

POLICEJNÍ AKADEMIE ČESKÉ REPUBLIKY V PRAZE

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

POLICEJNÍ AKADEMIE ČESKÉ REPUBLIKY V PRAZE

Fakulta bezpečnostně právní

Katedra kriminalistiky

Nové metody kriminalistické chemie pro zkoumání

mikrostop

Bakalářská práce

New Methods of Criminalistic Chemistry for Microtraces Examination

Bachelor thesis

VEDOUCÍ PRÁCE

doc. Ing. Suchánek Jaroslav, CSc.

AUTOR PRÁCE

Mgr. Kateřina Syrová

PRAHA 2022

## Čestné prohlášení

Prohlašuji, že předložená práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně. Veškerou literaturu a další zdroje, z nichž jsem čerpala, v práci řádně cituji a jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

V Praze, dne 15. 3. 2022

Mgr. Kateřina Syrová

## Poděkování

Ráda bych poděkovala doc. Ing. Jaroslavu Suchánkovi CSc. za jeho věcné připomínky při vypracování bakalářské práce. Také bych chtěla poděkovat Ing. Martinovi Kuchařovi, Ph.D. z Laboratoře forenzní analýzy biologicky aktivních látek VŠCHT za jeho cenné rady.

## ANOTACE

Tato bakalářská práce rozebírá otázku nových metod kriminalistické chemie v oblasti zkoumání mikroskopického důkazního materiálu. Nejprve začíná stručným přiblížením vývoje a popisem této disciplíny. Následuje detailnější charakteristika kriminalistických mikrostop významných z hlediska jejich četnosti i specifity a posléze se zaměřuje na hlavní téma, kterým je zevrubný popis mechanismu a také výhod a nevýhod jednotlivých recentně hojně využívaných a stěžejních metod kriminalistické chemie. Závěr práce kriticky zhodnocuje význam a spolehlivost jednotlivých metod.

### KLÍČOVÁ SLOVA:

mikrostopy, kriminalistická chemie, chemická analýza, elektronová mikroskopie, spektrometrie, chromatografie

## ANNOTATION

This bachelor thesis discusses the issues of new methods of forensic chemistry in the field of examination of microscopic evidence. It begins with a brief overview of the development and description of this discipline. The thesis further deals with a more detailed characteristics of forensic microtraces, important in terms of their frequency and specificity and then it focuses on the main topic, which is a detailed description of the mechanism, as well as the advantages and disadvantages of individual recently abundant and key methods of forensic chemistry. The conclusion critically evaluates the importance and reliability of individual methods.

### KEYWORDS:

microtraces, forensic chemistry, chemical analysis, electron microscopy, spectrometry, chromatography

# OBSAH

ÚVOD.....	7
1. KRIMINALISTICKÁ CHEMIE.....	8
2. MIKROSTOPY .....	10
2.1. Definice mikrostop.....	10
2.2. Historie mikrostop.....	11
2.3. Dělení mikrostop.....	11
2.4. Zásady práce s mikrostopami.....	12
2.5. Manipulace s mikrostopami .....	13
2.6. Druhy mikrostop .....	13
2.6.1. Termogenetické částice .....	13
2.6.2. Nátěrové hmoty.....	17
2.6.3. Léčiva a drogy.....	17
2.6.4. Zeminy .....	21
2.6.5. Polymery a vlákna.....	21
3. Metody zkoumání mikrostop.....	24
3.1. Skenovací elektronová mikroskopie .....	25
3.1.1. Princip SEM .....	25
3.1.2. Mechanismus SEM .....	25
3.1.3. Zpracování vzorků .....	26
3.1.4. Výhody a nevýhody SEM.....	26
3.1.5. SEM s energiově disperzní rentgenovou spektrometrií.....	27
3.1.6. SEM s vlnově disperzní spektrometrií .....	28
3.2. Rentgenová fluorescenční spektrometrie .....	29
3.2.1. Princip metody .....	29
3.2.2. Výhody a nevýhody XRF .....	30
3.3. Rentgenová difrakční spektrometrie .....	30
3.3.1. Princip metody .....	30
3.3.2. Výhody a nevýhody XRDS.....	30
3.4. Infračervená spektrometrie.....	31
3.4.1. Princip metody .....	31
3.4.2. Techniky měření spekter pevných vzorků .....	31

