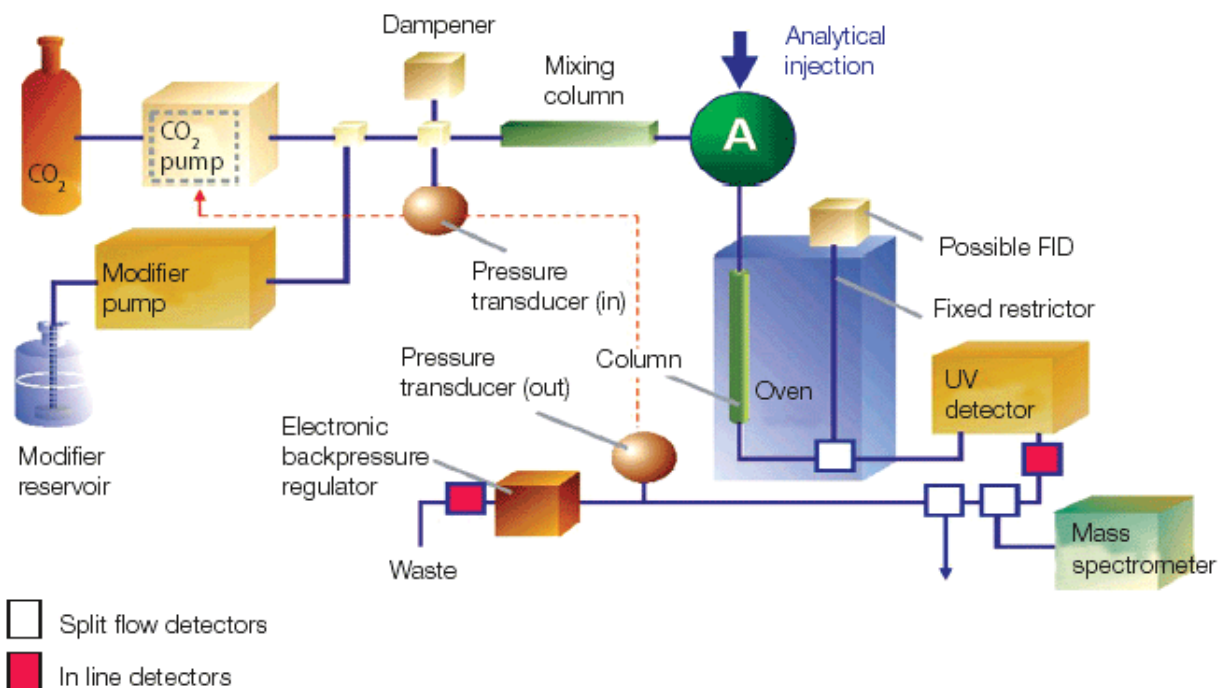
Η HPLC μπορεί να κατηγοριοποιηθεί περαιτέρω σε δύο υποκατηγορίες, (i) την χρωματογραφία κανονικής φάσης (NPC) και (ii) την χρωματογραφία αναστροφής φάσης (RPC). Στην πρώτη τεχνική, ο διαχωρισμός της αναλυόμενης ουσίας βασίζεται στην πολικότητα. Στην NPC η κινητή φάση είναι

μη πολική ενώ η στατική είναι πολική. Ο πολικός αναλύτης μαζί με την κινητή φάση αλληλοεπιδρά με τη στατική φάση μέσα στη στήλη και στη συνέχεια ο πολικός αναλύτης συγκρατείται στη στήλη επιτρέποντας στο απαιτούμενο δείγμα να διαχωριστεί από το αρχικό μείγμα (Chawla and Chaudhary 2019). Στην δεύτερη τεχνική, διαχωρισμός του δείγματος των αναλυόμενων ουσιών γίνεται με βάση τις υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις. Στην RPC η στατική φάση είναι μη πολική, ενώ η κινητή φάση είναι πολική. Το δείγμα που πρόκειται να αναλυθεί είναι επίσης μη πολικής φύσης. Υπάρχουν αποθηκευτικές δυνάμεις που δρουν μεταξύ του πολικού διαλύτη, της μη πολικής στατικής φάσης και ενός μη πολικού αναλύτη δείγματος, εξαιτίας των οποίων λαμβάνουν χώρα υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις (Chawla and Chaudhary 2019). Ο τρόπος με τον οποίο η στατική φάση αλληλοεπιδρά με το δείγμα σχετίζεται με την επιφάνεια του μη πολικού τμήματος του δείγματος, το οποίο είναι προσδεμένο με τον συνδέτη που υπάρχει στην κινητή φάση (Rao and Goyal 2016).

Η HPLC χρησιμοποιείται στην ανάλυση αναδυόμενων ρύπων ή ρύπων που υπάρχουν σε περιβαλλοντικά δείγματα (Mahugo-Santana, Sosa-Ferrera et al. 2011). Βιολογικά μακρομόρια, όπως οι πρωτεΐνες και τα νουκλεϊκά οξέα διαχωρίζονται επίσης με αυτή την τεχνική (Armstrong, Bermingham et al. 2011). Η HPLC είναι ταχύτερη και αποτελεσματικότερη κυρίως λόγω της υψηλής ταχύτητας της κινητής φάσης. Η HPLC έχει χρησιμοποιηθεί για την αξιολόγηση της ικανότητας διαφορετικών αντισωμάτων για την αντιμετώπιση ασθενειών όπως ο Έμπολα (Cazares, Ward et al. 2016). Χρησιμοποιείται επίσης στον εντοπισμό μολυσματικών ουσιών όπως οι συνθετικές βαφές σε ποτά και τρόφιμα (Rejczak and Tuzimski 2017). Οι μονολιθικές στήλες που χρησιμοποιούνται στην HPLC αυξάνουν τη σημασία της απόδοσης διαχωρισμού (Staniak, Wójciak et al. 2020).

2.5.2.2. Χρωματογραφία Υπερκρίσιμου Υγρού (Supercritical Fluid Chromatography, SFC)

Η χρωματογραφία υπερκρίσιμου υγρού (SFC) είναι μια τεχνική διαχωρισμού στην οποία η κινητή φάση που χρησιμοποιείται είναι ένα υπερκρίσιμο ρευστό (διοξείδιο του άνθρακα) (Taylor 2010). Η αρχή λειτουργίας της είναι ανάλογη με την HPLC, ωστόσο, η SFC χρησιμοποιεί χαρακτηριστικά διοξείδιο του άνθρακα ως κινητή φάση. Ως εκ τούτου, ολόκληρη η διαδρομή ροής του χρωματογραφικού συστήματος είναι υπό πίεση. Δεδομένου ότι η υπερκρίσιμη φάση υποδηλώνει μια κατάσταση στην οποία η υγρή και η αέρια φάση συγκλίνουν, ονομάζεται και χρωματογραφία σύγκλισης. Η SFC χρησιμοποιείται για τον καθαρισμό μορίων χαμηλού μοριακού βάρους και τον διαχωρισμό χειρόμορφων ενώσεων (εναντιομερή) (Taylor 2009). Επειδή το υπερκρίσιμο διοξείδιο του άνθρακα (κινητή φάση) είναι εξαιρετικά μη πολικό, προστίθενται στην κινητή φάση κι επιπλέον διαλύτες όπως αλκοόλες, ακετονιτρίλιο, χλωροφόρμιο ή οξικός αιθυλεστέρας για την ρύθμιση της πολικότητας της κινητής φάσης και την αποτελεσματική έκλυση των διαφόρων αναλυτών.



Analytical SFC diagram

Εικόνα 6. Χρωματογραφία Υπερκρίσιμου Υγρού

Η SFC αποτελεί διαδικασία που συνδυάζει τις ιδιότητες χρήσης ενός υγρού για την υγροποίηση μιας μήτρας χρησιμοποιώντας τις έννοιες των χρωματογραφικών ανταλλαγών μεταξύ στατικών και κινητών φάσεων και της κινητικής των αερίων. Η ρύθμιση της ροής στην κινητή φάση, της θερμοκρασίας και της πίεσης για την επίτευξη υπερκρίσιμων συνθηκών με διοξείδιο του άνθρακα και η διαχείριση των επιπλέον διαλυτών παρακολουθείται από εξειδικευμένα συστήματα λογισμικού. Η συλλογή των κλασμάτων είναι πιο απλή σε αυτή την περίπτωση καθώς η κύρια κινητή φάση εξατμίζεται αφήνοντας πίσω την αναλυόμενη ουσία ή το επιθυμητό συστατικό και μια μικρή ποσότητα από τους πρόσθετους πολικούς διαλύτες (Smith 1988).

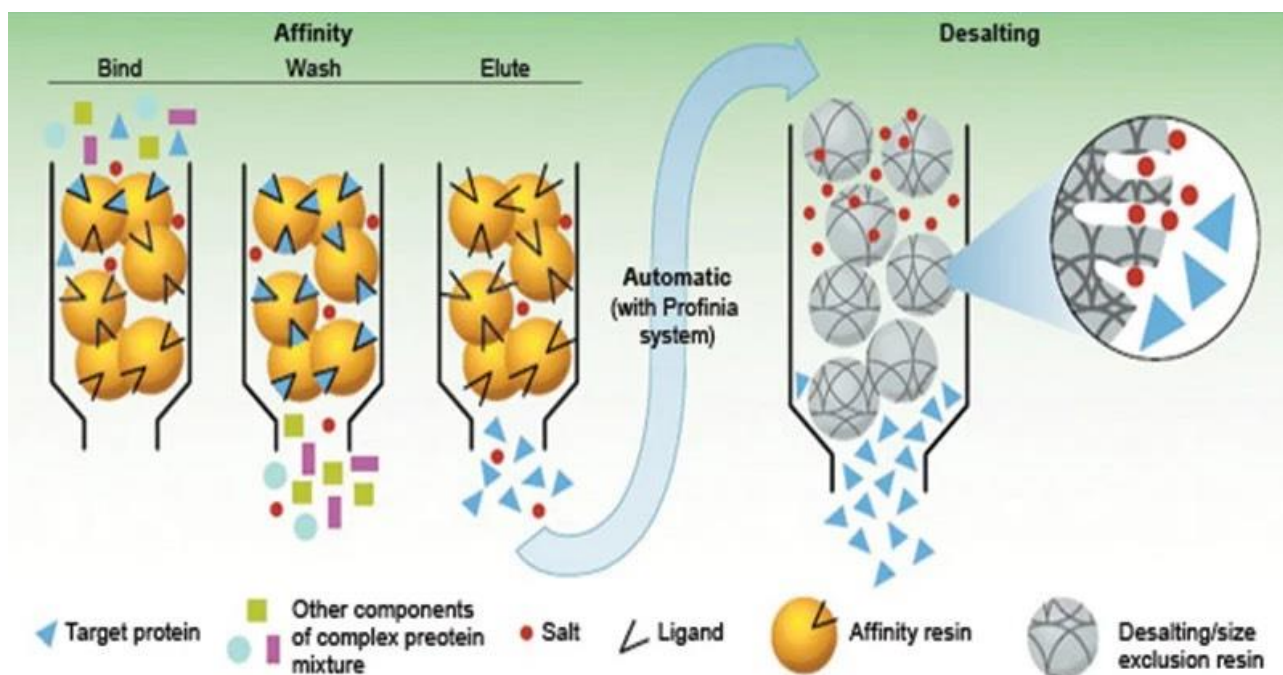
Η βιομηχανική εφαρμογή της SFC περιλαμβάνει τον διαχωρισμό χειρόμορφων και μη μορίων στην φαρμακευτική βιομηχανία (White 2005). Χάρη στην απλή τεχνική προεπεξεργασίας του δείγματος, η SFC αξιοποιείται ακόμη και στην ανάλυση της σύνθεσης των τροφίμων (Liu, Zhang et al. 2020).

2.6. Χρωματογραφικές τεχνικές βάση του μηχανισμού διαχωρισμού

2.6.1. Χρωματογραφία Συγγένειας (Affinity Chromatography, AC)

Η χρωματογραφία συγγένειας είναι μια τεχνική διαχωρισμού με βάση τη συγγένεια όπου τα συστατικά ενός μείγματος διαχωρίζονται με βάση τη συγγένειά τους προς μια ειδική ετικέτα/συνδέτη προσαρτημένο στην στατική φάση του συστήματος. Χρησιμοποιείται στην τεχνολογία βιολογικών διεργασιών για παραγωγές μεγάλης κλίμακας ως το πρώτο βήμα διαχωρισμού ουσιών στα περισσότερα βιολογικά φαρμακευτικά προϊόντα (Łacki and Riske 2020).

