

kom. Tomasz Szczepański

specjalista badawczo-techniczny w Zakładzie Daktyloskopii CLKP

Urszula Więckiewicz

specjalista badawczo-techniczny w Zakładzie Daktyloskopii CLKP

asp. Krzysztof Klemczak

asystent w Zakładzie Daktyloskopii CLKP

post. Anna Chyczewska

kursant w Komendzie Rejonowej Policji Warszawa IV

Różnice spektralne fluorescencji produktów reakcji wybranych aminokwasów z DFO, 1,2-indanedione oraz 1,2-indanedione z chlorkiem cynku

Wstęp

Aminokwasy są naturalnymi składnikami substancji tworzącej ślady daktyloskopijne. Typowy aminokwas zbudowany jest z centralnie położonego atomu węgla połączonego z grupą aminową, grupą karboksylową, atomem wodoru i zmiennym łańcuchem bocznym. Pierwsze wzmianki dotyczące zastosowania substancji reagujących z aminokwasami w daktyloskopii datuje się na rok 1954 [1]. Wykorzystano wówczas do ujawniania śladów daktyloskopijnych ninhydrynę – związek chemiczny, który reaguje z grupami aminowymi aminokwasów, dając barwny produkt zwany purpurą Ruhemanna. Wraz z rozwojem techniki i pojawieniem się możliwości wykorzystania bardziej zaawansowanego sprzętu (oświetlacze kryminalistyczne, laser) do barwienia aminokwasów zaczęto używać związków, takich jak DFO i 1,2-indanedione, będących produktami przejściowymi w syntezie pochodnej ninhydryny i dających w reakcji z aminokwasami produkty wykazujące fluorescencję [2, 3, 4, 5]. Przez kolejne lata opracowywano i ulepszano szereg różnych receptur, starając się zoptymalizować metody wizualizacji śladów oparte na reakcji z aminokwasami [6, 7, 8, 9]. Metodę ninhydrynową udało się udoskonalić poprzez kompleksowanie ninhydryny solami cynku lub kadmu. Bazując na tych wynikach, podjęto prace nad zwiększeniem czułości metod fluorescencyjnych. Również w tym przypadku uzyskano pozytywne rezultaty dzięki dodaniu do roztworu ujawniającego 1,2-indanedione odpowiedniej ilości chlorku cynku [10, 11, 12]. W celu poznania podstaw reakcji zachodzących w trakcie ujawniania śladów linii papilarnych prowadzono również badania aktywności optycznej produktów reakcji substancji ujawniających z aminokwasami pod kątem charakterystyki spektralnej [13, 14, 15].

W poniższym opracowaniu przedstawiono charakterystykę spektralną produktów reakcji wybranych diwęglicy aminokwasów z DFO, 1,2-indanedione oraz 1,2-indanedione z $ZnCl_2$ na podłożach chłonnych (papier biurowy, bibuła filtracyjna) w funkcji czasu.

Cel badań

Celem przeprowadzonych badań jest określenie charakterystyk spektralnych fluorescencji produktów reakcji wybranych aminokwasów z DFO, 1,2-indanedione oraz 1,2-indanedione z chlorkiem cynku. Przy określaniu charakterystyk zostanie uwzględniona funkcja czasu. Otrzymane dane pozwolą na określenie dokładniejszych parametrów filtracji widmowej podczas stosowania wyżej wymienionych metod w praktyce.

Materiały i metody

Odczynniki chemiczne

1,8-diazafluoren-9-on (DFO), 1,2-indanedione (IND) otrzymano od BVDA (Holandia). Chlorek cynku, etanol otrzymano od Stanlab (Polska). Alaninę, walinę, lizynę, histydynę, leucynę, treoninę, glicynę, serynę (wszystkie w konformacji L), a także kwas asparaginowy otrzymano od Sigma-Aldrich (Polska). Octan etylu, eter naftowy, metanol, kwas octowy, kwas octowy lodowaty otrzymano od POCH (Polska). Wszystkie odczynniki chemiczne miały czystość analityczną i wykorzystano je bez późniejszego oczyszczania.

Przygotowanie roztworów aminokwasów

Roztwory sporządzano przez rozpuszczenie aminokwasów w demineralizowanej wodzie z wykorzystaniem mieszkadła magnetycznego. Stężenia roztworów dobrano na podstawie informacji zawartych w literaturze i przedstawiono w tabeli 1 [16].