3.4.3.	Výhody a nevýhody IR spektrometrie .....	32
3.4.4.	Infračervená spektrometrie s Fourierovou transformací.....	33
3.4.5.	Blízká infračervená spektrometrie.....	33
3.5.	Ultrafialovo-viditelná spektrometrie.....	33
3.5.1.	Princip metody .....	33
3.5.2.	Příprava vzorku.....	34
3.5.3.	Výhody a nevýhody UV/VIS spektrometrie .....	35
3.6.	Ramanova spektrometrie .....	35
3.6.1.	Princip metody .....	35
3.6.2.	Výhody a nevýhody Ramanovy spektrometrie .....	36
3.7.	Mikrospektrofotometrie .....	37
3.8.	Plynová chromatografie .....	37
3.8.1.	Princip metody .....	37
3.8.2.	Výhody a nevýhody plynové chromatografie .....	39
3.9.	Kapalinová chromatografie.....	39
3.9.1.	Vysokoučinná kapalinová chromatografie.....	40
3.10.	Chromatografie na tenké vrstvě .....	41
3.11.	Hmotnostní spektrometrie .....	42
3.11.1.	Princip hmotnostní spektrometrie .....	42
3.11.2.	Výhody a nevýhody MS .....	44
4.	Kritické zhodnocení metod ve zkoumání mikrostop .....	44
5.	Závěr .....	47

## ÚVOD

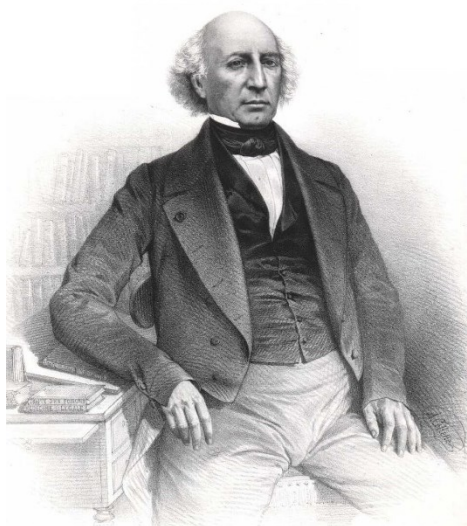
Rané počátky chemie by se mohly hledat už v dobách dávné historie. Schopnost ovládnout oheň naším předchůdcem *Homo erectus* před milionem let byla jistou formou chemických znalostí, i když spíše ryze intuitivních. Rané civilizace spíše zkoušely metodu pokus – omyl a zkušenosti byly poté pečlivě předávány dál. Mnoho tisíciletí po vynálezu ohně pak důkazy extrakce kovů z rud nebo tvorba keramiky, fermentace alkoholických nápojů, tvorba parfémů a mýdel ukazovaly na daleko sofistikovanější znalosti moderního člověka. Byli to Řekové v dobách přibližně 2500 let před naším letopočtem, kdo jako první ustanovil koncept systematické vědy a logické návaznosti experimentálních výsledků. Základy forenzních věd ale položili starověcí Římané, doba císařů se koneckonců nechvalně proslavila specifickým způsobem vraždy – otravou. Tehdy se případy náhlých úmrtí s podezřelým nápojem poblíž řešily jednoduše, ovdovělým jedincům se dal vypít vlastní nápoj. Spoléhalo se často na výpovědi, přísahy a doznání. Zajímavý je patrně první příklad forenzní odontologie, kdy Agrippina mladší, žena císaře Claudia a matka pozdějšího císaře Nerona, podle zubních pozůstatků v roce 49 n. l. identifikovala tělo bývalé ženy předchozího císaře Caliguly, Lollie Pauliny.

