



Korespondenční Seminář Inspirovaný Chemickou Tematikou

Seriál o detektivní chemii
Chemické nástroje detektivů

Seriál o detektivní chemii – Chemické nástroje detektivů

Autor: Karel Berka

Inspektor Chemie se rozhlédl po své laboratoři. Zavadil pohledem o mikroskop, kterým našel tričko vraha Kolouška, o spektrofotometr, díky němuž prokázal, že žvýkačky prodávané před školou skutečně obsahovaly extázi. V rožku poblíkávající plamen atomového absorpčního spektrometru zase odhalil střelbu nad hřbitovní rakví Dona Cozzy a plynový chromatograf stojící u okna se osvědčil při důkazu nevídaně vysoké koncentrace alkoholu v krvi řidiče K. při jeho smrtící jízdě po tramvajové zastávce.

Čím, řekněte mi čím...

Laboratoře forenzní chemie většinou nebývají plně nejnovějších výstřelků laboratorní techniky, které se běžně objevují v seriálech Kriminálka XYZ. Detektivové mají rádi věci dobře vyzkoušené a s puncem pravdivosti, což je u nových metod vždy otevřená otázka. Čím víc se toho časem v chemii mění, tím více zůstávají věci stejné.

První forenzní laboratoř založil v roce 1910 Edmund Locard se dvěma přístroji – mikroskopem a spektrofotometrem. A tyto přístroje jsou pilíři forenzní analýzy dodnes. Jen k nim přibýly i další spektroskopické metody jako infračervená spektroskopie a rentgen. Dalším vylepšením jsou dělicí analytické metody jako je například plynová chromatografie s hmotnostním spektrometrem (GC-MS), dokonce i nukleární magnetická resonance (NMR) a skenovací elektronová mikroskopie (SEM) si pomalu nacházejí cestu do některých forenzních laboratoří. V každé forenzní laboratoři ale najdete alespoň jeden mikroskop, a proto začneme právě s ním.

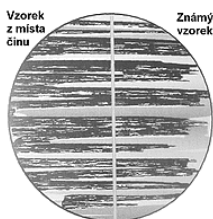
Viděti mnoho – mikroskopické techniky

Mikroskopické techniky se používají ve forenzní analýze už od dob Sherlocka Holmese a Edmunda Locarda a to na mnoha místech – pokaždé, když je potřeba si něco prohlédnout zblízka, ať už jde o vlákna, krystalky jedů nebo kontrolu vzorků z místa činu.

Porovnávací mikroskop

Na rychlé třídění se používají porovnávací mikroskopy se přibližně čtyřicetinásobným zvětšením. Jsou to vlastně dva mikroskopy v jednom spojené můstkem. Při pohledu do porovnávacího mikroskopu pak vidíme najednou dva

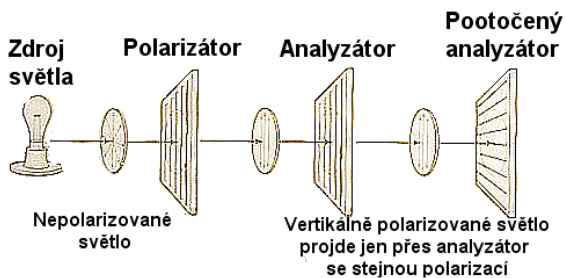
vzorky (obr. 1). Před začátkem používání počítačového zpracování v daktyloskopii se právě takto porovnávaly i otisky prstů.



Obrázek 1: Pohled do porovnávacího mikroskopu. V tomto případě se zdá, že jsme našli správný vzorek tkaniny.

Mikroskopy s polarizovaným světlem

Na trochu podrobnější zkoumání, především vláken a vlasů, se používají mikroskopy používající polarizované světlo. To získáme z obecného světla pomocí polarizačního filtru, který propouští světlo polarizované jen v jedné rovině (obr. 2).