Η τεχνική αυτή βασίζεται στην αρχή της συγγένειας του μορίου ενδιαφέροντος προς τον συνδέτη που είναι προσαρτημένος στη στατική φάση. Επομένως, θα πρέπει να επιλεγθεί συνδέτης που έχει την υψηλή συγγένεια προς την επιθυμητή ένωση. Στη στατική φάση, το υπόστρωμα συνδέεται με τη μήτρα έτσι ώστε οι θέσεις αντιδράσεων για τη δέσμευση των συστατικών να είναι εκτεθειμένες (Olson 2020). Ακολουθεί η έγχυση του μίγματος που περιέχει το δείγμα για να διευκολυνθεί η αλληλεπίδρασή του με τον συνδέτη. Το μίγμα του δείγματος στη συνέχεια διέρχεται μέσω της κινητής φάσης όπου τα συστατικά με υπόστρωμα δέσμευσης ή κενές θέσεις παραμένουν συνδεδεμένα στη στατική φάση ενώ τα μη δεσμευμένα συστατικά εκκλύονται μαζί με την κινητή φάση. Μεταβάλλοντας το pH, την ιοντική ισχύ ή ορισμένες άλλες φυσικοχημικές συνθήκες στο χρωματογραφικό σύστημα, τα συστατικά που είναι συνδεδεμένα με το υπόστρωμα στη στατική φάση στη συνέχεια απομακρύνονται και αυτά από την στήλη (Ninfa, Ballou et al. 2009). Η στήλη γεμίζεται πρώτα με το υλικό της στατικής φάσης (αγαρόζη ή κυτταρίνη) που περιέχει κάποιο υπόστρωμα ή συνδέτη που αναμένεται να αλληλοεπιδράσει με την ένωση ενδιαφέροντος (Fanali, Haddad et al. 2017). Η κινητή φάση που περιέχει το μείγμα δείγματος διαφορετικής συγγένειας εισάγεται στη στήλη (με σταθερό ρυθμό ροής). Μόλις ολοκληρωθεί η διαδικασία, το σύμπλοκο προσδέματος-μορίου εκκλύεται από τη στατική φάση μεταβάλλοντας τις συνθήκες (pH, θερμοκρασία) που ευνοούν τον διαχωρισμό του συνδέτη και των συστατικών του μείγματος (Kumar 2016).



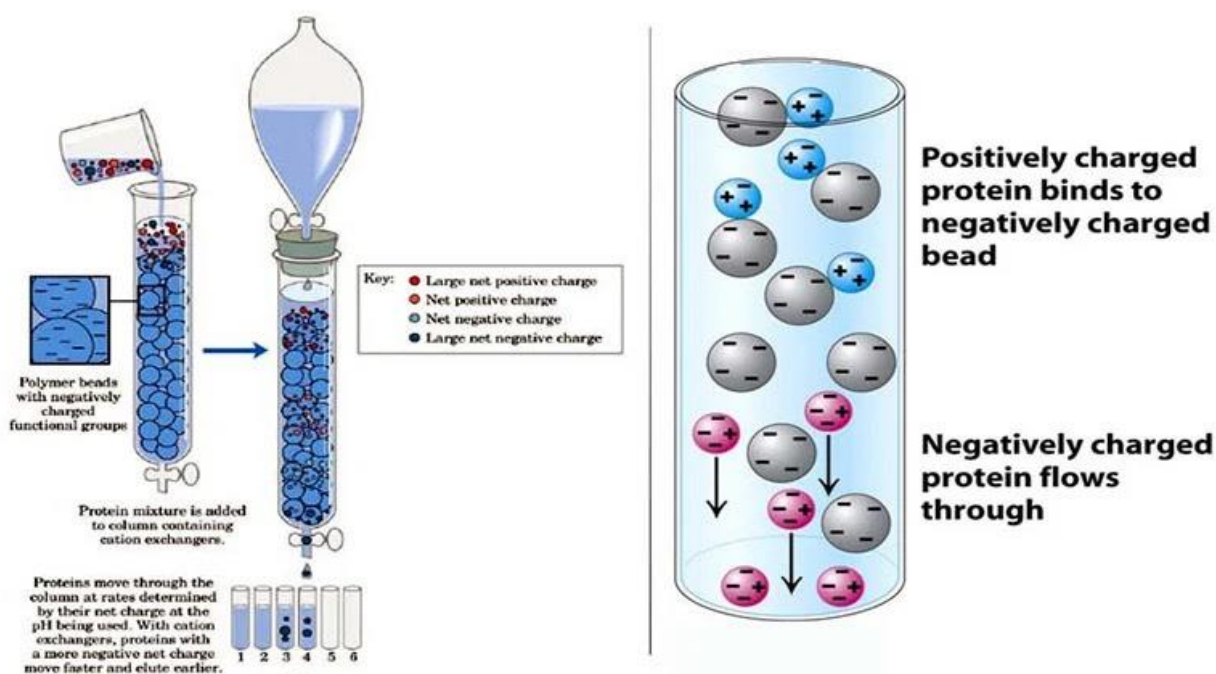
Εικόνα 7. Χρωματογραφία Συγγένειας

Η χρωματογραφία συγγένειας χρησιμοποιείται ως βασική τεχνική διαχωρισμού για την απομόνωση ενζύμων και άλλων πρωτεϊνών σε καθαρή μορφή και βοηθά στην απομάκρυνση των ανεπιθύμητων συστατικών του μείγματος (Gadgil, Oak et al. 2001, Perret and Boschetti 2020). Η αναγνώριση μεταλλάξεων και πολυμορφισμών νουκλεοτιδίων στα νουκλεϊκά οξέα γίνεται επίσης με χρωματογραφία συγγένειας (Sato, Onoguchi et al. 2006). Από το μείγμα πρωτεϊνών της αλβουμίνης ορού, ο καθαρισμός της coli-β-γαλακτοσιδάσης γίνεται χρησιμοποιώντας τη μήτρα συγγένειας (p-αμυνοφαίνυλο-1-θειο-β-D-γαλακτοπυρανοζο-αγαρόζη) για την απομάκρυνση της επιπλέον αλβουμίνης και της α2-μακροσφαιρίνης (Balkani, Shamekhi et al. 2016). Η κατηγορία καταλυτών υαλουρονιδάσης που διασπά το υαλουρονικό οξύ, με καθαρισμό ενός σταδίου λαμβάνεται με χρωματογραφία συγγένειας (Shakouri, Parvan et al. 2020).

2.6.2. Χρωματογραφία Ιοντοανταλλαγής (Ion-Exchange Chromatography, IEC)

Η χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής είναι μια τεχνική για τον διαχωρισμό των συστατικών ενός μείγματος με φορτισμένα μόρια ή ενώσεις. Η στατική φάση στη ρητίνη ανταλλαγής ιόντων είναι αντίθετα φορτισμένη με εκείνη της αναλυόμενης ουσίας ή του επιθυμητού συστατικού προκειμένου να διευκολυνθεί η αλληλεπίδρασή της με τη φορτισμένη ρητίνη της στατικής φάσης (Ninfa, Ballou et al. 2009). Ανάλογα με τον τύπο της ρητίνης που χρησιμοποιείται, η IEC χωρίζεται σε χρωματογραφία ανταλλαγής ανιόντων ή κατιόντων. Η στατική φάση περιέχει ένα δεσμευμένο ιόν μαζί με ένα αντίθετου φορτίου ιόν σε σχέση με το δεσμευμένο. Επομένως, στην περίπτωση που η

στατική φάση περιέχει ένα θετικά φορτισμένο δεσμευμένο ιόν και ένα αρνητικά φορτισμένο αντίθετο ιόν, όπως η ρητίνη, είναι γνωστή ως χρωματογραφία ανταλλαγής ανιόντων. Όταν η κινητή φάση που περιέχει το μίγμα του δείγματος εισάγεται στο σύστημα, η επιθυμητή ένωση – που θα φέρει αρνητικό φορτίο στο παραπάνω παράδειγμα - θα αντικαταστήσει το αρνητικά φορτισμένο αντίθετο ιόν στην στήλη και θα δεσμευτεί στη ρητίνη. Το αντίστροφο ισχύει για τη χρωματογραφία ανταλλαγής κατιόντων (Dąbrowski, Hubicki et al. 2004). Για να εκτοπιστούν τα ελκύόμενα μόρια από τη δεσμευμένη ρητίνη, χρησιμοποιούνται φορτισμένα συστατικά υψηλότερης συγγένειας που έχουν παρόμοιο φορτίο με αυτό των δεσμευμένων μορίων για να τα απελευθερώσουν από την ρητίνη ή την μήτρα. Σηην συνέχεια χρησιμοποιείται ένα ρυθμιστικό διάλυμα για την αποκόλληση του συμπλόκου ρητίνης-κατιόντος ή -ανιόντων που σχηματίζεται κατά την έκλουση (Luqman 2012).



Εικόνα 8. Χρωματογραφία Ιοντοανταλλαγής

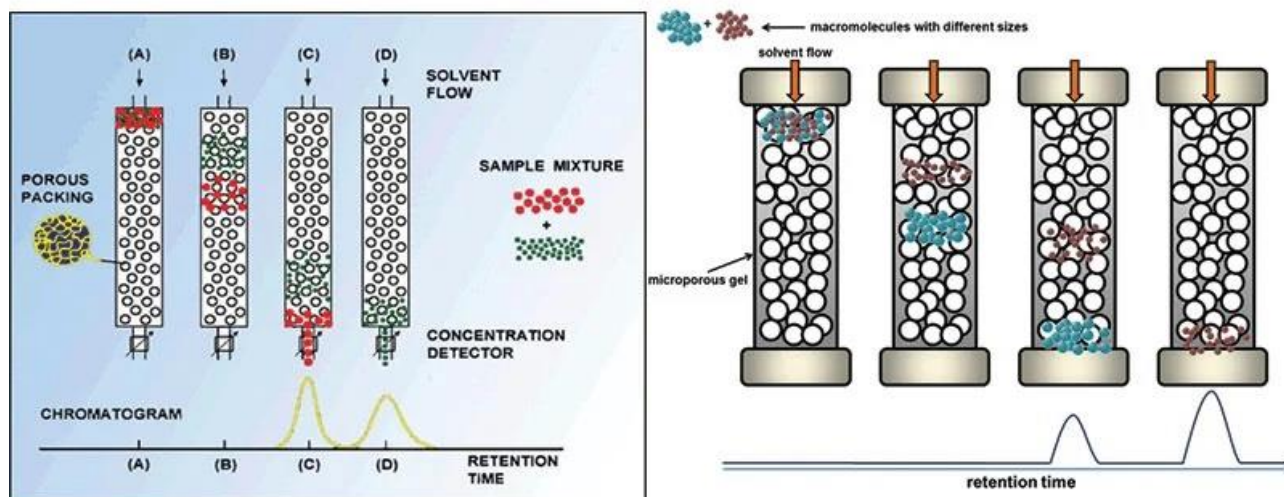
Οι ενώσεις που σχηματίζονται ως αποτέλεσμα της υδρόλυσης των νουκλεϊκών οξέων μπορούν να αναλυθούν με την συγκεκριμένη τεχνική (Lemire, Rodriguez et al. 2016). Τα λανθανοειδή ιόντα που περιλαμβάνονται στον φλοιό της γης, τα μέταλλα και άλλες ανόργανες ενώσεις διαχωρίζονται με την χρήση IEC. Η απομόνωση πρωτεϊνών από τον ορό του αίματος γίνεται επίσης με αυτήν την τεχνική (Raoufinia, Mota et al. 2016). Επιπλέον, ο διαχωρισμός αμινοξέων και νουκλεϊκών οξέων (αρνητικά φορτισμένα) είναι δυνατός με τη χρωματογραφία ανταλλαγής ανιόντων (Huber 2006, Csapó, Albert et al. 2008).

2.6.3. Χρωματογραφία μέσω Πηκτώματος (Gel-Filtration Chromatography, GFC)

Η χρωματογραφία μέσω πηκτώματος είναι γνωστή με διάφορα ονόματα όπως χρωματογραφία εξαιρέσης μεγέθους (size exclusion chromatography, SEC), αποκλεισμού ή διαπερατότητας πηκτώματος και χρωματογραφία μοριακού κόσκινου. Η χρωματογραφία μέσω πηκτώματος είναι μια τεχνική που βοηθά στον διαχωρισμό συστατικών με διαφορετικά μοριακά βάρη και είναι μια από τις πιο ευρέως χρησιμοποιούμενες μεθόδους για τον διαχωρισμό συστατικών από ακατέργαστα εκχυλίσματα (Hong, Koza et al. 2012).

Τα μόρια κατανέμονται μεταξύ κινητής και στατικής φάσης σύμφωνα με το σχετικό τους μέγεθος. Η στατική φάση αποτελείται από μια μήτρα από πορώδεις πολυμερές με συγκεκριμένο μέγεθος πόρων. Τα σφαιρίδια γέλης στη στατική φάση διαχωρίζουν τα συστατικά του δείγματος ανάλογα με το μοριακό τους μέγεθος (Appel, del Barrio et al. 2012). Όταν εισάγονται μέσω της κινητής φάσης, τα μόρια με μέγεθος μικρότερο από το μέγεθος των πόρων διέρχονται μέσω αυτών είτε εν μέρει είτε πλήρως. Τα μόρια όμως με μοριακό μέγεθος μεγαλύτερο από των πόρων παραμένουν στην κινητή φάση και ρέουν πρώτα έξω από τη στήλη. Η κινητή φάση μπορεί να είναι υδατικό ή οργανικό διάλυμα (Kostanski, Keller et al. 2004).

Gel Permeation Chromatography



Εικόνα 9. Χρωματογραφία μέσω Πηκτώματος

Για αυτή τη μέθοδο χρησιμοποιούνται πολυμερικές ρητίνες όπως άγαρ και αγαρόζη, πολυβινυλοπυρρολιδόνη, πολυβινυλαιθυλκαρβιτόλη και πολυακρυλαμίδιο (Hong, Koza et al. 2012).