Průkopníkem moderní forenzní metodiky byl španělský chemik Mathieu Orfila v 18. – 19. století. Slavný případ Francouzky Marie Lafarge, která otráвила svého muže arsenem, by bez něj nejspíše skončil nevyřešen, ale jeho precizní postup a komparace exhumované tělesné tkáně se vzorkem hlíny z místa hrobu dokázaly travičku usvědčit. Další důležitý milník se udál v roce 1892, kdy byl oficiálně zveřejněn postup pro klasifikaci otisků prstů – tedy počátek daktyloskopie.

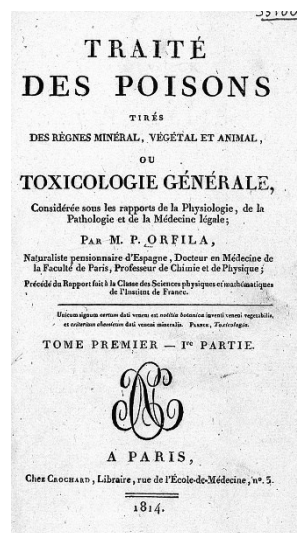
Dosud nejzásadnějším pokrokem v kriminalistice byl zrod metody analýzy lidské DNA. Sir Alec Jeffreys vyvinul tuto metodu a prvně ji použil roku 1984 v případě znásilnění a vraždy dvou patnáctiletých dívek a byl schopen určit, že vzorky spermatu z obou míst činu se geneticky shodovaly.



V posledních pár desetiletích jsou realizovány metody analýzy forenzních vzorků využívající nejnovějších a velmi sofistikovaných přístrojů, které kladou velké nároky na finance, čas a neposledně na preciznost lidského faktoru, a nezbyvá než se vzrušením čekat, co za fascinující nové techniky přinese blízká budoucnost.



Obr. 1: Mathieu J. B. Orfila



Obr. 2: Pojednání o jedech M. J. B. Orfily

## 1. KRIMINALISTICKÁ CHEMIE

Kriminalistická chemie je obor aplikované analytické chemie pojící dva zdánlivě vzdálené světy – oblast vědy a práva. Zahrnuje nejen kvalitativní a kvantitativní analýzu, ale také klíčový prvek analýzy komparativní. Běžně se dělí na kriminalistickou chemii a toxikologii, avšak je to spíše tradiční rozdělení z historie. Toxikologové vyžadují nadstandardní znalost v toxikologii a farmakologii a pracují spíše s biologickými vzorky, jako jsou drogy nebo jedy. Obě expertízy nicméně vyžadují vysokou odbornost v analytických a instrumentálních metodách.

Definice kriminalistické chemie podle Musila, Konráda a Suchánka (2001)

zní následovně: „*Kriminalistická chemie se zabývá zkoumáním vlastností, složení, vnitřní stavby a přeměny nejrůznějších látek, které se vyskytují v kriminalistické praxi. Počet těchto látek je obrovský a nelze úplně vyjmenovat všechny úkoly, které kriminalistická chemie řeší. Jde např. o zjišťování technických příčin požárů, zkoumání nátěrových hmot, toxikologická zkoumání, zkoumání léčiv a drog, zkoumání motorových pohonných hmot a mazadel, zkoumání vody, zkoumání ochranných prostředků používaných v zemědělství, zkoumání příčin a následků ekologických havárií apod.*“<sup>[1]</sup>

Forenzní chemici pracují převážně se vzorky inkoustu, barviv, reziduí po požárech, povýstřelových zplodin, částic prachu, exploziv, polymerů a skla.