Obrázek 2: Vznik a použití polarizovaného světla

Pokud by světlo procházelo neuspořádaným vzorkem, jakým je například sklo, pak se rovina polarizovaného světla nestáčí a při uspořádání dle obr. 2 bude vidět jen černá plocha. Ale jakákoliv organizovanost vzorku rovinu polarizovaného světla stáčí. A tato organizovaná místa pak září na černém pozadí (obr. 3).



Obrázek 3: Křížení syntetických vláken pod mikroskopem s polarizovaným světlem

Moc světla – spektroskopie

Spektroskopie je metoda založená na interakci elektromagnetického záření se vzorkem. Z tohoto pohledu je vlastně i mikroskopie spektroskopii, neboť používá interakci viditelného záření se vzorkem a jako detektor použije lidské oko. Ale nejen viditelné světlo je záření a lidské oko není zas až tak dobrý detektor, který se bude chovat za všech okolností stejně, aby by zajistilo re-produkovatelné výsledky.

U kolébky spektroskopie stál sir Isaac Newton se svým hranolem a obje-
vem monochromatického světla. Také si všiml, že čím čistější monochromatické světlo získává, tím slabší je jeho intenzita, což je pravda, kterou překonaly až lasery a synchrotrony. Nicméně první spektrometr vytvořili Kirchhoff a Bunsen v roce 1860 (obr. 4). Bunsen k tomu řekl: „Určení jednoho prostého faktu je mnohem důležitější, než ta nejkrásněji sestavená teorie.“ Tahle slova by mohla být mottem forenzní chemie, nemyslíte?



Obrázek 4: Dobová karikatura Bunsena

Spektroskopie se dá rozdělit podle několika měřítek. Prvním měřítkem může být typ interakce záření s hmotou. Atom může záření pohltit (*absorpce*), nebo může naopak uvolnit energii ve formě záření (*emise*), na konec může záření pohltit a po čase ho opět vypustit (*fluorescence* a *fosforescence*)¹.

Druhým měřítkem může být použitá vlnová délka a tedy typ záření. Rozdělení podle tohoto měřítka ukazuje tabulka 1.

Typ záření	Vlnová délka λ [cm]	Energie [kcal/mol]	Interakce s hmotou
gamma (γ)	10^{-9}	10^6	rozpady atomových jader
Rentgenovo (RTG)	10^{-7}	10^4	ionizace
ultrafialové (UV)	10^{-5}	10^2	přechody elektronů
viditelné (VIS)	10^{-4}	10	přechody elektronů
infračervené (IR)	10^{-3}	1	vibrace molekul
mikrovlnné (MW)	10^{-1}	10^{-2}	rotace molekul
radiové (LW)	10^4	10^{-6}	přechody jaderného spinu

Tabulka 1: Typy záření a jeho vlastnosti

Povšimněte si, že se zkracující se vlnovou délkou záření se zvyšuje jeho energie a také dopad záření na atomy, či molekuly je drtivější. Zatímco radiové vlny svým dopadem ovlivní jen orientaci jaderného spinu a molekule vlastně nic neudělají, gamma záření je schopno rozmetat i atomová jádra.

Ale detektivové nepotřebují rozmetávat atomová jádra. Vystačí si s prvkovou analýzou, kterou poskytuje RTG záření, případně s UV/VIS nebo IR spektroskopii. Fluorescence se používá například k zobrazování otisků a také k DNA značení při hledání otcovství.

UV/VIS – spektroskopie ve viditelné a ultrafialové oblasti

UV/VIS spektroskopie je klasická metoda, která už má svou chvíli slávy za sebou. Její zaměření na barvy a inkousty má jednu zásadní vadu – signál posléze nestačí k úplné identifikaci vzorku, je příliš obecný. Ovšem obecnost

¹Rozdíl mezi fluorescencí a fosforescencí je především v časové škále, na jaké se projevují. Zatímco fluorescence je přechod mezi povolenými stavy a tudíž jí nic nebrání ve vypouštění fotonů již za pár nanosekund, fosforescence je přechod zakázaný. Leč žádný zákaz nezadrží fotony věčně a tak se i fosforescence dočká svých fotonů, ale trvá jí to občas až minuty.