Η κινητή φάση αναμιγνύεται με το δείγμα και στη συνέχεια εισάγεται στη στήλη από την κορυφή της. Τα μόρια που είναι προσαρτημένα στη στήλη μπορούν στη συνέχεια να εκλουστούν με βαθμιδωτή ή ισοκρατική τεχνική χρησιμοποιώντας διάλυμα έκλουσης είτε με την ίδια είτε με διαφορετική πολικότητα, αντίστοιχα. Ακόμη, τα επιθυμητά μόρια μπορούν να παραληφθούν και με την τροποποίηση των συνθηκών έκλουσης, όπως το pH, τους συμπαράγοντες ή/και τους αναστολείς στο χρωματογραφικό σύστημα (Mori and Barth 1999).

Το κύριο πλεονέκτημα αυτής της διαδικασίας είναι ότι το χρωματογραφικό σύστημα διατηρεί την σταθερότητά του και η ανάλυση έχει υψηλή ειδικότητα για την απομόνωση των επιθυμητών μορίων. Η χρωματογραφία μέσω πηκτώματος είναι κατάλληλη ακόμη και για εύθραυστα μόρια (Hagel 1998). Ο καθαρισμός πρωτεϊνών και πεπτιδίων πραγματοποιείται συνήθως χρησιμοποιώντας αυτή τη μέθοδο λόγω του μοναδικού τρόπου διαχωρισμού της. Η GFC έχει χρησιμοποιηθεί για τον διαχωρισμό των βάσεων, αδενίνη, γουανίνη, θυμίνη, κυτοσίνη και ουρακίλη από το DNA και το RNA (Limonta, Márquez et al. 2008). Η χρωματογραφία εξαίρεσης μεγέθους με βάση την διαβάθμισης ουρίας χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό του ανασυνδυασμένου ανθρώπινου παράγοντα διέγερσης αποικιών κοκκιοκυττάρων (recombinant human granulocyte colony-stimulating factor) σε υψηλή απόδοση από σωματίδια εγκλεισμού. Τόσο η στήλη πηκτώματος με βάση το ακρυλαμίδιο όσο και εκείνη με βάση τη δεξτράνη αξιοποιήθηκαν στον διαχωρισμό της λυσοζύμης από το μάτι της κότας (Bowsheer and Santa 2009). Η τεχνική μπορεί επίσης να βελτιώσει την αποτελεσματικότητα γλυκοσυζευγμένων εμβολίων με την απομάκρυνση των μεταλλικών ιόντων (MacCalman, Phillips-Jones et al. 2019).

3. Εφαρμογές των Χρωματογραφικών Τεχνικών σε Εγκληματολογικές Έρευνες

Υπάρχουν διάφορες χρωματογραφικές τεχνικές που χρησιμοποιούνται για διερεύνηση σε διαφορετικούς τομείς της εγκληματολογίας, όπως η εγκληματολογική τοξικολογία που χρησιμοποιεί TLC, HPLC, GC και χρωματογραφία χαρτιού και η ανάλυση μελάνης που χρησιμοποιεί TLC, HPLC και HPTLC για αναγνώριση και ανίχνευση μελανιών. Επιπλέον, για τον προσδιορισμό εκρηκτικών χρησιμοποιούνται σε μεγάλο βαθμό η GC και η HPLC σε συνδυασμό με τη φασματοσκοπία μάζας (MS).

3.1. Ιατροδικαστική Τοξικολογία

Η ιατροδικαστική τοξικολογία είναι ο κλάδος της εγκληματολογικής επιστήμης που ασχολείται με τον έλεγχο κατάχρησης ναρκωτικών ή τοξικών ουσιών. Αυτός ο κλάδος συνδυάζει επιστήμες όπως η φαρμακολογία, η κλινική χημεία και η βιοτεχνολογία για τη νομική επιθεώρηση των εκάστοτε υποθέσεων. Μια τοξικολογική ανάλυση μπορεί να γίνει σε διάφορους τύπους δειγμάτων που λαμβάνονται από υποκείμενα υπό έρευνα. Τα ούρα, το αίμα, τα μαλλιά, το γαστρικό υγρό, η χολή, το σπυκώτι και οι εγκεφαλικοί ιστοί είναι τα πιο συνηθισμένα και άφθονα δείγματα που χρησιμοποιούνται για έρευνα (Saferstein 2004, Rawtani, Tharmavaram et al. 2019).

3.1.1. Η TLC στην Ιατροδικαστική Τοξικολογία

Η TLC χρησιμοποιείται περισσότερο για ποιοτική ανάλυση του δείγματος παρά για ποσοτική ανάλυση. Οποιαδήποτε χρωμοφόρα ουσία της οποίας η ποσοτική αναπαραγωγικότητα κυμαίνεται μεταξύ 10% και 30% μπορεί να ελεγχθεί με την χρήση μιας πλάκας TLC. Για την ποσοτική ανάλυση των χρωμοφόρων ουσιών χρησιμοποιούνται in situ φασματομετρικές μέθοδοι (Bele and Khale 2011). Επίσης, στην ανάλυση φαρμάκων, η επιβεβαίωση της αναγνώρισης ενός ναρκωτικού ενισχύεται με τον ταυτόχρονο διαχωρισμό μιας σειράς ουσιών-δεικτών έτσι ώστε να βελτιστοποιηθούν οι πειραματικές τιμές του R_f ως προς την τυποποιημένη τιμή R_f που παρέχεται στις αυτοματοποιημένες βιβλιοθήκες. Το προς ανάλυση ναρκωτικό ή φάρμακο μέσω TLC θα πρέπει να πληροί ορισμένα κριτήρια όπως:

- Να έχει ιδιότητες που να μην αλλοιώνονται στο χρωματογραφικό σύστημα.
- Η τιμή του R_f θα πρέπει να εμφανίζει ομοιόμορφη κατανομή στο εύρος R_f .
- Οι τιμές του R_f θα πρέπει να ρυθμίζονται με τέτοιο τρόπο που να επιτυγχάνεται σημαντική διεργαστηριακή αναπαραγωγικότητα.

- Όταν χρησιμοποιούνται πολλαπλά συστήματα διαχωρισμού, τότε θα πρέπει να υπάρχει χαμηλή συσχέτιση μεταξύ των τιμών R_f των συστημάτων που έχουν χρησιμοποιηθεί.

Καθώς ο διαχωρισμός που χρησιμοποιείται για την ανάλυση φαρμάκων στην εγκληματολογία βασίζεται στις τιμές του pH, η επιτροπή συστηματικής τοξικολογικής ανάλυσης της Διεθνούς Ένωσης Εγκληματολογικών Τοξικολόγων (The International Association of Forensic Toxicologist, TIAFT) έχει παράσχει 11 διαφορετικά συστήματα για την ανάλυση φαρμάκων που έχουν διαφορετικά συστήματα διαχωρισμού για όξινα φάρμακα, βασικά φάρμακα, και ουδέτερα φάρμακα

	Κινητή Φάση	Δείγμα	Τύπος θαλάμου	Στατική φάση	Τιμή R_f
1	Χλωροφόρμιο, Ακετόνη	Παρακεταμόλη	Κορεσμένος	Σιλικαγέλη	15
		Κλοναζεπάμη			35
		Σεκοβαρβιτάλη			55
2	Χλωροφόρμιο, Μεθανόλη	Υδροχλωροθειαζίδη	Κορεσμένος	Σιλικαγέλη	11
3	Ακετόνη	Αμιτριπτυλίνη	Κορεσμένος	Σιλικαγέλη	15
		Προκαΐνη			30
		Παπαβερίνη			47
		Κινναριζίνη			65
4	Τολουένιο, Ακετόνη, Αιθανόλη, 25% Αμμωνία	Κωδεΐνη	Κορεσμένος	Σιλικαγέλη	16
		Προμαζίνη			36
		Κλομιπραμίνη			49
		Κοκαΐνη			60
5	Μεθανόλη, Νερό, Συμπυκνωμένο Υδροχλωρικό Οξύ	Υδροξυζίνη	Ακόρεστος	Σιλικαγέλη συνδεδεμένη με οκταδεκυκλοσιλοξάνη	20
		Λιδοκαΐνη			46
		Κωδεΐνη			66
		Μορφίνη			81

Πίνακας 1. Ανίχνευση Φαρμάκων μέσω TLC
Πηγή: (Bhoj, Tharmavaram et al. 2020)

Υπάρχουν ορισμένοι περιορισμοί στην χρήση της TLC λόγω των οποίων είναι η αποτελεί την φθηνότερη τεχνική αλλά όχι την καλύτερη. Αυτοί οι περιορισμοί περιλαμβάνουν:

- Δεν είναι σε θέση να ανιχνεύσει πτητικές ενώσεις.

- Μερικές φορές υπάρχει υπερβολική εναπόθεση κηλίδων.
- Για τον προσδιορισμό μιας συγκεκριμένης ένωσης, η τιμή R_f των σχετικών ενώσεων ενδιαφέροντος θα πρέπει να είναι γνωστή.

3.1.2. Η GC στην Ιατροδικαστική Τοξικολογία

Η χρωματογραφία αερίου χρησιμοποιείται γενικά για την ανίχνευση πτητικών ενώσεων. Διάφορες οργανικές ενώσεις όπως φυτοφάρμακα, φαρμακευτικά προϊόντα και κατάχρηση ναρκωτικών αποτελούν μεγάλο μέρος της ιατροδικαστικής τοξικολογικής έρευνας (Zadora and Zuba 2006). Ένας επιθυμητός αριθμός ενώσεων μπορεί να ανιχνευθεί μέσω αέριας χρωματογραφίας λαμβάνοντας υπόψη το γεγονός ότι εξατμίζονται χωρίς καμία αποσύνθεση και είναι επίσης θερμικά σταθερές.

Η ανίχνευση της αιθανόλης στα σωματικά υγρά είναι μια από τις ευρέως χρησιμοποιούμενες εφαρμογές της χρωματογραφίας αερίου στην ιατροδικαστική τοξικολογία. Κάθε δείγμα θα πρέπει να ελέγχεται χωριστά για πιθανές αλλαγές που μπορεί να συμβούν στο επίπεδο της αιθανόλης στο σώμα μετά τη συλλογή του δείγματος ή λόγω διαδικασιών μετά τον θάνατο (διαφορά περιεκτικότητας σε νερό, βακτηριακές διεργασίες και νεογένεση αιθανόλης). Στην συνέχεια, διορθώνονται τυχόν ατέλειες και γίνεται η ανάλυση. Η ανίχνευση αιθανόλης στα ούρα ακολουθεί την ίδια διαδικασία όπως αυτή για το αίμα.

Η GC χρησιμοποιείται επίσης στην ανάλυση ομοειδών. Όπως και με την αιθανόλη, τα αλκοολούχα ποτά περιέχουν επίσης μεγάλη ποσότητα διαφορετικών πρώτων υλών, παρέχοντας έτσι μια αληθοφάνεια των πληροφοριών που μπορούν να εξαχθούν από ένα δείγμα αίματος σχετικά με την κατανάλωση αλκοόλ, οι οποίες μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε έρευνες που σχετίζονται με ισχυρισμούς κατανάλωσης αλκοόλ μετά την παράβαση. Η μεθανόλη είναι ένα από αυτά, η οποία υπάρχει σε υψηλή συγκέντρωση σε αλκοολούχα ποτά και παράγεται επίσης από τον οργανισμό μας, και λόγω αυτών των παραγόντων, συσσωρεύεται στο σώμα μας και παραμένει εκεί μέχρι να υπάρξει συγκέντρωση αιθανόλης, βοηθώντας έτσι στην αναγνώριση ενός θύματος (Zadora and Zuba 2006).

Επιπλέον, η GC χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό πτητικών, αέριων και διαλυτών ενώσεων όπως η διαφοροποίηση μεταξύ αέρα και αέριων αποσύνθεσης σε περίπτωση ανάλυσης ενδοκαρδιακών αέριων. Επίσης, η επιβεβαίωση της κατάχρησης ναρκωτικών στο αίμα μπορεί να ανιχνευθεί μέσω χρωματογραφίας αερίου.

Μετά από την κατανάλωση κάνναβης, δραστικές ουσίες και μεταβολίτες όπως THC, 11-OH-THC, THC-COOH και άλλα πιθανά κανναβινοειδή (π.χ. κανναβινόλη, κανναβιδιόλη) μπορούν να προσδιοριστούν σε δείγματα αίματος (Πίνακας 2). Η τεχνική της GC χρησιμοποιείται επίσης για έρευνες που σχετίζονται με δείγματα από τρίχες κεφαλής. Η αέρια χρωματογραφία έχει το πλεονέκτημα ότι μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην ανίχνευση πτητικών ενώσεων, στον προσδιορισμό μικροσκοπικών μορίων, καθώς και στην εγκληματολογική τοξικολογική ανάλυση (Dettmer-Wilde and Engewald 2014).

Φάρμακα	Δείγμα	Στήλη	Μέθοδος	Αναφορά
1 Διαζεπάμη, Μεθανόλη	Ούρα	FSC HP-1 (100–310/30°C)	EI, scan	(Maurer 1992)
2 Νορδαζεπάμη	Πλάσμα	FSC HP-1 (70–300/20°C)	EI, scan or SIM	(Drouet-Coassolo, Aubert et al. 1989)
3 THC-COOH	Αίμα	FSC BP-1 (160–280/39°C)	EI, SIM	(Clatworthy, Oon et al. 1990)
4 Οξαζεπάμη	Πλάσμα	FSC, FSC HP-1 (70300/20°C)	EI, scan or SIM	(Drouet-Coassolo, Aubert et al. 1989)
5 Τριαζολάμη	Ούρα	FSC HP-1 (140–285/20°C)	EI, scan	(Zadora and Zuba 2006)

Πίνακας 2. Ανίχνευση φαρμάκων με την χρήση χρωματογραφίας αερίου.