V případě, že forenzní chemik (anebo expert z jiné oblasti) obdrží důkazní materiál, je zapotřebí provést tři kroky: identifikaci, klasifikaci a individualizaci. Identifikace zahrnuje proces kvalitativní a někdy také kvantitativní identifikace, tedy např. analýzu vláken. Klasifikace je detailnější určení materiálu, týkající se délky polymerových řetězců obsažených ve vzorku, jeho barvy, průřezu nebo stáří. Čím více otázek je expert schopen zodpovědět, tím více se zužuje pole možností, kam vzorek spadá. Posledním krokem je individualizace, což znamená naprosto přesné určení vzorku.

Forenzní analýza je obvykle proces zužování možností, je tedy potřeba zvolit systematický postup examinace od kvalitativních presumptivních testů po následnou přímou analýzu. Presumptivní testy spočívají ve vizuálním nebo mikroskopickém pozorování a posuzuje se např. vzhled, barva, tvrdost nebo tvar vzorku (tzv. analýza na suché cestě), ale také mohou využívat chemická činidla – tzv. analýza na mokré cestě. Slouží ke zkoumání vzorků drog, povýstřelových reziduí nebo exploziv. Jedná se o přesnější metody, určuje se pH, koncentrace, konduktance, hustota, viskozita a jiné specifické vlastnosti vzorku. Spadají sem např. gravimetrie, kolorimetrie nebo titrace.<sup>[2]</sup>

---

[1] Musil, Jan, Konrád, Zdeněk a Suchánek, Jaroslav. *Kriminalistika*. Vydání první. Praha: C. H. Beck, 2001. 512 stran. ISBN 9788071793625.

Po analýze potenciálních komponent nastává separace a izolace cílových komponent. Zde je typickou metodou chromatografie na tenké vrstvě (thin-layer chromatography, TLC) využitelnou např. při zkoumání inkoustů nebo drog. Následuje detailnější infračervená spektrofotometrie nebo plynová chromatografie s hmotnostní spektrometrií (gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS). [2]

Není bez zajímavosti, že většina materiálu nevyžaduje zevrubnou charakterizaci. Cílí se např. na určení ilegální drogy ve vzorku, identifikace rozpouštědla už nutná není. Kriminalisté tak šetří čas, peníze a zdroje.

## 2. MIKROSTOPY

### 2.1. Definice mikrostop

Mikrostopy tvoří významnou skupinu stop zajištěných na místech činu, protože pachatelé se na místě činu často cíleně vyhýbají tvorbě běžných kriminalistických stop nebo se již vytvořené stopy snaží zničit, což bývá důsledek neustále se zvyšujících kriminalistických znalostí pachatelů (obzvláště v případech předem připravovaných trestných činů). Jsou náročné na odběr i analýzu. Vše zahrnující definice mikrostop podle Strause, Suchánka a Porady zní: *„Mikroskopické stopy neboli mikrostopy jsou kriminalisticko-technické stopy, které pro své nepatrné geometrické rozměry, malé množství hmoty, nízkou koncentraci na nebo v nositeli, malou změnu ve struktuře nositele nebo malý odraz funkčních a dynamických vlastností jsou prostým okem slabě viditelné nebo neviditelné a pro účely vyhledávání nebo fixace nebo zajišťování nebo zkoumání nebo vyhodnocování vyžadují použití současných špičkových metod a prostředků. Vznikají bez vědomého působení pachatele a jsou tak nepatrné a obtížně pozorovatelné, že uniknou jeho pozornosti.“* [3]

---

[3] Straus, Jiří, Suchánek, Jaroslav, Porada, Viktor. *KRIMINALISTICKÉ STOPY OBSAHUJÍCÍ INFORMACI O VLASTNOSTECH VNITŘNÍ STAVBY (STRUKTURY) NEBO VNITŘNÍHO SLOŽENÍ OBJEKTU* [online]. Policejní akademie ČR Praha, c2004 [cit. 2022-02-24] Dostupné z: <http://www.sinz.cz/archiv/docs/si-2004-03-131-145.pdf>