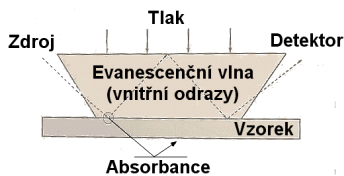
má i jednu výhodu – UV/VIS spektrofotometr² může sloužit jako detektor v dělicích aparaturách z následující kapitoly.

IR – infračervená spektroskopie

IR spektroskopie je zásadně kvalitativní metoda, která dává velice přesnou identifikaci izolované látky. IR spektrum totiž obsahuje tzv. fingerprint region mezi 1300 až 100 cm^{-1} , který je pro každou látku typický a při analýze se použije porovnání naměřeného spektra se spektrem drogy, případně vlákna v knihovně³. Protože IR záření je zachytáváno sklem a v některých oblastech spektra i vzduchem, musí se vzorek vložit do bromidu draselného a stlačit, aby se vyhnal překážející vzduch a měření pak probíhá ve vakuu.

ATR – zeslabený úplný odraz

Zajímavou modifikací IR spektroskopie je tzv. zeslabený úplný odraz (*Attenuated Total Reflectance*). Infračervený paprsek se pošle pod správným úhlem do upraveného hranolu diamantu, germania, ZnS, ThBr, nebo ZnSe. Protože mají tyto látky vyšší index lomu než okolní vzduch, dochází u nich k úplnému odrazu a paprsek vlastně postupuje uvnitř hranolu, podobně jako uvnitř optického kabelu (obr. 5). Změnou oproti optickému kabelu je přitlačení hranolu na vzorek, kdy se část paprsku ztratí při dotyku se vzorkem a dojde tedy k zeslabení odraženého paprsku.

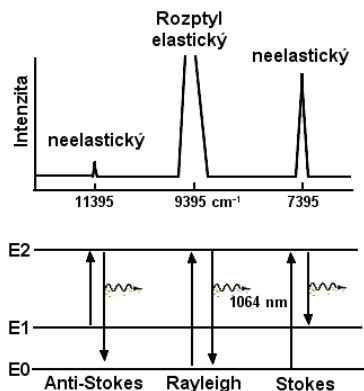


Obrázek 5: Attenuated Total Reflectance, infračervené záření je absorbováno jen malou vrstvou vzorku

Toto zeslabení je našťastí pro analytiku způsobeno absorpcí a získáme tedy infračervené spektrum vzorku. Sice jsou trochu jiná, než standardní infračer-

²Proč vlastně používáme slovo spektrofotometr a ne spektroskop? Název spektrofotometru, případně zkráceně spektrometru poukazuje na fakt, že spektra jsou sbírána počítáním (metrikou), jak moc se změnila intenzita světla při průchodu vzorkem pro danou vlnovou délku.

³Nemyslíme tím oblíbenou chobotničku, alias blob, spíše databázi spekter v počítači.



Obrázek 6: Přechny elektronů a tomu odpovídající spektrální čáry

vená spektra, což je způsobeno malou hloubkou, do které se vlastně díváme (kolem $1 \mu\text{m}$), ale vzhledem k zjednodušení přípravy vzorků se to vyplatí a knihovny ATR spekter také postupem času porostou.

Ramanova spektroskopie

Ramanova spektroskopie je další metoda pracující s vibracemi molekul, tedy v infračerveném pásmu. Tato technika používá rozptyl laserového paprsku při interakci s látkou. Nejčastěji laserový paprsek excituje elektron v základním stavu, který při návratu do základního stavu vyzáří foton se stejnou vlnovou délkou, ale v zásadě libovolným směrem. To je tzv. Rayleighův rozptyl, který nese žádnou analytickou informaci. Tu ale nesou fotony s jinou vlnovou délkou, které vznikají buď z excitovaných elektronů, které pak spadnou do základního stavu – Anti-Stokesovy fotony s větší energií než byla energie fotonů laserového paprsku, nebo z elektronů, které byly původně v základním stavu, ale deexcitovaly se jen částečně – tzv. Stokesovy fotony (obr. 6).