Tabela

Skład wodnych roztworów aminokwasów*Composition of aqueous solutions of amino acids*

Aminokwas	Woda demineralizowana
alanina (Ala) 73 mg	250 ml
kwask asparaginowy (Asp) 37 mg	250 ml
glicyna (Gly) 147 mg	250 ml
histydyna (His) 37 mg	250 ml
leucyna (Leu) 25 mg	250 ml
lizyna (Lys) 98 mg	250 ml
seryna (Ser) 245 mg	250 ml
treonina (Thr) 37 mg	250 ml
walina (Val) 25 mg	250 ml

Źródło: opracowanie własne

Przygotowanie roztworu DFO

W pierwszej kolejności przygotowano roztwór koncentratu DFO. W zlewce rozpuszczono 0,5 g DFO w mieszaninie: 100 ml metanolu, 100 ml octanu etylu i 20 ml kwasu octowego. Wszystkie składniki mieszano na mieszadle magnetycznym, aż do całkowitego rozpuszczenia się DFO. Następnie sporządzono roztwór roboczy przez zmieszanie 22 ml koncentratu DFO z 78 ml eteru naftowego i mieszano przez 15 minut.

Przygotowanie roztworu 1,2-indanedione

W zlewce rozpuszczono 0,5 g 1,2-indanedione w mieszaninie: 5 ml kwasu octowego lodowatego, 45 ml octanu etylu i 450 ml eteru naftowego. Wszystkie składniki mieszano, aż do całkowitego rozpuszczenia się 1,2-indanedione.

Przygotowanie roztworu 1,2-indanedione z chlorkiem cynku

W pierwszej kolejności przygotowano roztwór koncentratu chlorku cynku. W zlewce rozpuszczono 5 g chlorku cynku w mieszaninie: 80 ml metanolu, 80 ml octanu etylu i 10 ml kwasu octowego. Wszystkie składniki mieszano, aż do całkowitego rozpuszczenia się chlorku cynku. Następnie sporządzono roztwór roboczy przez zmieszanie 20 ml koncentratu chlorku cynku z 98 ml eteru naftowego i mieszano za pomocą mieszadła magnetycznego przez 15 minut. W kolejnym etapie przystąpiono do przygotowania roztworu 1,2-indanedione z chlorkiem cynku. W tym celu połączono 10 ml roztworu 1,2-indanedione (receptura opisana powyżej) z 2 ml roztworu roboczego chlorku cynku i mieszano przez 15 minut.

Przygotowywanie próbek

W badaniach wykorzystano typowy papier biurowy o gramaturze 80 g/m² o wysokiej luminescencji podłoża przy wzbudzeniu promieniowaniem UV oraz laboratoryjną bibułę filtracyjną o niskiej luminescencji podłoża przy wzbudzeniu promieniowaniem UV. Z arkuszy papieru i bibuły wycięto kwadraty o długości boku 5 cm. Na powierzchnie kwadratów naniesiono pipetą automatyczną krople roztworów aminokwasów, a następnie pozostawiono do wyschnięcia w temperaturze pokojowej. Próbki rozdzielono na 3 grupy, które przechowywano odpowiednio przez 1 dzień, 7 dni oraz 4 miesiące, w temperaturze pokojowej przy wilgotności względnej ok. 80%. Następnie, po upływie założonych okresów, próbki każdego z aminokwasów (po 5 na kartkach papieru i po 1 na bibule) poddawano procesowi ujawniania roztworami DFO, 1,2-indanedione, 1,2-indanedione z ZnCl₂. Ze względu na stosowanie w procesie produkcji papieru biurowego różnorodnych dodatków, np. wybielaczy optycznych, zdecydowano się badać każdorazowo po 5 próbek papieru, z których następnie wyliczono średnią arytmetyczną oraz odchylenie standardowe. Ponieważ bibuła filtracyjna stanowi podłoże bardziej jednorodne, bez dodatków, do pomiarów na tym podłożu wykorzystano po jednej próbce.

Warunki przeprowadzania reakcji aminokwasów z DFO, 1,2-indanedione, 1,2-indanedione z chlorkiem cynku

Przygotowane próbki podłoży z naniesionymi roztworami aminokwasów, po upływie określonego czasu, poddawano działaniu roztworów ujawniających w postaci aerozolu. Po odparowaniu roztworu próbki umieszczano w wygrzewarce, w temperaturze około 90° C, na 20 minut. Po wygrzaniu próbki poddawano pomiarom emisji fluorescencji.