## 2.2. Historie mikrostop

První zmínky o mikrostopách a jejich praktické využití můžeme vysledovat již z období zrodu moderní kriminalistiky, prvně tento termín použil rakouský soudce a univerzitní profesor Hans Gross, známý jako „otec kriminalistiky“. Popisuje je jako drobné částičky, které mohou být zachyceny na předmětu zkoumání. Intenzivnější nárůst snahy pachatelů po 2. světové válce neponechat na místě činu žádný důkazní materiál, popř. ho zničit, vyvinul tlak na nové metody, postupy a operace, díky kterým by bylo možné vyhledávat, zajišťovat, analyzovat a vyhodnocovat i mikrostopy. Už tehdy se předpokládalo, že neexistuje dokonalý trestný čin bez důkazního materiálu, resp. změn majících charakter kriminalistických stop – v teorii jde o tzv. Locardův princip výměny tvrdící, že při kontaktu mezi dvěma body bude vždy probíhat výměna materiálu (buť jen mikroskopického).

Oficiální uznání mikrostop jako plně využitelného důkazního materiálu se událo roku 1972 na mezinárodním kriminalistickém sympoziu ve Varšavě a definitivně roku 1973 na sympoziu v Berlíně. Velký rozvoj výzkumu mikrostop přišel s vývojem pokročilejších laboratorních metod, primárně skenovacího elektronového mikroskopu (SEM), infračervené spektrofotometrie a hmotnostní spektrometrie.

## 2.3. Dělení mikrostop

Dělení mikrostop je velmi různorodé, dají se dělit např. z hlediska jejich stálosti na mikrostopy stálé, poměrně stálé, nestálé a zcela nestálé. Čím nestálější jsou mikrostopy, tím větší význam má včasné odebrání a zkoumání vzorků. <sup>[3]</sup>

Dále se mikrostopy konvenčně dělí podle náchylnosti na působení externích vlivů. Obecně působící externí vlivy se vyskytují v podstatě u všech mikrostop a působí od vzniku až po konec analýzy mikrostop. Selektivně

působící externí vlivy se vyskytují většinou pouze u konkrétních druhů mikrostop. Tyto vlivy působí ve třech časově odlišitelných obdobích, během kterých vznikají změny negativně ovlivňují informační hodnotu mikrostop. Zaprvé změny neovlivnitelné a existující již v době vzniku mikrostopy (tzv. „primární znečištění“: neúplné vrstvy nátěrových systémů, znečištěná vlákna, přítomnost toxických látek v moči atp.). Zadruhé změny vytvořené v době od vzniku mikrostopy po její zajištění („sekundární znečištění“: biologický rozklad, koroze), kterým jde alespoň částečně zamezit včasným a důsledným ohledáním místa činu a rychlým zajištěním mikrostop. Poslední časový úsek vzniku změn je v době od zajištění po vyhodnocení mikrostop („terciární znečištění“: nesprávný pracovní postup, nečisté laboratorní nástroje, nepřesnost práce). Těmto změnám se dá naprosto předejít správnou manipulací. [3]

Podle organizace jejich hmoty je lze dělit samostatné útvary v pevné formě a na materiály, které nezaujímají pevný tvar (tekutina, prášek). Můžeme je dělit i na základě druhu trestné činnosti, např. z hlediska terorismu na mikrostopy, které vznikají během ilegální tvorby, získání, uložení nebo prodeje výbušnin, na mikrostopy vzniklé těsně před explozí a na ty vzniklé po výbuchu. [4]