Ramanova spektroskopie se uplatňuje při analýze drog a farmaceutik, barev, inkoustů i vláken. Využití našel i například při ověřování pravosti mapy Vinlandu (obr. 7), která měla dokázat, že Vikingové byli v Americe před Kolumbem. Objevena byla v roce 1957, a jak už to u podobných objevů bývá, okamžitě byla zpochybněna její autenticita. Byla mnohokrát zkoumána, takže například Cahill rentgenem ukázal, že byla kreslena jen jednou a to na pergameni z roku 1434, jak pro změnu určili Donahue, Olin a Harbottle pomocí uhlíkového datování. Zbývala otázka, čím byla mapa kreslena?

Původní středověké dokumenty psané černým inkoustem často obsahovaly



Obrázek 7: Mapa Vinlandu, nebo také Mappa Mundi, Yale University Press

gallotanát železitý, který se pomalu šířil z inkoustu do pergamenu pod ním. Migrující železo po čase způsobuje zažloutnutí a zkrěhnutí pergamenu a vytvoří žluté okraje kolem černého písma. Brownová a Clark použili Ramanovu spektroskopii a zjistili, že černý inkoust obsahuje především uhlík a pergamen mapy nevykazuje známky poškození předpokládaného u gallotanátového, nebo také duběnkového inkoustu. Zvláštní přitom je, že kodex *Historia Tartarum*, se kterým byla mapa poprvé nalezena a který je autentický a nezpochybnovaný, byl psán běžným duběnkovým inkoustem. Zdá se, že padělatel nejprve nakreslil žluté linie, do kterých poté vepsal tenčí linku černým inkoustem. Na druhou stranu Cahill proměřil vzdálenosti okrajů černé a žluté linie a nejsou větší, než $100\ \mu\text{m}$, což zase nahrává teoriím o pravosti mapy, protože takové přesnosti se jinak špatně dvojím kreslením dosahuje. . . Nu, zdá se, že příběh mapy Vinlandu ještě úplně neskončil.

Atomová spektroskopie aneb elementární analýza

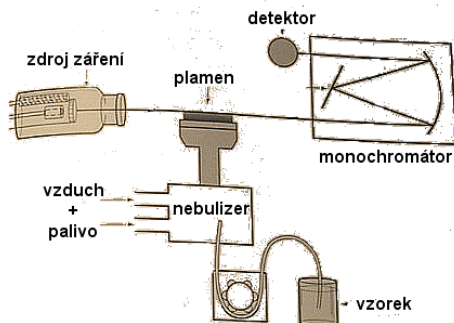
IR spektroskopie sice forenzní analýze dominuje, ale pro detekci těžkých kovů, například z jedů, případně ze zbytků střeliva jsou zapotřebí jiné nástroje.

Jedním z nich je *atomová absorpční spektroskopie* (AAS), druhým je *fluorescence rentgenových paprsků* (XRF). Obě pracují s přechody vnitřních elektronů, tj. elektronů, které se neúčastní vazeb, ale jsou přimknuté blíže k atomovému jádru. Vnitřní elektron se nejdříve excituje a při návratu zpět na původní energetickou hladinu vyžáří foton. Díky tomu, že každé atomové jádro

má jinou sadu těchto elektronů s troškou jinými energiemi, sledováním vyzářených elektronů získáváme informaci přímo o přítomném jádře a tedy i o typu atomu. Obě metody pracují se záchytem záření, ale liší se způsobem excitace, která k přechodům vnitřních elektronů vede.