Pomiary emisyjnych widm fluorescencyjnych

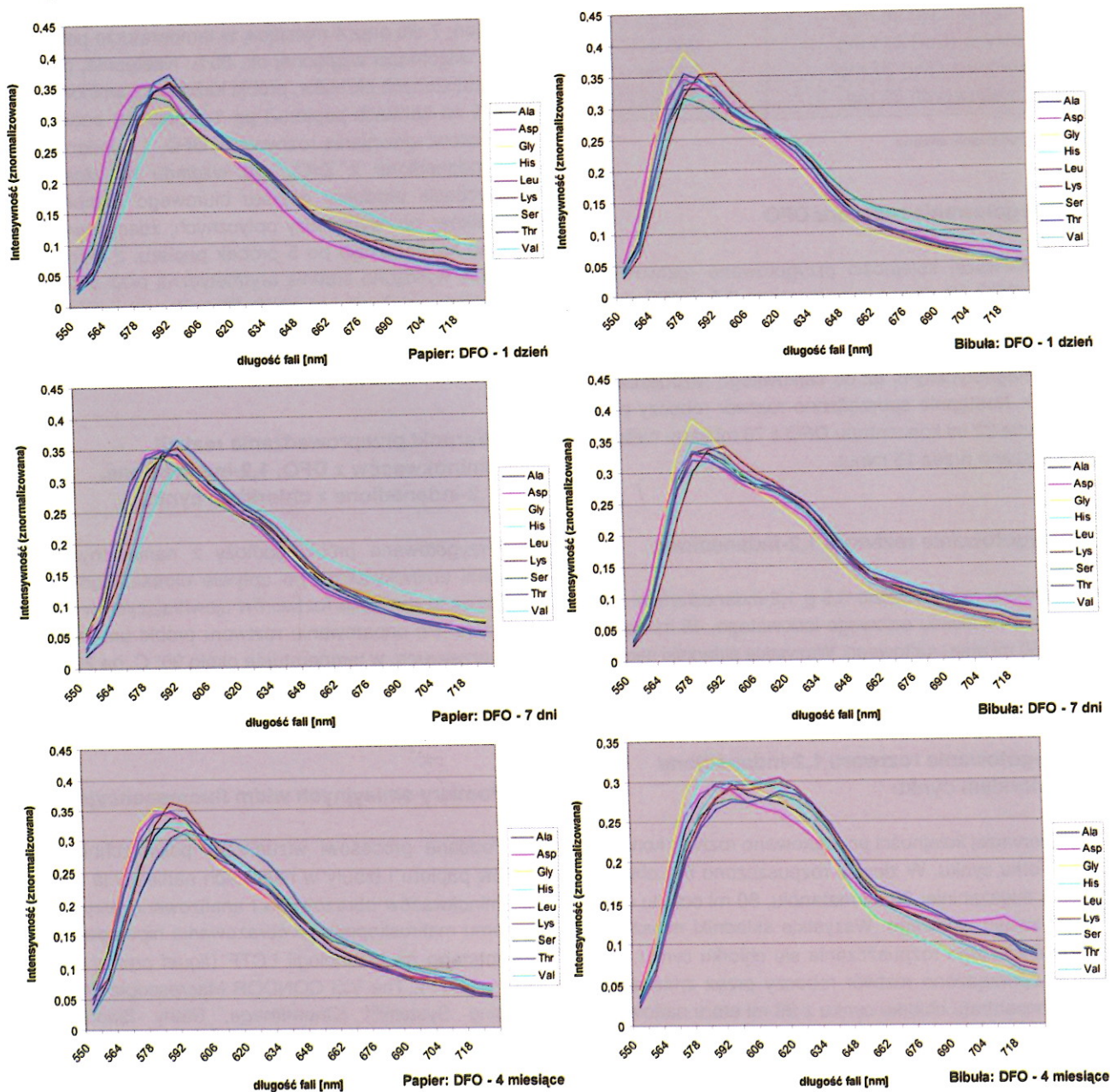
Poddane procesowi wizualizacji powierzchnie kwadratów papieru i bibuły w miejscach naniesienia roztworu aminokwasów obrazowano i analizowano przy użyciu systemu makroskopowego obrazowania hiperspektralnego opartego na technologii LCTF (*liquid crystal tunable filter* – LCTF): The VIS CONDOR Macroscopic Chemical Imaging System™ (ChemImage, Stany Zjednoczone Ameryki). Dane spektralne odczytywano w zakresie pracy systemu 550–720 nm, z rozdzielczością spektralną 7 nm. Luminescencję wzbudzano oświetlaczem kryminalistycznym Mini Crimescope (Ybon, Stany Zjednoczone Ameryki) przy długości fali 515 nm. Zebrane dane poddano normalizacji, wykorzystując oprogramowanie ChemXpert.