FSC, fused-silica capillary; EI, electron impact ionization; SIM, selected-ion monitoring; TH- COOH, 11-Nor- δ 9 -tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid.

Πηγή: (Maurer 1992).

3.1.3. Η HPLC στην Ιατροδικαστική Τοξικολογία

Τα περισσότερα ναρκωτικά είναι είτε συνθετικά είτε φυτικής προέλευσης. Συνήθως τα εθιστικά ναρκωτικά περιλαμβάνουν οπιούχα, προϊόντα κάνναβης και προϊόντα κοκαΐνης. Τα φάρμακα κάνναβης έχουν τη χαμηλότερη τοξικότητα. Μέχρι σήμερα έχουν απομονωθεί 50 κανναβινοειδή φάρμακα. Τα περισσότερα από αυτά είναι πολικές ενώσεις και θερμικά ασταθή, γεγονός που βοηθά στην ανίχνευσή τους μέσω HPLC. Στην ιατροδικαστική τοξικολογία η διερεύνηση αυτών των ουσιών γίνεται με μέτρηση της τυπικής ποσότητας φαρμάκου (περιεκτικότητα σε τετραϋδροκανναβίνη) που υπάρχει στο παρεχόμενο δείγμα. Τα περισσότερα από

τα παραπάνω ναρκωτικά σχετίζονται με τροχαία ατυχήματα λόγω της υπερδιεγερτικής ή/και της υποτονικής τους δράσης (Daldrup, Michalke et al. 1986).

Από την άλλη πλευρά, η ηρωίνη και τα αλκαλοειδή καταλαμβάνουν μεγάλο μερίδιο των ναρκωτικών που ανιχνεύονται με HPLC, όπου υποβάλλονται προς ανίχνευση κατασχεμένα δείγματα που περιέχουν περισσότερο ή λιγότερο ενεργούς νοθευτές μαζί με ακαθαρσίες.

Παρόλο που μερικές φορές έχουμε σημαντική ποσότητα δείγματος, η ευαισθησία ανίχνευσης που λαμβάνεται εξακολουθεί να είναι χαμηλή. Αυτό συμβαίνει επειδή το ίδιο δείγμα μπορεί να έχει χαμηλή ευαισθησία ανίχνευσης σε βιολογικά δείγματα όπως αίμα, ούρα και αλκοόλ. Έτσι, προκειμένου να αυξηθεί η ευαισθησία, πρέπει να πραγματοποιηθούν ορισμένα ισχυρά βήματα, όπως η ανίχνευση φθορισμού σε συνδυασμό με παραγωγοποίηση και εκχύλιση μαζί με συζυγή διάσπαση (Daldrup, Michalke et al. 1986).

Η κοκαΐνη αφού αρχικά αναλύθηκε με την χρήση των TLC και GC, ανιχνεύεται πλέον σε μεγάλο βαθμό μέσω HPLC για την αναγνώριση των ανενεργών συστατικών και των μεταβολιτών της στα σωματικά υγρά. Αξίζει να σημειωθεί ότι η κοκαΐνη μεταβολίζεται πολύ γρήγορα στο ανθρώπινο σώμα μας και εντοπίζεται στα ούρα, αμετάβλητη σε συγκέντρωση c. 1%. Οι μεταβολίτες (βενζοϋλεκγονίνη) της κοκαΐνης μπορούν επίσης να αναλυθούν στα σωματικά υγρά για την ανίχνευση της κοκαΐνης. Η GC μπορεί να ανιχνεύσει κοκαΐνη μόνο μετά από την μετατροπή σε βενζοϋλεκγονίνη, ενώ η HPLC μπορεί να ανιχνεύσει και τις δύο ενώσεις (Daldrup, Michalke et al. 1986).

Το διαιθυλαμίδιο του λυσεργικού οξέος (LSD), το οποίο είναι ένα από τα πιο τοξικά ναρκωτικά, ανιχνεύεται επίσης μέσω HPLC. Η χαμηλότερη αποτελεσματική δόση είναι της τάξης του 1 mg/kg, η οποία οδηγεί σε δυσκολίες στην ανάλυση. Άλλες τοξικές ενώσεις που μπορούν να αναλυθούν μέσω HPLC είναι η ψιλοκίνη, η φαινκυκλιδίνη και οι φαινυλαλκυλαμίνες (Daldrup, Michalke et al. 1986).

3.2. Ανάλυση Μελάνης

3.2.1. Η TLC στην Ανάλυση Μελάνης

Το 1960 ο Thol πρότεινε ότι ο διαχωρισμός των βαφών και των μελανιών γραφής στα συστατικά τους θα μπορούσε να γίνει χρησιμοποιώντας TLC, κάτι που οδηγεί σε περαιτέρω

ταξινόμηση των μελανίων με βάση τη σύστασή τους (Thol 1960). Οι Nakamura και Shimoda παρήγαγαν αυτοσχέδιες πλάκες micro-TLC από διαφάνειες μικροσκοπίου για τη μελέτη διαφόρων μελανίων στυλό, όπου χρησιμοποίησαν μια κινητή φάση που αποτελείται από η-βουτανόλη/νερό/αιθανόλη σε αναλογία 50 : 15 : 10 και αυτός ο διαλύτης βρέθηκε ότι είναι ο πιο αποτελεσματικός για τον μέγιστο αριθμό μελανίων (Nakamura and Shimoda 1965). Επίσης, η εξέταση μελανίων κορδέλας γραφομηχανής επιτεύχθηκε με την χρήση TLC (Brunelle, Negri et al. 1977).

Μια συστηματική προσέγγιση για την ανίχνευση μελανίων δόθηκε από τους Brunelle και Pro, η οποία περιγράφεται ως «περίπου 1 έως 10 δείγματα μελάνης λαμβάνονται από το προς εξέταση έγγραφο χρησιμοποιώντας μια υποδερμική σύριγγα με αμβλύ άκρο (0,05 mm) και στην συνέχεια το μελάνι διαλύεται σε κατάλληλο διαλύτη». Η κηλίδωση του μελανιού γίνεται σε πλάκα Eastman Kodak TLC (για παράδειγμα, Rochester, NY) (Brunelle and Pro 1972). Αυτή η πλάκα έχει επικαλυφθεί προηγουμένως με σιλικάγελ και η προετοιμασία της πλάκας TLC γίνεται χρησιμοποιώντας ένα σύστημα τριών διαλυτών που αποτελείται από οξικό αιθυλεστέρα, αιθανόλη και απεσταγμένο νερό σε αναλογία 70 : 35 : 30 για μισή ώρα. Η πλάκα TLC αφήνεται περαιτέρω να στεγνώσει και στη συνέχεια παρατηρείται υπό υπεριώδες φως ή κανονικό φως. Στη συνέχεια, η προς εξέταση μελάνη συγκρίνεται με μελάνια που έχουν ανάλογα χρωματογραφικά μοτίβα. Αυτό γίνεται με διεξαγωγή TLC σε γυάλινη πλάκα με σιλικάγελ (της Merck) μαζί με δύο κινητές φάσεις: η-βουτανόλη/νερό/αιθανόλη και οξικό αιθύλιο/νερό/αιθανόλη σε αναλογία 50 : 30 : 10 και 70 : 30 : 35, αντίστοιχα.

3.2.2. Η HPTLC στην Ανάλυση Μελάνης

Στις δεκαετίες του 1970 και του 1980 η χρωματογραφία λεπτής στιβάδας υψηλής απόδοσης (HPTLC) άρχισε να χρησιμοποιείται για εγκληματολογικές έρευνες. Οι επιστήμονες αναγνώρισαν ότι οι πλάκες HPTLC ήταν διαφορετικές από τις παραδοσιακές πλάκες TLC καθώς διαθέτουν μικρότερο μέγεθος σωματιδίων στατικής φάσης σε σύγκριση με την κανονική πλάκα TLC, και αυτό βοηθά στην παροχή ενός ομοιογενούς στρώματος για διαχωρισμό των μελανίων και επίσης οδηγεί σε αύξηση των ενεργών θέσεων για TLC πλάκες, το οποίο με τη σειρά του βοηθά στην υψηλότερη ανάλυση παρόμοιων ενώσεων (Tebbett 1991).

Η HPTLC χρησιμοποιείται για διαχωρισμό τόσο μελανίων όσο και βαφών. Ο Tappolet πρότεινε διαφορετικά συστήματα διαλυτών και χρώμα μελανίων και για κάθε ένα χρησιμοποίησε

ένα γραμμικό σύστημα ανάπτυξης μαζί με πλάκες Merck 60 HPTLC (Tappolet 1983). Ακολουθούν μερικά παραδείγματα:

- Στυλό χρώματος μπλε ή κόκκινο εξετάστηκε χρησιμοποιώντας ένα σύστημα διαλυτών με μεθανόλη/η-προπανόλη/1-πεντανόλη/απεσταγμένο νερό σε αναλογία 2 : 10 : 20 : 4.
- Μαρκαστοράκι μαύρου χρώματος εξετάστηκε με ένα σύστημα διαλυτών αποτελούμενο από ισοβουτανόλη/ισοπροπανόλη/απεσταγμένο νερό (23:10:7).
- Στυλό με πράσινο χρώμα μελανιού μελετήθηκε χρησιμοποιώντας ένα σύστημα διαλυτών συμπτυκνωμένου μυρμηκικού οξέος/βουτανόλης κορεσμένο σε νερό (3 : 97).

Ο Tappolet μετά από εξέταση παρατήρησε ότι η HPTLC απαιτούσε μόνο 600 ng μελανιού για τον σχηματισμό κηλίδων και την πραγματοποίηση μετρήσεων, ενώ η ανάλυση TLC απαιτούσε μέγεθος μικρογραμμαρίων (Tappolet 1984).

Σε περιπτώσεις όπου ο προσδιορισμός της «ταυτότητας» του μελανιού είναι σημαντικός, τότε προηγείται μια διαδικασία, όπου τα εξεταζόμενα μελάνια τοποθετούνται δίπλα-δίπλα σε μια απλούστερη πλάκα TLC χαμηλής ανάλυσης, η οποία βοηθά στον διαχωρισμό των μελανιών στα βασικά τους συστατικά. Τα αποτελέσματα συγκρίνονται με μια 'βιβλιοθήκη' που περιέχει τα περισσότερα μελάνια και χρωματογραφήματα λεπτής στιβάδας τους. Επίσης, η βιβλιοθήκη μελανιών είναι οργανωμένη σε διάφορες οικογένειες μελανιών με τέτοιο τρόπο ώστε κάθε οικογένεια να έχει το ίδιο χρώμα μελανιού ή τύπο στυλό (πένα, στυλό τύπου μαρκαστοράκι, κανονικό στυλό) με παρόμοια συστατικά βαφής. Στην συνέχεια, τα προς διερεύνηση μελάνια που ταιριάζουν με κάποια από τις οικογένειες της βιβλιοθήκης αναλύονται με την χρήση πλακών Merck HPTLC έως ότου ληφθεί ένα ταίριασμα. Η αναφορά σε μια βιβλιοθήκη μελανιών όχι μόνο βοηθά στην αναγνώριση του μελανιού (με αυτά που είναι διαθέσιμα στη βιβλιοθήκη), αλλά βοηθά επίσης στην παροχή γνώσεων σχετικά με τις ημερομηνίες κατασκευής των μελανιών. Αυτό παρέχει στοιχεία για να εξεταστεί εάν το υπό εξέταση έγγραφο μελανιού ήταν διαθέσιμο ή προσβάσιμο εκείνη τη στιγμή, όταν το εξεταζόμενο έγγραφο συντασσόταν (Tebbett 1991).

3.2.3. Η HPLC στην Ανάλυση Μελάνης

Παρόλο που η TLC έχει χρησιμοποιηθεί για ανάλυση μελάνης για περισσότερα από 30 χρόνια, η ευαισθησία και ισχύ ανάλυσής είναι αρκετά μικρότερη σε σύγκριση με την HPLC. Η HPLC μαζί με αυξημένη ευαισθησία ανίχνευσης παρέχει επίσης αποτελεσματικότερο διαχωρισμό μεταξύ των βαφών σε σύγκριση με την TLC (Tebbett 1991).