#### 2.4. Zásady práce s mikrostopami

Během procesů vyhledávání, zajišťování a převozu mikrostop existují tři zásady. Zásada optimálnosti hovoří o důležitosti vyhledávání a zajišťování mikrostop z míst nejpravděpodobnějšího kontaktu s osobami nebo věcmi spojenými s trestnou činností. Zásada priority zdůrazňuje nutnost zajistit a místě činu mikrostopy přednostně z důvodu možného zanesení nežádoucích změn na místě činu během procesu ohledávání. Zásada efektivity popisuje podmínky zhodnocení, zda v konkrétním případě mikrostopy vyhledávat a zajišťovat. [3]

## 2.5. Manipulace s mikrostopami

Procesy odebírání vzorků z místa činu zahrnují sbírání (vlákna), zvedání (adhezivním substrátem jako je lepící páska – prach, pyly), seškrabávání (krevní skvrny, rezidua barev), vysávání, stříhání (potenciální stopy např. za nehty) a vyčesání (stopy z vlasů apod.). Co se týče výbavy, pro nalezení a odebrání mikrostop jsou nutné různé klasické i alternativní světelné zdroje (UV, lasery), standardní optická pomůcka v podobě lupy a řada laboratorních nástrojů jako pinzety, kopistě a jehly. K zachycení mikrostop v laboratoři (např. na oděvu) jsou vhodné binokulární stereoskopické mikroskopy nebo zdroje ultrafialového záření. K zajištění mikrostop při ohledání místa činu slouží transparentní daktyloskopické fólie nebo transparentní lepící pásky. V laboratoři lze použít speciálně upravený vysavač umožňující vysátí vzorků z obtížně přístupných míst. K analýze se mikrostopy zasílají podobně jako jiné stopy. [3, 5]

## 2.6. Druhy mikrostop

Mikrostopy mají původ v širokém spektru materiálů, prominentní jsou fragmenty textilních vláken, skel, zeminy, cementu, uhlí, brusných materiálů, vlasů, termogenetické částice (povýstřelové a povýbuchové zplodiny, částice z airbagů), průmyslové prachy, částice nátěrových hmot a pigmentů. [3] Dalšími, spíše atypickými mikrostopami mohou být dále kovové nebo dřevěné piliny, pylová zrna nebo fragmenty hmyzu. Anorganická analýza a mikroanalýza zkoumá výbušniny, neznámé nebo nebezpečné látky, jedy, rezidua z žárovek atd. Organická analýza zahrnuje zkoumání syntetických a přírodních drog a léčiv. [6]

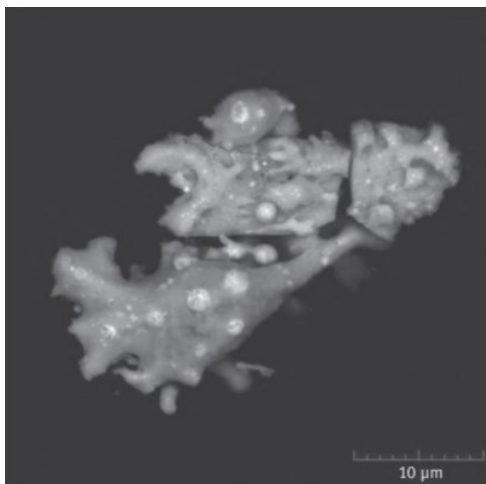
### 2.6.1. Termogenetické částice

Do této skupiny patří hlavně povýstřelové zplodiny (gunshot residue,

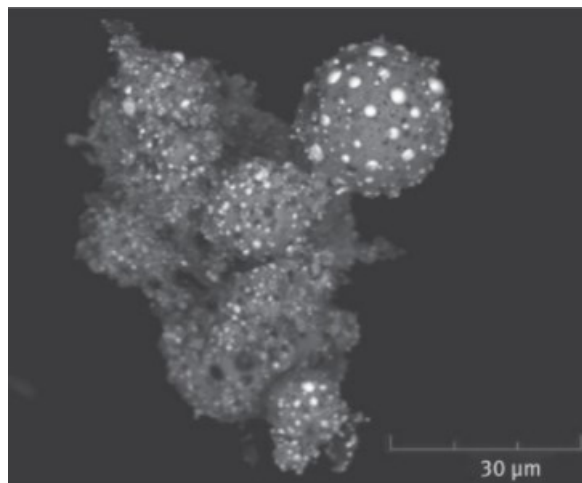
GSR), povýbuchové zplodiny (post blast residue, PBR) a částice vzniklé aktivací airbagů.