Wyniki i dyskusja

Widma luminescencji reakcji aminokwasów z DFO przedstawiono na rycinie 1. Nie stwierdzono wyraźnych różnic w widmach emisyjnych fluorescencji dla poszczególnych aminokwasów, jak również nie stwierdzono wyraźnych różnic wynikających z rodzaju podłoża w postaci papieru biurowego i bibuły filtracyjnej. Jedynie w przypadku próbek naniesionych na bibułę filtracyjną, pozostawionych na 4 miesiące, stwierdzono rozszerzenie pików fluorescencji w kierunku czerwieni.

Próbki w miejscach pomiarów na podłożu w postaci papieru biurowego charakteryzowały się dużą powtarzalnością, co potwierdza obliczone odchylenie standardowe nieprzekraczające maksymalnie wartości: 0,02 (Leu – 1 dzień), 0,05 (Gly – 7 dni), 0,03 (Lys – 4 miesiące).

Otrzymane fluorescencyjne charakterystyki spektralne badanych aminokwasów na papierze i bibule w dużej mierze pokrywają się z danymi otrzymanymi na obojętnym chemicznie podłożu celulozowym do chromatografii cienkowarstwowej TLC [15].



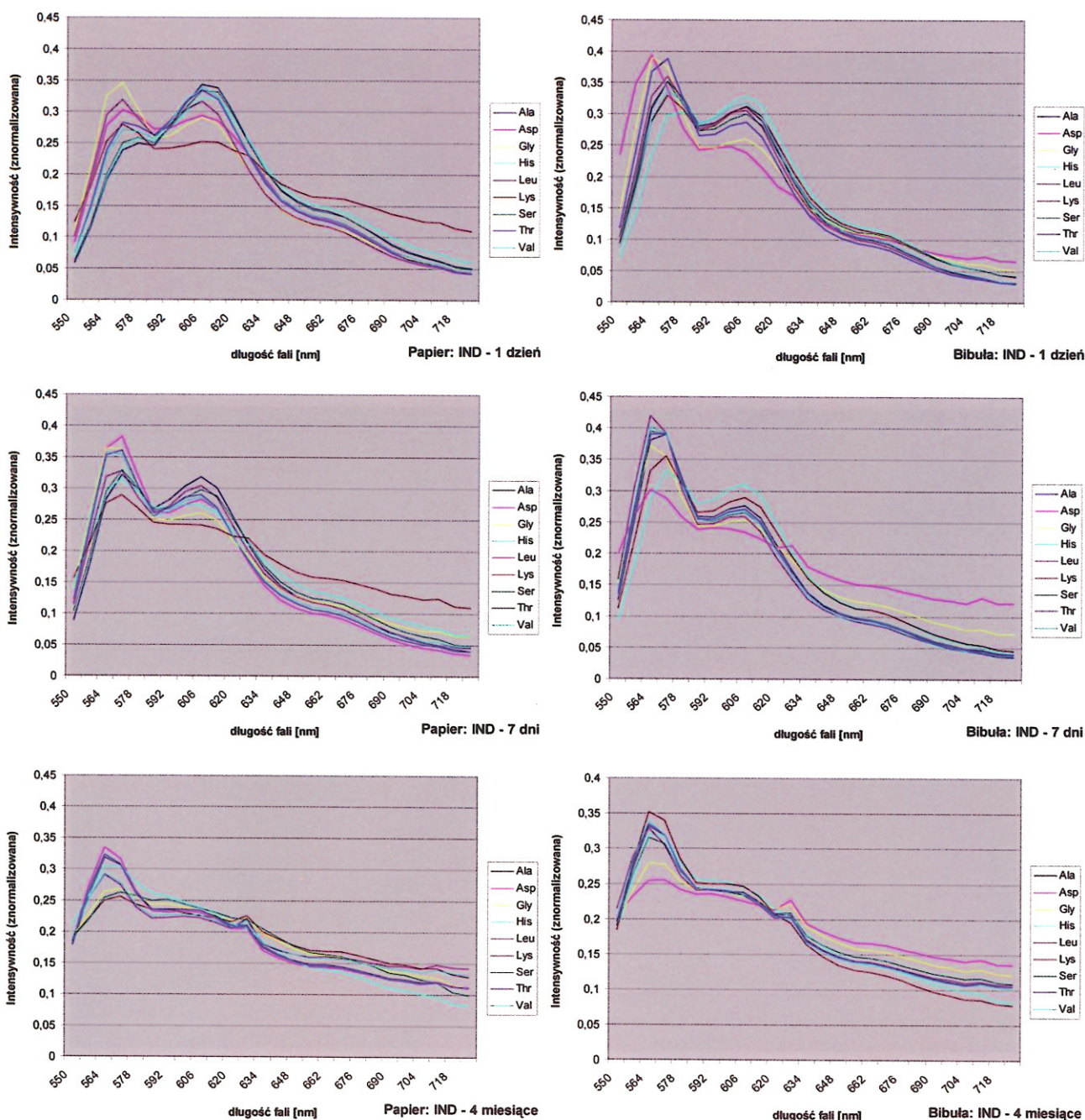
Ryc. 1. Widma luminescencji produktów reakcji dziewięciu aminokwasów z DFO na arkuszach papieru i bibule filtracyjnej – wzbudzenie przy 515 nm
Fig. 1. Luminescence spectra of products of reaction of 9 amino acids with DFO on sheets of paper and filtration paper – 515 nm excitation