AAS – atomová absorpční spektroskopie

AAS používá lampu s katodou potaženou kovem, který chceme stanovit. Ta vysílá fotony, které zachycují stejné atomy, jaké jsou ve vzorku. Vzorek excitujeme buď plasmou, nebo plamenem. Mezi plamen a detektor dáme monochromátor, který nastavíme tak, aby propustil světlo se správnou vlnovou délkou (obr. 8). Pokud jsou v plameni příslušné excitované atomy, záření je pohlceno a my uvidíme pokles intenzity, který bude přímo úměrný koncentraci atomů v našem vzorku.



Obrázek 8: Experimentální uspořádání AAS

XRF – rentgenová fluorescence

XRF používá k excitaci proud rentgenového záření. To je schopno excitovat vnitřní elektron, který dokonce může opustit atom. Ve chvíli, kdy se uvolní vnitřní elektron, elektrony z vyšších slupek „spadnou“ na jeho místo a uvolní přebytečnou energii ve formě fotonu, která bude nižší, než byla energie původního rentgenového fotonu. Elektrony mohou popadat kaskádovitě, takže se může objevit spektrum různých fotonů a toto právě toto fluorescenční spektrum se používá k identifikaci atomu. Ač to tak z popisu odlétajících elektronů nemusí vypadat, XRF je nedestruktivní metoda, která se dá použít ke studiu povrchu vzorků.

Fungující kočkopes – mikrospektrofotometrie

Použití srovnávacích mikroskopů má jednu vadu – ty dvě červené barvy, které vypadají stejně, se ve skutečnosti mohou lišit ve složení. A naopak spektrální metody mají tu vadu, že sice změříme spektrum, ale jen celého vzorku a my bychom potřebovali znát jen jeho část a nejlépe ji i vidět. Jak je ale spojit?

Řešením se stala mikrospektrofotometrie (MSF), která v sobě spojuje mikroskopické i spektroskopické metody, přičemž toto spojení donedávna naráželo především na technická omezení – na konstrukci čoček a na slabé zdroje záření. Konstrukce čoček se napravila používáním elektromagnetických cívek, případně naleštěných ocelových zrcadel místo skleněných a o dostatečně silné zdroje záření se postaraly lasery.

Hlavní výhodou MSF pak je, že můžeme zkoumat vzorky do většího detailu, třeba jen jedno vlákno a rovnou si vzorek, na který se díváme, proklepnout i spektrálně. Jednotlivé mikrometody našly použití pro:

- mikro-UV/VIS pro nedestruktivní analýzu vláken, inkoustů a barev,
- mikro-ATR pro drogy a barvy,
- mikro-Raman pro pigmenty a inkousty.

Mikroelementární analýza je trošku zvláštní případ a je vlastně vedlejším produktem práce skenovacího elektronového mikroskopu (SEM), který skládá obraz objektu pomocí proudu elektronů, které se na vzorku rozptylují. Elektrony atomy nabíjejí, ale také nárazy elektronů na atomy⁴ vytváří rentgenové záření, jež nám prozradí, jaké atomy ve vzorku jsou.

Rozděl a panuj – složené techniky

Takřka všechny předchozí metody se nejlépe uplatní, pokud je vzorek jednoduchý a skládá se jen z pár sloučenin. Opak bývá pravdou. Aby se usnadnila analýza, používají se kombinované techniky, které využívají dělicí metodu spolu s metodami detekčními, jako jsou například detekce vodivosti, případně UV/VIS spektroskopie. Dělicí metody jsou nejčastěji založené na *chromatografii*, tedy dělení látek rozdílným zpožděním na rozmezí stacionární fáze a mobilní fáze jako tomu bylo v minulém dílu seriálu v případě chromatografie na tenké vrstvě – TLC.

⁴Nárazy elektronů kromě rentgenového záření vytvářejí i záporný elektrický náboj, který se ze vzorku musí odebírat, aby se další přilétající elektrony nezačaly elektricky odpuzovat. Vzorek tedy musí být vodivý. Pokud vodivý není, většinou se pozlatí atomární vrstvičkou zlata.

Další možností jsou *elektroforetické metody* založené na pohyblivosti iontů. Ionty jsou zadržovány na stacionární fázi, případně kapilárou a dochází k dělení podle velikosti iontu a jeho celkového náboje.