Η HPLC χρησιμοποιείται κυρίως για την ανάλυση μελάνης από τα τυπικά στυλό. Τα αρχικά πειράματα έγιναν από τους Colwell και Karger, όπου στόχους τους ήταν να διαχωρίσουν μελάνια από τυπικά στυλό μέσω στήλης πυριτίου κανονικής φάσης με υγρό έκλουσης μεθανόλης και φορμανίδης σε αναλογία 98 : 2, τα οποία μπορούσαν έπειτα να ανιχνευθούν τόσο στα 254 nm όσο και στα 580 nm (Colwell Jr and Karger 1977). Αυτή η μελέτη έγινε για την διερεύνηση των σωστών αναλογιών μεταξύ των κορυφών στο φάσμα εκπομπής/απορρόφησης και στα δύο μήκη κύματος. Με την μέθοδο αυτή επιτεύχθηκε η διαφοροποίηση 25 διαφορετικών τύπων μελανιών στυλό. Επιπλέον, η HPLC αναάστροφης φάσης προτάθηκε από τον Lyter για την ανάλυση μελανιών, οποίος χρησιμοποίησε ως κινητή φάση ακετονιτρίλιο και νερό σε αναλογία 80:20, σε στήλη C-18 μαζί με 0,02% οξικό οξύ και 0,005M σουλφονικό οξύ επτανίου (Lyter 1982). Τα οξέα προστίθενται έτσι ώστε να ελαχιστοποιείται ο ιονισμός των φαρμάκων. Επιπλέον, διάφορες βαφές μπορούν να διαφοροποιηθούν χρησιμοποιώντας αυτή τη μέθοδο. Η τεχνική βρίσκει επίσης εφαρμογή σε αναλύσεις πλαστών νομισμάτων (Keto 1984). Η ανάλυση για τα μελάνια των μη συμβατικών στυλό (ballpoint στυλό) απαιτεί μεγαλύτερη προεργασία. Σε αντίθεση με τα μελάνια των συμβατικών στυλό, τα μελάνια των υπόλοιπων στυλό αποτελούνται από δύο μέρη, δηλαδή το χρωμοφόρο και το άχρωμο. Ο Lyter πρότεινε ότι η εξέταση των μελανιών μη συμβατικών στυλό (non-ballpoint στυλό) πρέπει να διεξάγεται αποκλειστικά στο χρωμοφόρο τμήμα βαφής του μελανιού, καθώς ο διαλύτης είναι πιο πιθανό να εξατμιστεί αφού στεγνώσει το μελάνι στο χαρτί (Lyter 1982).

Μερικά από τα κύρια προβλήματα που παρατηρούνται κατά την ανάλυση μελάνης μέσω HPLC είναι η χαμηλή ευαισθησία, η ανεπαρκής χρήση της γραμμής μελάνης μήκους έως 1 cm και το γεγονός ότι κατά την παρακολούθηση ενός μόνο μήκους κύματος, είναι υποχρεωτική η αναπαραγωγή αναλύσεων σε διαφορετικά μήκη κύματος. Επομένως, για την κατάλληλη ανίχνευση κάθε συστατικού βαφής ξεχωριστά, απαιτείται η χρήση ανιχνευτή πολλαπλών μηκών κύματος (Tebbett 1991).

3.2.4. Η GC στην Ανάλυση Μελάνης

Η ανάλυση του μελανιού σε χαρτί μπορεί να χρησιμοποιηθεί για σκοπούς σύγκρισης και χρονολόγησης καταχωρήσεων μελάνης σε εγκληματολογική ανάλυση αμφισβητούμενων εγγράφων. Τα μελάνια ορίζονται συνήθως χρησιμοποιώντας ένα προφίλ χρωστικών που έχει ήδη δηλωθεί χρησιμοποιώντας μικροφασματοφωτομετρία. Προκειμένου να γίνει διάκριση μεταξύ των μελανιών που δεν μπορούν να διαχωριστούν μεταξύ τους βάσει των χρωστικών τους, οι ιατροδικαστές χρησιμοποιούν τη χρήση προσδετών, διαλυτών και άλλων πρόσθετων. Τα χρωματογραφήματα που λαμβάνονται από θερμική εκρόφηση μελανιών επιτρέπουν σε έναν ιατροδικαστή να αξιολογήσει τα

συνδεδετικά πολυμερή, τους διαλύτες και τα πρόσθετα που χρησιμοποιούνται (Bügler, Buchner et al. 2005).

Υπάρχουν δύο μέθοδοι που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον χαρακτηρισμό της ηλικίας ενός εγγράφου από φυσικά και χημικά στοιχεία. Η πρώτη μέθοδος χρησιμοποιεί τα συνθετικά ή στατικά χαρακτηριστικά ενός εγγράφου και το πώς αυτά τα χαρακτηριστικά σχετίζονται με την πραγματική ημερομηνία του εγγράφου (Zeichner, Eldar et al. 2003). Η δεύτερη μέθοδος είναι μια δυναμική προσέγγιση που βασίζεται στη δοκιμή ορισμένων στοιχείων ενός συγκεκριμένου εγγράφου που ποικίλλει ανάλογα με το χρόνο. Η 2-PE (φαινοξυαιθανόλη) είναι μια πτητική οργανική ένωση που αποτελεί κύριο συστατικό των στυλό με μελάνια μπλε και μαύρου χρώματος. Ως διαλύτης έχει το χαρακτηριστικό να εξατμίζει το μελάνι με την πάροδο του χρόνου. Οι συμβατικές τεχνικές για την ανίχνευση της φαινοξυαιθανόλης (PE) περιλαμβάνουν δειγματοληψία με τη χρήση ενός νυστεριού ή ενός διατρητικού χαρτιού, η οποία χρησιμοποιείται για την αφαίρεση συγκεκριμένων τμημάτων του προς εξέταση εγγράφου, γεγονός όμως που καταστρέφει μέρος του. Μετά από αυτό, η μελάνη εκχυλίζεται με τη χρήση ενός διαλύτη και χαρακτηρίζεται περαιτέρω μέσω χρωματογραφικής και φασματικής ανάλυσης. Οι Brazeau και Gaudreau χρησιμοποίησαν στα πειράματά τους την τεχνική της μικροεξαγωγής στερεάς φάσης (Solid-Phase Microextraction) σε συνδυασμό με την χρωματογραφία αερίου. Επίσης βελτιστοποίησαν την μέθοδο δειγματοληψίας με την δημιουργία μιας «κυψέλης δειγματοληψίας» που επιτρέπει στον διαλύτη να προσροφηθεί απευθείας από στις ίνες SPME, αποτρέποντας έτσι την ανάγκη για καταστροφή του εγγράφου. Οι ουσίες που είναι πτητικές εκροφούνται από την ίνα SPME σε έναν χρωματογράφο αερίων συζευγμένο με έναν ανιχνευτή μάζας (GC-MS) (Wilson, LaPorte et al. 2004).

3.3. Ανάλυση Εκρηκτικών

3.3.1. Η HPLC στην Ανάλυση Εκρηκτικών

Η ανάλυση διαφορετικών εκρηκτικών είναι τεράστιας σημασίας στα εγκληματολογικά εργαστήρια. Η ανάλυση εκρηκτικών γίνεται με δύο τρόπους μέσω HPLC: ο ένας περιλαμβάνει την αναγνώριση των υλικών που δεν έχουν εκραγεί και βοηθά στην παροχή πληροφοριών σχετικά με την προέλευσή τους, ενώ ο δεύτερος τρόπος περιλαμβάνει τη συλλογή και τη διερεύνηση των υπολειμμάτων μετά την ανάφλεξή τους. Η πρώτη είναι αρκετά απλή διαδικασία λόγω της παρουσίας μεγάλης ποσότητας εκρηκτικών για τη διερεύνηση της απαιτούμενης ταυτοποίησης. Αντιθέτως, η δεύτερη είναι περισσότερο απαιτητική λόγω του γεγονότος ότι τα εκρηκτικά (αυθεντικό υλικό) παραμένουν μόνο σε μικρές ποσότητες στο σημείο της έκρηξης. Ένας άλλος περιορισμός που πρέπει

να ξεπεράσουν οι ερευνητές είναι ότι τα δείγματα των εκρηκτικών είναι συχνά αλλοιωμένα με ξένα υλικά. Αυτά τα στοιχεία αναγκάζουν τους ερευνητές να χρησιμοποιήσουν εξαιρετικά συγκεκριμένες και ευαίσθητες αναλυτικές τεχνικές (Daldrup, Michalke et al. 1986).

Η ανίχνευση εκρηκτικών όπως η νιτρογλυκερίνη, το 2,4-δινιτροτουλένιο και η δινιτρική διαιθυλενογλυκόλη (DEGDN) έγινε με τη χρήση ανιχνευτών UV σε μήκος κύματος 254 nm σε διάφορες περιπτώσεις που αφορούσαν διαρρήξεις λόγω ανατινάξεων (Daldrup, Michalke et al. 1986). Επίσης, το Dynamex B και το τρινιτροτολουόλιο (TNT) μπορούν να εξεταστούν χρησιμοποιώντας HPLC. Το 1974, οι Doali και Juhasz πρότειναν ότι η υπεριώδης φωτομέτρηση παρόλο που ήταν η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη τεχνική για τον χαρακτηρισμό των εκρηκτικών, αποτύγχανε στην ανάλυση ενός σύνθετου δείγματος που αποτελούνταν από διαφορετικά συστατικά που απορροφούν την υπεριώδη ακτινοβολία (σταθεροποιητές, παράγοντες ζελατινοποίησης) (Doali and Juhasz 1974). Η ιδιαιτερότητα του δείγματος αποτελεί επίσης περιορισμό καθώς η ακριβής ποσοτικοποίηση που απαιτείται είναι σε μικρογραμμάρια για την ανάλυση των συστατικών. Οι Lafleur και Morriveau (1980) ανέπτυξαν μια νέα ευαίσθητη τεχνική που ανέλυε το δείγμα σε επίπεδο νανογραμμαρίων χωρίς την παρεμβολή πρόσθετων συστατικών όπως σταθεροποιητές, ζελατινοποιητές και πλαστικοποιητές (Lafleur and Morriveau 1980). Στήλες που αποτελούνται από πυρίτιο και δεσμευμένες αμινομάδες (NH₂) μπορούν να διαχωρίσουν διάφορα συστατικά ενός εκρηκτικού όπως νιτρογλυκερίνη, οκταϋδρο-1,3,5,7-τετρανιτρο-1,3,5,7-τετραζοκίνη (HMX), δινιτρική αιθυλενογλυκόλη (EGDN) και εξϋδρο-1,3,5-τρινιτρο-s-τριαζίνη (RDX). Η HPLC σε συνδυασμό με την MS είναι η προσέγγιση που χρησιμοποιείται πλέον για την ανάλυση εκρηκτικών (Parker, Tondeur et al. 1982). Μερικά παραδείγματα εκρηκτικών που έχουν αναλυθεί με την χρήση HPLC παρουσιάζονται στον πίνακα 3.

Δείγμα	Στήλη HPLC	Κινητή φάση	Χρόνος Κατακράτησης
1 Νιτροβενζόλιο	Lichrosorb Si60	0.1% IPA/εξάνιο	6
2 2,6-DNT	Si60	0.1% IPA/εξάνιο	8,6
3 TNT	Si60	0.5% IPA/εξάνιο	6,7
4 Tetryl	Si60	6% IPA/εξάνιο	11,4
5 2,6-TNT	Lichrosorb Si60	6% IPA/εξάνιο	3,5

Πίνακας 3. Ανίχνευση εκρηκτικών με την χρήση HPLC.

2,6-DNT: 2,6-δινιτροτολουόλιο, TNT: τρινιτροτολουόλιο, Tetryl: 2,4,6-τρινιτροφαινυλομεθυλονιτραμίνη, 2,6-TNT: 2,6- τρινιτροτολουόλιο, IPA: ισοπροπανόλη.

Πηγή: (Krull, Davis et al. 1981)

3.3.2. Η GC στην Ανάλυση Εκρηκτικών

Η χρωματογραφία αερίου χρησιμοποιείται για την ανίχνευση εκρηκτικών σε συνδυασμό με την φασματοσκοπία μάζας. Η GC χρησιμοποιεί αδρανές αέριο όπως το ήλιο για την ανάλυση ιχνών δείγματος εκρηκτικού, το οποίο βοηθά στη διατήρηση της θερμοκρασίας και διευκολύνει την ανίχνευση των στοιχείων του δείγματος. Η στήλη στην αέρια χρωματογραφία είναι το πιο σημαντικό συστατικό. Στην ανίχνευση εκρηκτικών χρησιμοποιούνται δύο τύποι στηλών: η μία είναι «πακεταρισμένη» (με το υλικό της στατικής φάσης) και η άλλη τριχοειδής. Αν και η «πακεταρισμένη» στήλη έχει μεγάλη χωρητικότητα δείγματος, είναι λιγότερο αποδοτική σε σύγκριση με την τριχοειδή στήλη λόγω του μικρού της μήκους. Εάν η διάμετρος του σωματιδίου μιας «πακεταρισμένης» στήλης GC μειωθεί, τότε η απόδοσή της αυξάνεται. Επιπλέον, η πίεση που απαιτείται για τη ροή του δείγματος μέσω της στήλης δεν πρέπει να είναι μεγαλύτερη από 50 psi. Από την άλλη πλευρά, η τριχοειδής στήλη γνωστή και ως ανοιχτή σωληνοειδής στήλη χρησιμοποιείται ευρέως και διαθέτει μεγαλύτερο μήκος. Η τριχοειδής στήλη κατασκευάζεται από συνδυασμό πυριτίου και πολυαμιδίου που είναι υπεύθυνο για την μηχανική αντοχή και ευελιξία της στήλης. Η κινητή φάση παίζει επίσης κρίσιμο ρόλο στην αέρια χρωματογραφία. Το αέριο που χρησιμοποιείται θα πρέπει να είναι αδρανές.