Źródło (ryc. 1–3): autorzy

Widma luminescencji reakcji aminokwasów z 1,2-indanedione przedstawiono na rycinie 2. Zauważalne jest spłaszczenie pików w wypadku 1-dniowych i 7-dniowych próbek lizyna–papier oraz asparagina–bibuła. W pozostałych próbkach nie stwierdzono wyraźnych różnic w widmach emisyjnych fluorescencji poszczególnych aminokwasów. Stwierdzono występowanie dwóch wyraźnych, blisko występujących maksimum pików (przy ok. 570 i ok. 610 nm) w wypadku próbek jednodniowych zarówno

papieru, jak i bibuły. Próbkę przechowywane dłużej wykazywały zanikanie pików z maksimum przy około 610 nm. W przypadku próbek przechowywanych przez 4 miesiące pik ten ulegał spłaszczeniu.

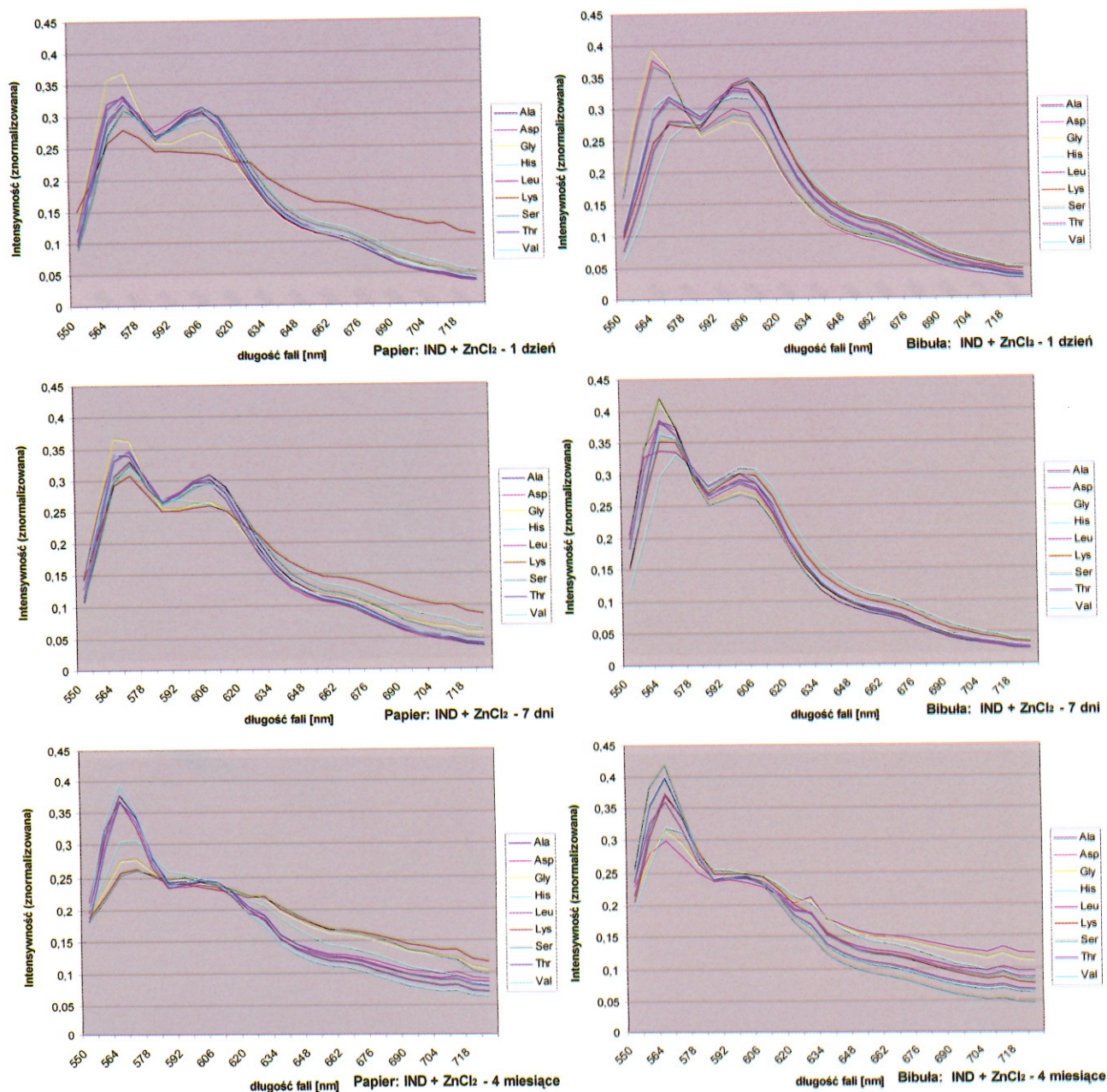
Próbki w miejscach pomiarów na podłożu w postaci papieru biurowego charakteryzowały się dużą powtarzalnością, co potwierdza obliczone odchylenie standardowe nieprzekraczające maksymalnie wartości: 0,04 (Leu – 1 dzień), 0,04 (Leu – 7 dni), 0,04 (Val – 4 miesiące).



Ryc. 2. Widma luminescencji produktów reakcji dziewięciu aminokwasów z 1,2-indanedione na arkuszach papieru i bibule filtracyjnej – wzbudzenie przy 515 nm