Elektroforetické metody

Jejich použití je poměrně pestré – zatímco aplikace *kapilární elektroforézy* (CE) ovládly DNA otisky (DNA fingerprinting nebo také DNA typing) a díky své nenáročnosti a výhodné ceně si pomalu brousí zuby na toxikologii, elektroforéza v plynné fázi, nebo také *ion mobility spectrometry* (IMS) je hlavním nástrojem ve vyhledávání výbušnin a drog na letištích, přístavech a hraničních přechodech.

V IMS se malý vzorek vzduchu nejprve ionizuje pomocí β -zářiče ^{63}Ni . Protože se pracuje za atmosférického tlaku, vzniklé ionty jsou obklopeny vodní párou, které zvýší váhu iontů. Načež se na ionty a molekulární klastry uplatní elektrické pole a ionty se podle něj začnou pohybovat. Dělení podle velikosti pak obstarává protiproud netečného plynu a malé ionty dopadnou na detektor dříve, než velké iontově-molekulové klastry. Výstupem je pak graf intenzity proti času. Mobilitní spektrum sice nestačí k úplné identifikaci látky, ale může okruh hledání výrazně zúžit.

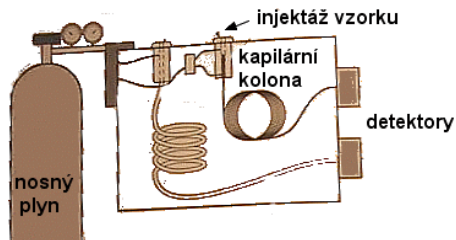
Chromatografické metody

Kromě chromatografie na tenké vrstvě, kterou jsme poznali minule, se používají dvě další chromatografické metody. Výhodou *vysokoučinné kapalně chromatografie* (HPLC⁵) je její proměnlivost – její dělicí schopnost totiž značně závisí na použité koloně a použitých rozpouštědlech, které se navíc dají v průběhu analýzy vzájemně míchat. HPLC si našla své použití hlavně při stanovování netěkavých látek jakou jsou větší polymery typu proteinů nebo cukrů, nebo tepelně nestabilních látek jako je například LSD či výbušniny.

Plynná chromatografie (GC) používá místo rozpouštědla nosný plyn a používá se především pro stanovování těkavých, případně tepelně stabilních látek – drog, případně urychlovačů hoření (obr. 9).

Jak v HPLC, tak v GC potřebujeme rozpoznat, že látka už kolonou prošla a nejlépe i určit, jaká látka to byla. Jako detektory se často používá spektroskopických metod, ale více popisnou metodou je *hmotnostní spektrometrie* (MS).

⁵Zkratka HPLC dnes označuje high performance liquid chromatography, i když původně znamenala high pressure liquid chromatography.



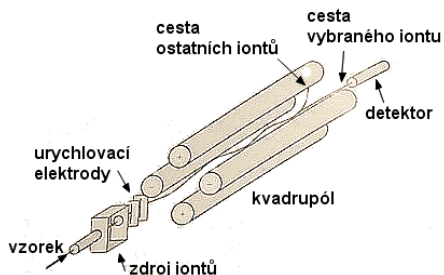
Obrázek 9: Experimentální uspořádání plynové chromatografie

MS – hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie pracuje s dělením podle poměru m/z , kde m je hmotnost a z je náboj fragmentu. Vzorek se nejprve musí ionizovat, což často vede k fragmentaci molekuly a vzniklé ionty se posléze dělí pomocí elektromagnetického pole. Získáme pak spektrum jednotlivých hmotností dělených nábojem. Dělení probíhá ve vakuu a možnosti dělení jsou v podstatě dvojí.

Zprv jde o urychlování elektrickým polem, takže fragmenty s menším poměrem m/z doletí do detektoru dříve, záznam tedy závisí na času letu iontu, a název tohoto typu spektrometru je tedy Time-of-flight (TOF).