Η δοκιμή των εκρηκτικών προσφέρει το αρχικό υλικό για την ανάλυση και τα αποτελέσματα που λαμβάνονται μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την αξιολόγηση αντίστοιχων απειλών που δημιουργούνται από αυτό το είδος εκρηκτικών. Άλλες χρήσεις περιλαμβάνουν την ανίχνευση εκρηκτικών ιχνών στα μαλλιά και άλλα υποστρώματα (Egan, Mount et al. 2004). Τα συστατικά που χρησιμοποιούνται για την κατασκευή μιας εκρηκτικής ύλης είναι συχνά δυνητικοί περιβαλλοντικοί ρύποι. Η παρουσία αυτών των ρύπων στο περιβάλλον επιβλέπεται γύρω από τοποθεσίες αποκατάστασης και επίσης σε περιοχές που είναι επιρρεπείς σε εκρήξεις. Παραδείγματα αυτών των περιοχών περιλαμβάνουν περιοχές ελέγχου χιονοστιβάδων ή περιοχές όπου λαμβάνουν χώρα εξορύξεις και λατομική δραστηριότητα (Stambouli, El Bouri et al. 2004).

4. Συμπεράσματα και Μελλοντικές Προοπτικές

4.1. Συμπεράσματα

Η ιατροδικαστική επιστήμη στέκεται ως πυλώνας της δικαιοσύνης, επιδιώκοντας να αποκαλύψει τα μυστήρια που κρύβονται στις σκηνές του εγκλήματος και να παράσχει συγκεκριμένα στοιχεία για νομικές διαδικασίες. Ανάμεσα στις μυριάδες αναλυτικές τεχνικές που έχουν στη διάθεση των ιατροδικαστών, η χρωματογραφία αναδεικνύεται ως απαραίτητο εργαλείο, που προσφέρει υψηλή ευαισθησία και επιλεκτικότητα στον διαχωρισμό και την αναγνώριση πολύπλοκων μιγμάτων.

4.1.1. Ανάλυση Φαρμάκων και Τοξικολογία

Η χρωματογραφία, τόσο σε αέρια (GC) όσο και σε υγρή μορφή (LC), έχει φέρει επανάσταση στην ανάλυση φαρμάκων στις ιατροδικαστικές έρευνες. Η ικανότητά του να αναγνωρίζει και να ποσοτικοποιεί τα ναρκωτικά σε βιολογικά δείγματα, όπως το αίμα και τα ούρα, έχει αποδειχθεί κρίσιμη σε περιπτώσεις κατάχρησης ναρκωτικών, διακίνησης και υπερβολικής δόσης. Στον τομέα της τοξικολογίας και της μεταθανάτιας ανάλυσης, η υψηλή ευαισθησία της χρωματογραφίας επιτρέπει την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό τοξικών ενώσεων και μεταβολιτών, βοηθώντας τους ιατροδικαστές να προσδιορίσουν την αιτία θανάτου.

4.1.2. Ίχνη απόδειξης και ανάλυση υπολειμμάτων πυροβόλου όπλου

Η σημασία της χρωματογραφίας επεκτείνεται στο μικροσκοπικό πεδίο, όπου διαδραματίζει ζωτικό ρόλο στην ανάλυση των ιχνοστοιχείων. Από ίνες μέχρι χρώματα και υπολείμματα πυροβολισμών, η χρωματογραφία διευκολύνει την αναγνώριση και σύγκριση υλικών που βρίσκονται στους τόπους του εγκλήματος. Συγκεκριμένα, η αέρια χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας (GC-MS) χρησιμοποιείται στη λεπτομερή ανάλυση των υπολειμμάτων πυροβολισμών, ρίχνοντας φως στο εάν ένα άτομο έχει εκτοξεύσει ένα πυροβόλο όπλο και συνεισφέροντας πολύτιμες γνώσεις στις έρευνες πυροβολισμών.

4.1.3. Ανάλυση DNA και Ιατροδικαστική Χημεία

Αν και δεν εμπλέκεται άμεσα στον προσδιορισμό της αλληλουχίας του DNA, η χρωματογραφία είναι αναπόσπαστο μέρος του καθαρισμού και της ανάλυσης δειγμάτων DNA. Διασφαλίζοντας την ποιότητα και την καθαρότητα των εκχυλισμάτων DNA, οι τεχνικές χρωματογραφίας συμβάλλουν στην ακρίβεια του προφίλ DNA σε εγκληματολογικές εφαρμογές.

Επιπλέον, η χρωματογραφία χρησιμεύει ως κρίκος στην εγκληματολογική χημεία, βοηθώντας στον διαχωρισμό και την ανάλυση πολύπλοκων μιγμάτων που συναντώνται σε διάφορα εγκληματολογικά δείγματα. Αυτή η ικανότητα είναι απαραίτητη για τον εντοπισμό και τον χαρακτηρισμό ουσιών που συνδέονται με εγκληματικές δραστηριότητες.

4.1.4. Αποδοχή στην αίθουσα του δικαστηρίου και μετέπειτα

Η αποδοχή από το δικαστήριο της χρωματογραφίας στην εγκληματολογική επιστήμη είναι μια κρίσιμη πτυχή που υπογραμμίζει την αξιοπιστία και την αξιοπιστία αυτής της αναλυτικής τεχνικής στις νομικές διαδικασίες. Η ευρωστία, η ακρίβεια και η επιστημονική εγκυρότητα των μεθόδων χρωματογραφίας έχουν συμβάλει στην ευρεία αποδοχή τους στις δικαστικές αίθουσες, όπου το παραδεκτό των αποδεικτικών στοιχείων υπόκειται σε αυστηρό έλεγχο.

Οι τεχνικές χρωματογραφίας, όταν διεξάγονται με καθιερωμένα και επικυρωμένα πρωτόκολλα, επιδεικνύουν υψηλό βαθμό αξιοπιστίας και αναπαραγωγιμότητα. Η ικανότητα να παράγονται με συνέπεια ακριβή και ακριβή αποτελέσματα είναι ζωτικής σημασίας για την αποδοχή των χρωματογραφικών αποδεικτικών στοιχείων στο δικαστήριο.

Τα εγκληματολογικά εργαστήρια συχνά τηρούν αυστηρά πρότυπα και διαδικασίες διαπίστευσης. Οι μέθοδοι χρωματογραφίας που χρησιμοποιούνται σε αυτά τα εργαστήρια έχουν επικυρωθεί σύμφωνα με αναγνωρισμένα πρότυπα, διασφαλίζοντας ότι οι τεχνικές πληρούν καθιερωμένα κριτήρια ακρίβειας και ακρίβειας. Η διαπίστευση ενισχύει την αξιοπιστία του εργαστηρίου και κατ' επέκταση τις χρησιμοποιούμενες χρωματογραφικές μεθόδους.

Οι ιατροδικαστικοί αναλυτές με πείρα στη χρωματογραφία διαδραματίζουν κεντρικό ρόλο στην παρουσίαση αποδεικτικών στοιχείων στο δικαστήριο. Η μαρτυρία τους, με βάση την εκπαίδευση και την εμπειρία τους, βοηθά στην εκπαίδευση του δικαστηρίου σχετικά με τις αρχές, τις διαδικασίες και την αξιοπιστία της χρωματογραφίας στην εγκληματολογική ανάλυση.

Οι μέθοδοι χρωματογραφίας υποβάλλονται σε αξιολόγηση από ομότιμους και δημοσιεύονται συχνά σε επιστημονικά περιοδικά. Η διαδικασία αξιολόγησης από ομότιμους προσθέτει ένα επιπλέον επίπεδο ελέγχου στη μεθοδολογία, διασφαλίζοντας ότι πληροί τα επιστημονικά πρότυπα. Η διαθεσιμότητα δημοσιευμένης βιβλιογραφίας για τη χρωματογραφία στην εγκληματολογική επιστήμη παρέχει στο δικαστήριο μια πηγή για να αξιολογήσει την επιστημονική εγκυρότητα των μεθόδων που παρουσιάζονται. Νομικά προηγούμενα, που έχουν δημιουργηθεί σε προηγούμενες

υποθέσεις, συμβάλλουν στην αποδοχή αποδεικτικών στοιχείων χρωματογραφίας στο δικαστήριο. Εάν οι μέθοδοι χρωματογραφίας έχουν χρησιμοποιηθεί με επιτυχία σε παρόμοιες περιπτώσεις και έχουν γίνει αποδεκτές από τα δικαστήρια, δημιουργεί ένα προηγούμενο που ενισχύει την αξιοπιστία της τεχνικής. Ενώ η χρωματογραφία είναι γενικά αποδεκτή στο δικαστήριο, η κατ' αντιμωλία φύση των νομικών διαδικασιών επιτρέπει την αντιπαράθεση εξέτασης και την αμφισβήτηση της μεθοδολογίας. Οι δικηγόροι ενδέχεται να αμφισβητήσουν την εγκυρότητα των χρωματογραφικών αποτελεσμάτων, την αξιοπιστία των εργαστηριακών διαδικασιών ή τα προσόντα του αναλυτή. Οι ιατροδικαστές πρέπει να είναι προετοιμασμένοι να αντιμετωπίσουν τέτοιες προκλήσεις και να υπερασπιστούν την επιστημονική ευρωστία των μεθόδων τους.

Πέρα από την αποδοχή στην αίθουσα του δικαστηρίου, η χρωματογραφία συνεχίζει να διαδραματίζει κρίσιμο ρόλο στην εξέλιξη της εγκληματολογικής επιστήμης. Η συνεχής έρευνα και ανάπτυξη διασφαλίζει ότι οι χρωματογραφικές τεχνικές παραμένουν στην πρώτη γραμμή των αναλυτικών δυνατοτήτων, αντιμετωπίζοντας νέες προκλήσεις και συμβάλλοντας στην πρόοδο στον τομέα. Η ενσωμάτωση αναδυόμενων τεχνολογιών, όπως η προηγμένη ανάλυση δεδομένων και ο αυτοματισμός, ενισχύει περαιτέρω τις πιθανές εφαρμογές της χρωματογραφίας στις εγκληματολογικές έρευνες. Καθώς η εγκληματολογική επιστήμη συνεχίζει να εξελίσσεται, η αποδοχή και η χρήση των μεθόδων χρωματογραφίας είναι πιθανό να επεκταθεί, συμβάλλοντας σε πιο αποτελεσματικές και αξιόπιστες ποινικές έρευνες.

Συμπερασματικά, τα στοιχεία που υποστηρίζουν τα οφέλη της χρωματογραφίας στην εγκληματολογική επιστήμη είναι αδιαμφισβήτητα. Από την ανάλυση φαρμάκων μέχρι την εξέταση αποδεικτικών στοιχείων, το προφίλ DNA έως την τοξικολογία, η χρωματογραφία έχει αποδειχθεί ως ένα ανεκτίμητο πλεονέκτημα στην εργαλειοθήκη του ιατροδικαστή. Η ικανότητά του να ξετυλίγει πολύπλοκα μείγματα και να παρέχει ακριβή αναλυτικά αποτελέσματα συμβάλλει σημαντικά στη διαλεύκανση των σκηνών του εγκλήματος, διασφαλίζοντας ότι η δικαιοσύνη αποδίδεται με βάση υγιείς επιστημονικές αρχές.

4.2. Μέλλοντικές Προοπτικές

Η ιατροδικαστική επιστήμη, ένα δυναμικό πεδίο στη διασταύρωση επιστήμης και δικαίου, εξελίσσεται συνεχώς για να ανταποκριθεί στις προκλήσεις της ανίχνευσης εγκλήματος και της ανάλυσης αποδεικτικών στοιχείων. Η χρωματογραφία, μια αναλυτική τεχνική ακρογωνιαίό λίθο στα εγκληματολογικά εργαστήρια, είναι έτοιμη για ένα μέλλον που χαρακτηρίζεται από συναρπαστικές εξελίξεις και μετασχηματιστικές τάσεις. Αυτό το δοκίμιο διερευνά τις πολλά υποσχόμενες

προοπτικές των εφαρμογών της χρωματογραφίας στην εγκληματολογική επιστήμη και τους βασικούς παράγοντες που διαμορφώνουν την τροχιά της.

4.2.1. Προόδους στην τεχνολογία χρωματογραφίας

Το μέλλον της χρωματογραφίας στην εγκληματολογική επιστήμη υπόσχεται πολλά, καθοδηγούμενο από τις συνεχείς εξελίξεις στην τεχνολογία. Οι εγκληματολόγοι μπορούν να προβλέψουν όργανα με βελτιωμένη ανάλυση, αυξημένη ευαισθησία και επιταχυνόμενους χρόνους ανάλυσης. Αυτά τα τεχνολογικά βήματα θα δώσουν τη δυνατότητα στους ερευνητές να αποκτήσουν πιο λεπτομερή και ακριβή αποτελέσματα, ενισχύοντας έτσι την αξιοπιστία της χρωματογραφίας σε εγκληματολογικές εφαρμογές.

4.2.2. Μικρογραφία και φορητότητα

Μια αξιοσημείωτη τάση στον ορίζοντα είναι η συνεχής σμίκρυνση και η αυξημένη φορητότητα των συστημάτων χρωματογραφίας. Οι εγκληματολογικές έρευνες απαιτούν συχνά ταχεία επιτόπια ανάλυση και αναμένεται ότι μικρότερα, πιο φορητά όργανα θα μειώσουν την εξάρτηση από κεντρικά εργαστήρια. Αυτή η αλλαγή θα μπορούσε να φέρει επανάσταση στις έρευνες στη σκηνή του εγκλήματος, προσφέροντας πληροφορίες σε πραγματικό χρόνο και επιταχύνοντας την αναλυτική διαδικασία.