Fig. 2. Luminescence spectra of products of reaction of 9 amino acids with 1,2-indanedione on sheets of paper and filtration paper – 515 nm excitation

Widma luminescencji reakcji aminokwasów z 1,2-indanedione z $ZnCl_2$ przedstawiono na rycinie 3. Stwierdzono dwa wyraźne, blisko występujące maksima pików (przy ok. 570 i ok. 610 nm) w wypadku próbek jednodniowych zarówno papieru, jak i bibuły. Próbkę przechowywane dłużej wykazywały zanikanie pików z maksimum przy ok. 610 nm. W przypadku próbek przechowywanych przez 4 miesiące pik ten ulegał wyraźnemu spłaszczeniu. Zauważalne jest spłaszczenie pików w wypadku 1-dniowych próbek lizyna–papier. W wypadku próbek 1-dniowych:

alanina–bibuła, lizyna–bibuła, walina–bibuła i 7-dniowych: alanina–bibuła, glicyna–bibuła, nie stwierdzono wyraźnego zarysowania pików z maksimum przy ok. 570 nm. Należy podkreślić podobieństwo próbek lizyna–papier w odniesieniu do 1,2-indanedione i 1,2-indanedione z $ZnCl_2$. W pozostałych próbkach nie stwierdzono wyraźnych różnic w widmach emisyjnych fluorescencji dla poszczególnych aminokwasów. Zastosowanie w roztworze ujawniającym 1,2-indanedione chlorku cynku wpłynęło na zwiększenie intensywności emisji fluorescencji.