Druhý způsob využívá magnetismus, neboť se dráha nabitých částic v magnetickém poli zakřivuje přímo úměrně jeho intenzitě. Nejčastěji dráhu iontu upravuje proměnlivé magnetické pole mezi tzv. kvadrupólem (obr. 10).



Obrázek 10: Experimentální uspořádání hmotnostního spektrometru s kvadrupólem, vybírajícím postupně ionty ze vzorku. Ostatní ionty se zachytí na stěnách kvadrupólu.

Slovo závěrem

Pokud jste to dočetli až sem, budete se mnou jistě souhlasit, že forenzní chemie používá značné množství metod. Dokonce tolik, že se všechny do dnešního dílu nevešly. Proto si metody spojené s DNA necháme na příště do dílu Krvavé příběhy psané střelným prachem, kde se podíváme podrobněji i na střelivo, výbušniny a požáry. A vy si můžete připravit duběnkový inkoust k falšování Rukopisu Královédvorského podle tohoto dobového postupu:

Opatři stejné váhové množství duběnek a višňové pryskyřice, pryskyřici namoč za dorůstajícího měsíce – 5. nebo 11. dne – do medoviny v množství, které se vejde do tří vaječných skořápek, nebo do vody a nech máčet dva týdny. Duběnký rozluč na prášek a prosej sítím. Pak vezmi nevelké železné desky a v počtu dvaceti nebo třiceti je pomocí provázku upevní na dřívko a zavěs do nádoby (s připravenou tekutinou). Míchej dvakrát denně po dva týdny. Pak přilij tři lžíce vína a dvě lžíce čerstvého medu. Inkoust slíj tehdy, až získá černou barvu, když je nebe čisté a jasné. Vydrží pak dva nebo tři roky i déle.

Ale nejspíš postačí jednodušší návod:

Co nejsilnější vodní vývar z duběnek nebo dubové kůry slijeme v objemovém poměru 1:1 s 2% vodným roztokem chloridu železitého. Dostaneme velmi trvanlivý modročerný inkoust.

Literatura

Hlavní prameny

1. Bell, Suzanne. *Forensic Chemistry*. 1st edition.: Pearson Education, 2006. 614 s. ISBN 0-13-147835-4.
2. LYLE, Douglas. *Forensics for Dummies*. 1st edition.: Wiley Publishing, 2004. 356 s. ISBN 0-7645-5580-4.
3. <http://en.wikipedia.org> – první místo, kam se je většinou vhodné se podívat.

Mikroskopické techniky

4. <http://microscopyu.org> – Nikon Microscopy University
5. <http://micro.magnet.fsu.edu/primer/anatomy/introduction.html> – Úvod do mikroskopie

Spektroskopie

6. <http://ksicht.wz.cz/ksicht/Karchiv.htm> – v první sérii KSICHTu byl seriál o jednotlivých spektroskopických od Pavla Řezanky

Příběh mapy Vinlandu

7. T.A. Cahill, R.N. Schwab, B.H. Kusko, R.A. Eldred, G. Moller, D. Dutschke, D. L. Wick and A.S. Pooley., The Vinland Map, Revisited: New Compositional Evidence on Its Inks and Parchment. *Analytical Chemistry* 59 (1987): 829-833.
8. Donahue, D. J.; Olin, J. S.; Harbottle G. Determination of the Radiocarbon Age of Parchment of the Vinland Map. *Radiocarbon* 44 (2002): 45-52.
9. Brown, K. L. and Clark, R. J. H., Analysis of Pigmentary Materials on the Vinland Map and Tartar Relation by Raman Microprobe Spectroscopy. *Analytical Chemistry* 74 (2002), 3658-3661

Duběnkový inkoust

10. <http://www.livinghistory.cz/modules.php?name=Forums&file=viewtopic&t=627&start=0> – Vše okolo písemnictví na diskuzním fóru tzv. „živé“ historie, tj. rekonstrukce historických pracovních postupů.