4.2.3. Ανάλυση υψηλής απόδοσης

Τα εγκληματολογικά εργαστήρια χειρίζονται σημαντικό όγκο υποθέσεων, απαιτώντας αποτελεσματικές και υψηλής απόδοσης αναλυτικές μεθόδους. Το μέλλον της χρωματογραφίας περιλαμβάνει εξελίξεις σε συστήματα που μπορούν να επεξεργάζονται γρήγορα δείγματα, μειώνοντας σημαντικά τους χρόνους διεκπεραίωσης και δίνοντας τη δυνατότητα στους εγκληματολόγους να συμβαδίζουν με τη ζήτηση για έγκαιρες και ακριβείς αναλύσεις.

Η ενσωμάτωση της χρωματογραφίας με άλλες προηγμένες αναλυτικές τεχνικές, γνωστές ως ενωμένες τεχνικές, είναι έτοιμη να γίνει πιο διαδεδομένη στην εγκληματολογική επιστήμη. Η χρωματογραφία σύζευξης με τη φασματομετρία μάζας, για παράδειγμα, ενισχύει την ειδικότητα και την αξιοπιστία των εγκληματολογικών αναλύσεων. Αυτή η συνέργεια επιτρέπει μια πιο ολοκληρωμένη κατανόηση πολύπλοκων εγκληματολογικών σεναρίων.

4.2.4. Metabolomics και Προφίλ

Η τεχνική των metabolomics, η μελέτη των ενδογενών μεταβολιτών, αντιπροσωπεύει μια αναπτυσσόμενη περιοχή ενδιαφέροντος στην εγκληματολογική επιστήμη. Η χρωματογραφία αναμένεται να διαδραματίσει κεντρικό ρόλο στο μεταβολικό προφίλ, βοηθώντας στην αναγνώριση βιοδεικτών που σχετίζονται με φυσιολογικές και παθολογικές καταστάσεις. Αυτή η προσέγγιση έχει μεγάλες δυνατότητες για την προώθηση του πεδίου των εγκληματολογικών ερευνών.

4.2.5. Πρακτικές πράσινης χρωματογραφίας

Η περιβαλλοντική αειφορία αποκτά ολοένα και μεγαλύτερη σημασία στις αναλυτικές τεχνικές. Η χρωματογραφία δεν αποτελεί εξαίρεση και η υιοθέτηση «πράσινων» πρακτικών περιλαμβάνει τη χρήση φιλικών προς το περιβάλλον διαλυτών, ενεργειακά αποδοτικών συστημάτων και στρατηγικών μείωσης των απορριμμάτων. Οι μελλοντικές εφαρμογές χρωματογραφίας στην εγκληματολογική επιστήμη μπορεί να ευθυγραμμιστούν με τις παγκόσμιες προσπάθειες για πιο περιβαλλοντικά βιώσιμες μεθοδολογίες.

4.2.6. Αναλύσεις δεδομένων, αυτοματισμός και τεχνητή νοημοσύνη

Το μέλλον της χρωματογραφίας περιλαμβάνει έναν μετασχηματισμό στην ανάλυση δεδομένων και την αυτοματοποίηση. Η αυτοματοποιημένη προετοιμασία δειγμάτων, η απλοποιημένη επεξεργασία δεδομένων και η ερμηνεία των αποτελεσμάτων, πιθανώς με τη βοήθεια της τεχνητής νοημοσύνης, θα βελτιώσουν την αποτελεσματικότητα της ροής εργασίας και θα μειώσουν τον κίνδυνο ανθρώπινου λάθους στα εγκληματολογικά εργαστήρια.

4.2.7. Διεπιστημονική συνεργασία και παγκόσμια τυποποίηση

Η συνεργασία μεταξύ χρωματογράφων, ιατροδικαστών και εμπειρογνομόνων από διαφορετικούς κλάδους αναμένεται να είναι χαρακτηριστικό του μέλλοντος. Οι διεπιστημονικές προσεγγίσεις μπορούν να οδηγήσουν σε καινοτόμες λύσεις, προσφέροντας μια βαθύτερη κατανόηση των πολύπλοκων εγκληματολογικών σεναρίων. Επιπλέον, η παγκόσμια τυποποίηση και διαπίστευση των εγκληματολογικών εργαστηρίων θα συμβάλει στην καθολική αποδοχή των χρωματογραφικών μεθόδων στις νομικές διαδικασίες παγκοσμίως.

Συμπερασματικά, οι μελλοντικές προοπτικές των εφαρμογών της χρωματογραφίας στην εγκληματολογική επιστήμη χαρακτηρίζονται από μια συγχώνευση τεχνολογικής καινοτομίας,

περιβαλλοντικής συνείδησης και διεπιστημονικής συνεργασίας. Καθώς η χρωματογραφία συνεχίζει να εξελίσσεται, οι εγκληματολόγοι μπορούν να προσβλέπουν σε βελτιωμένες δυνατότητες, πιο αποτελεσματικές ροές εργασίας και αυξημένο ρόλο στην αποκάλυψη των περιπλοκών των εγκληματικών ερευνών. Το ταξίδι που ακολουθεί υπόσχεται ένα δυναμικό και μεταμορφωτικό τοπίο για τη χρωματογραφία στη σφαίρα της εγκληματολογικής επιστήμης.

5. Βιβλιογραφία

- Aliaño-González, M. J., T. Richard and E. Cantos-Villar (2020). "Grapevine cane extracts: Raw plant material, extraction methods, quantification, and applications." Biomolecules **10**(8): 1195.
- Appel, E. A., J. del Barrio, X. J. Loh and O. A. Scherman (2012). "Supramolecular polymeric hydrogels." Chemical Society Reviews **41**(18): 6195-6214.
- Argekar, A. (2006). "Planar Chromatography in Pharmaceutical Analysis." Encyclopedia of Analytical Chemistry: Applications, Theory and Instrumentation.
- Armstrong, K. M., E. N. Bermingham, S. A. Bassett, B. P. Treloar, N. C. Roy and M. P. Barnett (2011). Global DNA methylation measurement by HPLC using low amounts of DNA, Wiley Online Library.
- Bajpai, V. K., R. Majumder and J. G. Park (2016). "Isolation and purification of plant secondary metabolites using column-chromatographic technique." Bangladesh Journal of Pharmacology **11**(4): 844-848.
- Balkani, S., S. Shamekhi, R. Raoufinia, R. Parvan and J. Abdolalizadeh (2016). "Purification and characterization of bovine serum albumin using chromatographic method." Advanced pharmaceutical bulletin **6**(4): 651.
- Basha, S. M. (1988). "Resolution of peanut seed proteins by high-performance liquid chromatography." Journal of agricultural and food chemistry **36**(4): 778-781.
- Basu, S., M. C Dey, S. Kundu and A. Sinhababu (2016). "Recent development of spray reagents for the detection of amino acids on thin layer chromatography plates: an overview." Mini-Reviews in Organic Chemistry **13**(1): 3-30.
- Bele, A. A. and A. Khale (2011). "An overview on thin layer chromatography." International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research **2**(2): 256.
- Bhoj, Y., M. Tharmavaram, G. Pandey, D. Rawtani and C. Mustansar Hussain (2020). "Chromatographic techniques for forensic investigations." Technology in Forensic Science: Sampling, Analysis, Data and Regulations: 129-149.
- Bilek, M. and J. Namieśnik (2016). "Chromatographic techniques in pharmaceutical analysis in Poland: history and the presence on the basis of papers published in selected Polish pharmaceutical journals in XX century." Acta Poloniae Pharmaceutica-Drug Research **73**: 605-612.
- Block, R. J., E. L. Durrum and G. Zweig (2013). A manual of paper chromatography and paper electrophoresis, Elsevier.
- Bowsher, R. R. and P. F. Santa (2009). "Application of size-exclusion chromatography in the investigation of the in vitro stability of proinsulin and its cleaved metabolites in human serum and plasma." Journal of Chromatography B **877**(8-9): 689-696.

- Brunelle, R., J. Negri, A. Cantu and A. Lyter (1977). "Comparison of typewriter ribbon inks by thin-layer chromatography." Journal of Forensic Sciences **22**(4): 807-814.
- Brunelle, R. L. and M. J. Pro (1972). "A systematic approach to ink identification." Journal of the Association of Official Analytical Chemists **55**(4): 823-826.
- Bügler, J. H., H. Buchner and A. Dallmayer (2005). "Characterization of ballpoint pen inks by thermal desorption and gas chromatography-mass spectrometry." Journal of forensic sciences **50**(5): JFS2004486.
- Bushra, R. (2018). Functionalized nanomaterials for chromatography. Nanomaterials in Chromatography, Elsevier: 403-414.
- Butler, J. M. (2005). Forensic DNA typing: biology, technology, and genetics of STR markers, Elsevier.
- Carr, P. W., D. R. Stoll and X. Wang (2011). "Perspectives on recent advances in the speed of high-performance liquid chromatography." Analytical chemistry **83**(6): 1890-1900.
- Castillo, M., E. Carbonell, C. González and A. Miralles-Marco (2012). "Pesticide residue analysis in animal origin food: procedure proposal and evaluation for lipophilic pesticides." Pesticides-Recent Trends in Pesticide Residue Assay: 63-92.
- Cazares, L. H., M. D. Ward, E. E. Brueggemann, T. Kenny, P. Demond, C. R. Mahone, K. A. Martins, J. E. Nuss, T. Glaros and S. Bavari (2016). "Development of a liquid chromatography high resolution mass spectrometry method for the quantitation of viral envelope glycoprotein in Ebola virus-like particle vaccine preparations." Clinical Proteomics **13**(1): 1-18.
- Chawla, G. and K. K. Chaudhary (2019). "A review of HPLC technique covering its pharmaceutical, environmental, forensic, clinical and other applications." Int J Pharm Chem Anal **6**(2): 27-39.
- Clatworthy, A., M. Oon, R. Smith and M. Whitehouse (1990). "Gas chromatographic-mass spectrometric confirmation of radioimmunoassay results for cannabinoids in blood and urine." Forensic science international **46**(3): 219-230.
- Colwell Jr, L. F. and B. L. Karger (1977). "Ball-point pen ink examination by high pressure liquid chromatography." journal of the Association of Official Analytical Chemists **60**(3): 613-618.
- Coskun, O. (2016). "Separation techniques: chromatography." Northern clinics of Istanbul **3**(2): 156.
- Coskun, O. (2016). "Separation techniques: Chromatography." North Clin Istanbul **3**(2): 156-160.
- Csapó, J., C. Albert, K. Lóki and Z. Csapó-Kiss (2008). "Separation and determination of the amino acids by ion exchange column chromatography applying postcolumn derivatization." Acta Universitatis Sapientiae Alimentaria **1**: 5-29.
- Dąbrowski, A., Z. Hubicki, P. Podkościelny and E. Robens (2004). "Selective removal of the heavy metal ions from waters and industrial wastewaters by ion-exchange method." Chemosphere **56**(2): 91-106.

- Daldrup, T., P. Michalke and S. Szathmary (1986). "HPLC in forensic chemistry." Practice of High Performance Liquid Chromatography: Applications, Equipment and Quantitative Analysis: 241-285.
- Das, M. and D. Dasgupta (1998). "Pseudo-affinity column chromatography based rapid purification procedure for T7 RNA polymerase." Preparative biochemistry & biotechnology **28**(4): 339-348.
- Dettmer-Wilde, K. and W. Engewald (2014). "Practical gas chromatography." A Comprehensive Reference. Springer: 902.
- Doali, J. O. and A. A. Juhasz (1974). "Application of high speed liquid chromatography to the qualitative analysis of compounds of propellant and explosives interest." Journal of Chromatographic Science **12**(1): 51-56.
- Dolan, J. W. and L. R. Snyder (2013). Method development in liquid chromatography. Liquid Chromatography, Elsevier: 251-267.
- Drouet-Coassolo, C., C. Aubert, P. Coassolo and J.-P. Cano (1989). "Capillary gas chromatographic-mass spectrometric method for the identification and quantification of some benzodiazepines and their unconjugated metabolites in plasma." Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications **487**: 295-311.
- Egan, G., K. Mount, M. Miller and J. McDonald (2004). GC/MS analysis of organic peroxide explosives. Proc. 8th Int. Symp. Analysis and Detection of Explosives.
- Fair, J. D. and C. M. Kormos (2008). "Flash column chromatograms estimated from thin-layer chromatography data." Journal of Chromatography A **1211**(1-2): 49-54.
- Fanali, S., P. R. Haddad, C. Poole and M.-L. Riekkola (2017). Liquid chromatography: applications, Elsevier.
- Fried, B. and J. Sherma (2003). Handbook of Thin-Layer Chromatography, Marcel Dekker.
- Gadgil, H., S. A. Oak and H. W. Jarrett (2001). "Affinity purification of DNA-binding proteins." Journal of biochemical and biophysical methods **49**(1-3): 607-624.
- Gaikwad, J., S. Sharma and K. V. Hatware (2020). "Review on characteristics and analytical methods of tazarotene: an update." Critical Reviews in Analytical Chemistry **50**(1): 90-96.
- Gal, J.-F. (2010). "A short note on the history of chromatography at the University of Tartu, Estonia." Chromatographia **72**: 203-204.
- Grinberg, N. and P. W. Carr (2020). Advances in Chromatography, Volume 57, CRC Press.
- Hagel, L. (1998). "Gel-filtration chromatography." Current protocols in molecular biology **44**(1): 10.19. 11-10.19. 12.
- Hamilton, R. J. and P. A. Sewell (1982). Introduction to high performance liquid chromatography. Introduction to high performance liquid chromatography, Springer: 1-12.
- Harris, D. C. (2012). Exploring chemical analysis, Macmillan.