Ryc. 3. Widma luminescencji produktów reakcji dziewięciu aminokwasów z 1,2-indanedione z chlorkiem cynku na arkuszach papieru i bibule filtracyjnej – wzbudzenie przy 515 nm

Fig. 3. Luminescence spectra of products of reaction of 9 amino acids with 1,2-indanedione and zinc chloride on sheets of paper and filtration paper – 515 nm excitation

Próbki w miejscach pomiarów na podłożu w postaci papieru biurowego charakteryzowały się dużą powtarzalnością, co potwierdza obliczone odchylenie standardowe nieprzekraczające wartości maksymalnie: 0,04 (Thr – 1 dzień), 0,03 (Lys – 7 dni), 0,02 (Leu – 4 miesiące).

Dostępne publikacje wskazują na występowanie różnic w widmach próbek na papierze biurowym oraz bibule filtracyjnej. W wypadku próbek dziewięciu aminokwasów przereagowanych z ninhydriną na bibule filtracyjnej oraz płytkach TLC widma absorpcyjne były bardzo zbliżone. Widma otrzymane z próbek przygotowanych z papieru biurowego znacząco się różniły, co może potwierdzać wpływ dodatków w papierze na właściwości spektralne [15]. Zbieżność absorpcyjnych charakterystyk spektralnych otrzymywanych z próbek w postaci celulozowych płytek TLC i bibuły filtracyjnej (obydwu obojętnych chemicznie i niemających aktywności optycznej), pozwala na porównywanie także widm emisyjnych innych substancji. Otrzymane emisyjne widma produktów reakcji DFO i aminokwasów nakładają się na widma przedstawione w literaturze [15].

Wnioski

Otrzymane wyniki wskazują na nieznaczne różnice spektralne produktów reakcji poszczególnych aminokwasów ze wszystkimi badanymi roztworami ujawniającymi. Potwierdza to, że reakcja chemiczna DFO, 1,2-indanedione i 1,2-indanedione z chlorkiem cynku, tak jak w przypadku ninhydriny, zachodzi z grupami aminowymi aminokwasów. Grupa boczna aminokwasów ma niewielki wpływ na charakterystykę spektralną produktu reakcji z badanymi substancjami ujawniającymi.

W przypadku DFO nie stwierdzono znaczących zmian w widmach fluorescencyjnych próbek przechowywanych w badanych przedziałach czasu. Nieznaczne odstępstwo wykazały 4-miesięczne próbki bibuła-DFO, w wypadku których zauważono rozszerzenie widma emisyjnego w kierunku czerwieni.

Widma fluorescencyjne próbek przechowywanych przez 1 dzień, 7 dni i 4 miesiące, poddanych działaniu 1,2-indanedione i 1,2-indanedione z chlorkiem cynku wykazują większe różnice. Próbki dłużej przechowywane miały tendencje do zanikania pików z maksimum przy ok. 610 nm.

Otrzymane dane spektralne wskazują na możliwość stosowania w praktyce tych samych filtrów obserwacyjnych dla metod: DFO, 1,2-indanedione oraz 1,2-indanedione z chlorkiem cynku.

Prace dotyczące przedstawionego zagadnienia będą kontynuowane w kierunku porównań intensywności emitowanej fluorescencji w produktach reakcji badanych związków z wybranymi aminokwasami.

BIBLIOGRAFIA

- Oden S., von Hofsten B.: Detection of Fingerprints by the Ninhydrin Reaction, „Nature”, 173 (1954) 449–450.
- Grigg R., Mongkolaussavaratana T., Pounds C.A., Sivagnanam S.: 1,8-Diazafluoren-9-one and related compounds. A new reagent for the detection of alpha amino acids and Latent Fingerprints, „Tetrahedron Letters”, 31, 49 (1990) 7215–7218.
- Grigg R., Mongkolaussavaratana T., Pounds C. A., Sivagnanam S.: The use 1,8-Diazafluoren-9-one (DFO) for the fluorescent detection of latent fingerprint on paper. A preliminary investigation, „Journal of Forensic Sciences”, 35, 1 (1990) 169–175.
- Ramotowski R., Cantu A.A., Joullie M.M., Petrovskaia O.: 1,2-Indanediones: A preliminary evaluation of a new class of amino acid visualising reagents, „Fingerprint Whorld”, 23, 90 (1997) 131–140.
- Hauze D.B., Petrovskaia O., Taylor B., Joullie M.M., Ramotowski R., Cantu A.A.: 1,2-Indanediones: new reagents for visualizing the amino acid components of latent prints, „Journal of Forensic Sciences”, 43, 4 (1998) 744–747.
- Merrick S., Gardner S., Sears V.G. and Hewlett, D.F.: An operational trial of ozone-friendly DFO and 1,2-indandione formulations for latent fingerprint detection, „Journal of Forensic Identification”, 52, 5, (2002) 595–605.
- Didierjean C., Debart M.H., Crispino F.: New formulation of DFO in HFE-7100, „Fingerprint Whorld”, 24, 94, (1998) 163–167.
- Hardwick S., Kent T., Sears V., Winfield, P.: Improvements to the formulation of DFO and the effects of heat on the reaction with latent fingerprints, „Fingerprint Whorld”, 19, 73 (1993) 65–69.
- Bickell D.E., Ramotowski R.S.: Use of an optimised 1,2-indanedione process for the development of latent prints, „Journal of Forensic Sciences”, 53, 5 (2008) 1–9.
- Conn C., Ramsey G., Roux C., Lennard C.: The effect of metal salt treatment on the photoluminescence of DFO-treated fingerprints, „Forensic Science International”, 116, 2 (2001) 117–123.
- Sears V., Batham R., Bleay S.: The effectiveness of 1,2-indandione-zinc formulations and comparison with HFE-based 1,8-diazafluoren-9-one for fingerprint development, „Journal of Forensic Identification”, 59, 6 (2009) 654–678.
- Stoilovic M., Lennard C., Wallace-Kunkel C., Roux C.: Evaluation of a 1,2-indanedione formulation containing zinc chloride for improved fingermark detection on paper, „Journal of Forensic Identification”, 57, 1 (2007) 4–18.
- Wilkinson D.: A study of the reaction mechanism of 1,8-diazafluoren 9-one with the amino acid L-alanine, „Forensic Science International”, 109, 2 (2000) 87–102.
- Cantu A.A., Leben D.A., Joullie M.M., Heffner R.J., Hark R.R.: A comparative examination of several amino

acid reagents for visualising amino acid (glycine) on paper, „Journal of Forensic Identification”, 43, 1 (1993) 44–67.

15. Spindler X., Stoilovic M., Lennard C., Lennard A.: Spectral variations for reaction products formed between different amino acids and latent fingerprint detection reagents on a range of cellulose-based substrate, „Journal of Forensic Identification”, 59, 3 (2009) 308–324.

16. Schwarz L.: An amino acid model for latent fingerprints on porous surfaces, „Journal of Forensic Sciences”, 54, 6 (2009) 1323–1326.

Streszczenie

W artykule przedstawiono charakterystykę widmową fluorescencji produktów reakcji wybranych dziewięciu aminokwasów z DFO, 1,2-indanedione oraz 1,2-indanedione z chlorkiem cynku. W badaniach wykorzystano podłoża chłonne w postaci arkuszy papieru biurowego i bibuły filtracyjnej. Badaniom poddano próbki przechowywane w trzech przedziałach czasowych. Dane spektralne otrzymano przy wykorzystaniu systemu makroskopowego obrazowania hiperspektralnego. Otrzymane wyniki potwierdzają, że reakcja chemiczna DFO, 1,2-indanedione i 1,2-indanedione z $ZnCl_2$ zachodzi z grupami

aminowymi aminokwasów. Grupa boczna aminokwasów w niewielkim stopniu wpływa na charakterystykę spektralną. Stwierdzono różnice w charakterystyce widmowej emitowanej fluorescencji badanych próbek w funkcji czasu.

Słowa kluczowe: DFO, 1,2-indanedione, 1,2-indanedione z $ZnCl_2$, obrazowanie hiperspektralne, aminokwasy, powierzchnie chłonne

Summary

The paper presents fluorescence spectral characteristics of reaction products of chosen nine amino acids with DFO, 1,2-indanedione and 1,2-indanedione with zinc chloride. Absorptive substrates, such as sheets of paper and filtration paper were used in examination. The examination involved samples, which were stored over three time intervals. Spectral data were obtained with the use of macroscopic hyperspectral imaging system. Findings confirm that a chemical reaction between DFO, 1,2-indanedione and 1,2-indanedione + $ZnCl_2$ takes place with amino groups of amino acids. A pendant group of amino acids only slightly influences the spectral characteristics. The authors concluded on the differences in spectral characteristics of the fluorescence emitted from examined samples over time.

Keywords: DFO, 1,2-indanedione, 1,2-indanedione + $ZnCl_2$, hyperspectral imaging, amino acids, absorptive surfaces