- Hayashi, K., J.-B. Lee, K. Atsumi, M. Kanazashi, T. Shibayama, K. Okamoto, T. Kawahara and T. Hayashi (2019). "In vitro and in vivo anti-herpes simplex virus activity of monogalactosyl diacylglyceride from *Coccomyxa* sp. KJ (IPOD FERM BP-22254), a green microalga." PLoS One **14**(7): e0219305.
- Hong, P., S. Koza and E. S. Bouvier (2012). "A review size-exclusion chromatography for the analysis of protein biotherapeutics and their aggregates." Journal of liquid chromatography & related technologies **35**(20): 2923-2950.
- Huber, C. G. (2006). "Biopolymer chromatography." Encyclopedia of Analytical Chemistry: Applications, Theory and Instrumentation.
- Ismail, B. and S. S. Nielsen (2010). "Basic principles of chromatography." Food analysis **27**: 473-498.
- Jacobs, M. R., E. F. Hilder and R. A. Shellie (2013). "Applications of resistive heating in gas chromatography: A review." Analytica Chimica Acta **803**: 2-14.
- James, S. H. and J. J. Nordby (2002). Forensic science: an introduction to scientific and investigative techniques, CRC press.
- Jennings, W. G. and C. F. Poole (2021). Milestones in the development of gas chromatography. Gas Chromatography, Elsevier: 1-17.
- Keto, R. (1984). "Characterization of alkali blue pigment in counterfeit currency by high performance liquid chromatography." Journal of Forensic Sciences **29**(1): 198-208.
- Kostanski, L. K., D. M. Keller and A. E. Hamielec (2004). "Size-exclusion chromatography—a review of calibration methodologies." Journal of biochemical and biophysical methods **58**(2): 159-186.
- Krull, I., E. Davis, C. Santasania, S. Kraus, A. Basch and Y. Bamberger (1981). "Trace Analysis of Explosives by HPLC-Electron Capture Detection (HPLC-ECD) 18." Analytical Letters **14**(16): 1363-1376.
- Kumar, P. (2016). Fundamentals and Techniques of Biophysics and Molecular biology, Pathfinder Publication unit of PAPL.
- Łacki, K. M. and F. J. Riske (2020). "Affinity chromatography: an enabling technology for large-scale bioprocessing." Biotechnology Journal **15**(1): 1800397.
- Lafleur, A. L. and B. D. Morriveau (1980). "Identification of explosives at trace levels by high performance liquid chromatography with a nitrosyl-specific detector." Analytical Chemistry **52**(8): 1313-1318.
- Lakka, N. S. and C. Kuppan (2019). Principles of chromatography method development. Biochemical analysis tools-methods for bio-molecules studies, IntechOpen.

- Lemire, K. A., Y. Y. Rodriguez and M. T. McIntosh (2016). "Alkaline hydrolysis to remove potentially infectious viral RNA contaminants from DNA." Virology Journal **13**: 1-12.
- Limonta, M., G. Márquez, I. Rey, M. Pupo, O. Ruiz, Y. Amador-Canizares and S. Duenas-Carrera (2008). "Plasmid DNA recovery using size-exclusion and perfusion chromatography."
- Liu, L.-x., Y. Zhang, Y. Zhou, G.-h. Li, G.-j. Yang and X.-s. Feng (2020). "The application of supercritical fluid chromatography in food quality and food safety: an overview." Critical reviews in analytical chemistry **50**(2): 136-160.
- Livengood, J. (2009). "Why was MS Tswett's chromatographic adsorption analysis rejected?" Studies in History and Philosophy of Science Part A **40**(1): 57-69.
- Lundanes, E., L. Reubsaet and T. Greibrokk (2013). Chromatography: basic principles, sample preparations and related methods, John Wiley & Sons.
- Luqman, M. (2012). Ion exchange technology II: Applications, Springer Science & Business Media.
- Lyter, A. (1982). "Examination of ball pen ink by high pressure liquid chromatography." Journal of Forensic Sciences **27**(1): 154-160.
- MacCalman, T. E., M. K. Phillips-Jones and S. E. Harding (2019). "Glycoconjugate vaccines: some observations on carrier and production methods." Biotechnology and Genetic Engineering Reviews **35**(2): 93-125.
- MacKintosh, C. (2006). "Chromatography: from colour writing to separation science." Journal later that year5 and earned the Nobel Prize in 19526: 7.
- Mahugo-Santana, C., Z. Sosa-Ferrera, M. E. Torres-Padrón and J. J. Santana-Rodríguez (2011). "Application of new approaches to liquid-phase microextraction for the determination of emerging pollutants." TrAC Trends in Analytical Chemistry **30**(5): 731-748.
- Majors, R. (2007). "Column pressure considerations in analytical HPLC." LCGC North America **25**(11): 1074-1092-1074-1092.
- Mariottini, C. (2018). Assessment of new psychoactive substances in wastewater, Itä-Suomen yliopisto.
- Maurer, H. H. (1992). "Systematic toxicological analysis of drugs and their metabolites by gas chromatography—mass spectrometry." Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications **580**(1-2): 3-41.
- Mohrig, J. R., C. N. Hammond and P. F. Schatz (2010). Techniques in organic chemistry, Macmillan.
- Moldoveanu, S. and V. David (2013). "Retention mechanisms in different HPLC types." Essentials in modern HPLC separations: 145-190.
- Mori, S. and H. G. Barth (1999). Size exclusion chromatography, Springer Science & Business Media.

- Nakamura, G. R. and S. C. Shimoda (1965). "Examination of micro-quantity of ball point inks from documents by thin-layer chromatography." J. Crim. L. Criminology & Police Sci. **56**: 113.
- Ninfa, A. J., D. P. Ballou and M. Benore (2009). Fundamental laboratory approaches for biochemistry and biotechnology, John Wiley & Sons.
- Okhrimenko, D., C. Nielsen, L. Lakshtanov, K. Dalby, D. Johansson, M. Solvang, J. Deubener and S. Stipp (2020). "Surface Reactivity and Dissolution Properties of Alumina–Silica Glasses and Fibers." ACS applied materials & interfaces **12**(32): 36740-36754.
- Olson, W. P. (2020). Separations technology: pharmaceutical and biotechnology applications, CRC Press.
- Parker, C., Y. Tondeur, D. Harvan, J. Hass, R. Voyksner, J. Henion and J. Yinon (1982). "Analysis of explosives by liquid chromatography-negative ion chemical ionization mass spectrometry." Journal of Forensic Sciences **27**(3): 495-505.
- Patil, A. R., P. M. Ghagare, B. J. Deshmane and M. S. Kondawar (2020). "Review on Chromatography Principal Types and it's Application." Research Journal of Pharmaceutical Dosage Forms and Technology **12**(1): 27-32.
- Perret, G. and E. Boschetti (2020). "Aptamer-based affinity chromatography for protein extraction and purification." Aptamers in Biotechnology: 93-139.
- Press, C. (2010). Handbook of Biochemistry and Molecular Biology, CRC Press.
- Rao, G. and A. Goyal (2016). "An overview on analytical method development and validation by using HPLC." The Pharmaceutical and Chemical Journal **3**(2): 280-289.
- Raoufinia, R., A. Mota, N. Keyhanvar, F. Safari, S. Shamekhi and J. Abdolalizadeh (2016). "Overview of albumin and its purification methods." Advanced pharmaceutical bulletin **6**(4): 495.
- Rawtani, D., M. Tharmavaram, G. Pandey and C. M. Hussain (2019). "Functionalized nanomaterial for forensic sample analysis." TrAC Trends in Analytical Chemistry **120**: 115661.
- Reich, E. and A. Schibli (2007). "High-performance thin-layer chromatography for the analysis of medicinal plants." (No Title).
- Rejczak, T. and T. Tuzimski (2017). "Application of high-performance liquid chromatography with diode array detector for simultaneous determination of 11 synthetic dyes in selected beverages and foodstuffs." Food Analytical Methods **10**: 3572-3588.
- Saferstein, R. (2004). "Criminalistics: An introduction to forensic science."
- Sato, K., M. Onoguchi, K. Hosokawa and M. Maeda (2006). "Affinity capillary electrophoresis of DNA for detection of single-nucleotide polymorphisms and point mutations: Comprehensive study for optimization of the weak affinity." Journal of Chromatography A **1111**(2): 120-126.
- Schmitz, O., B. Brock and J. Rungby (2004). "Amylin agonists: a novel approach in the treatment of diabetes." Diabetes **53**(suppl_3): S233-S238.

- Shakouri, A., R. Parvan, N. Adljouy and J. Abdolalizadeh (2020). "Purification of h yaluronidase as an anticancer agent inhibiting CD44." Biomedical Chromatography **34**(1): e4709.
- Sherma, J. (2018). "Biennial Review of Planar Chromatography: 2015–2017." Journal of AOAC International **101**(4): 905-913.
- Sinha, S. N. and H. Venkatakrishna-Bhatt (2004). "Chromatography-Mass spectrophotometric techniques for air pollutants: A commentary." Journal of occupational health **46**(1): 82-86.
- Smith, R. M. (1988). "Supercritical fluid chromatography."
- Snyder, L. R., J. J. Kirkland and J. W. Dolan (2011). Introduction to modern liquid chromatography, John Wiley & Sons.
- Stambouli, A., A. El Bouri, T. Bouayoun and M. Bellimam (2004). "Headspace-GC/MS detection of TATP traces in post-explosion debris." Forensic Science International **146**: S191-S194.
- Staniak, M., M. Wójciak, I. Sowa, K. Tyszczyk-Rotko, M. Strzemski, S. Dresler and W. Myśliński (2020). "Silica-based monolithic columns as a tool in HPLC—An overview of application in analysis of active compounds in biological samples." Molecules **25**(14): 3149.
- Stoddard, J. M., L. Nguyen, H. Mata-Chavez and K. Nguyen (2007). "TLC plates as a convenient platform for solvent-free reactions." Chemical communications(12): 1240-1241.
- Swarbrick, J. "Encyclopedia of Pharmaceutical Technology, pdf."
- Tappolet, J. (1984). Etude de l'application en criminalistique de la chromomathographie en couche mince à haut performance (CCMHP) à l'examen de traits d'encre liquides noires, bleues et bleu-royal.
- Tappolet, J. A. (1983). "The high-performance thin layer chromatography (HPTLC). Its application to the examination of writing inks." Forensic science international **22**(2-3): 99-109.
- Taylor, L. T. (2009). "Supercritical fluid chromatography for the 21st century." The Journal of Supercritical Fluids **47**(3): 566-573.
- Taylor, L. T. (2010). "Supercritical fluid chromatography." Analytical chemistry **82**(12): 4925-4935.
- Tebbett, I. (1991). "Chromatographic Analysis of Inks for Forensic Science Applications." Forensic Science Review **3**(2): 71-82.
- Thol, J. (1960). "Analysis of ball point by TLC." Police **7:63**.
- Vazquez-Roig, P. and Y. Pico (2012). Gas chromatography and mass spectroscopy techniques for the detection of chemical contaminants and residues in foods. Chemical Contaminants and Residues in Food, Elsevier: 17-61.
- Wang, K., Q. Chen, Y. Lin, S. Yu, H. Lin, J. Huang and Z. Liu (2016). "Separation of catechins and O-methylated (–)-epigallocatechin gallate using polyamide thin-layer chromatography." Journal of Chromatography B **1017**: 221-225.

- White, C. (2005). "Integration of supercritical fluid chromatography into drug discovery as a routine support tool: Part I. Fast chiral screening and purification." Journal of Chromatography A **1074**(1-2): 163-173.
- Wiggins, K. G., J.-A. Holness and B. M. March (2005). "The importance of thin layer chromatography and UV microspectrophotometry in the analysis of reactive dyes released from wool and cotton fibers." Journal of forensic sciences **50**(2): JFS2004266.
- Williams, K. R. (2002). "Colored Bands: History of Chromatography." Journal of Chemical Education **79**(8): 922.
- Wilson, J. D., G. M. LaPorte and A. A. Cantu (2004). "Differentiation of black gel inks using optical and chemical techniques." Journal of Forensic Sciences **49**(2): JFS2003262.
- Zadora, G. and D. Zuba (2006). "Gas chromatography in forensic science." Encyclopedia of Analytical Chemistry: Applications, Theory and Instrumentation.
- Zeichner, A., B. Eldar, B. Glattstein, A. Koffman, T. Tamiri and D. Muller (2003). "Vacuum collection of gunpowder residues from clothing worn by shooting suspects, and their analysis by GC/TEA, IMS, and GC/MS." Journal of forensic sciences **48**(5): JFS2002390.
- Zeki, Ö. C., C. C. Eylem, T. Reçber, S. Kır and E. Nemutlu (2020). "Integration of GC–MS and LC–MS for untargeted metabolomics profiling." Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis **190**: 113509.