### Povýstřelové zplodiny

GSR jsou velmi hodnotnými stopami z důvodu naprosto specifických chemických a fyzikálních vlastností. Mohou mít formu plynného, kapalného i pevného produktu. Anorganické vzorky zahrnují charakteristické kovové částice iniciátoru, k jejichž analýze stačí doslova pár částic (množství nad 100 pg). Tradiční střelivo obsahuje typicky různou kombinaci tří těžkých kovů: olova, antimonu a baria (Pb-Sb-Ba). Další možná kombinace je barium, vápník a křemík (Ba-Ca-Si), v případě identifikace těchto šesti prvků lze s vysokou pravděpodobností určit původ vzorku ve výstřelu z palné zbraně.



Obr. 3: Vzorek GSR s PbSbBa.



Obr. 4: GSR s PbCaBaSi.

GSR mohou obsahovat také prvky z nábojnice jako měď, nikl, zinek, železo atd. Kinetika procesu exploze a následné rychlé ochlazení kapek roztáté směsi kovů jsou specifickými ukazateli. [7]

GSR lze zajistit 5 následujícími způsoby:

- ruce, tváře, menší hladké plochy: terčíky s hliníkovou adhezní vrstvou
- větší, zahnuté, drsné plochy: stěr vatovým tamponem
- velké plochy ve volném terénu: speciální vysavač s nástavcem ELAVAK
- vlasy, vousy: hřeben s vpletenou gázou navlhčenou lihem

- vzorky *in natura*: do laboratoře tak, jak jsou, v polyetylenovém pytli [8]

Pro analýzu GSR se volí hlavně metoda SEM/EDX (viz dále).

### Povýbuchové zplodiny

PBR jsou nevybuchlé submikroskopické částice, které během výbuchu nezreagovaly nebo se nerozložily. Oproti produktům vzniklým během exploze (výpary, anorganické soli) mají právě PBR velký kriminalistický význam. Tyto mikročástice mohou poskytnout důležité informace o chemickém složení a tím určit původ výbušniny – průmyslovou výrobu nebo nelegální výrobu po domácku, jestli pochází z tuzemské výroby nebo z ciziny, nebo jestli jsou přímo spojené s nějakou zločineckou organizací. Nevybuchlé částice se nemusí vždy podobat původní struktuře výbušniny, po zchlazení se roztavené výbušniny mohou dokonce výrazně morfologicky změnit. I přesto jsou ale velmi charakteristické pro konkrétní výbušninu. [9]

Exploze nastává po rychlém sledu silně exotermických reakcí s nárůstem entropie. Zážehem chemikálií ve výbušnině externím stimulem (tření, žár, šok) se zvýší teplota výbušniny, až se začnou tvořit lokalizovaná místa, tzv. „hotspots“. Principem jejich vzniku je adiabatická komprese malých plynových bublin, tření mezi povrchy částic výbušniny, anebo zhroucení okolního materiálu. Při tepelném rozkladu se z reaktantů vytvoří velmi stabilní atomy plynů jako oxid uhelnatý (CO), oxid uhličitý (CO<sub>2</sub>) a dvojdusíkaté molekuly. [9]

Doteď se přesně neví důvod nedokonalosti spalovacího procesu při výbuchu, PBR ale nejpravděpodobněji pocházejí z povrchové vrstvy výbušniny. Množství PBR je proměnlivé na základě velikosti nálože, průměru, rychlosti detonace a množství styčných ploch v náloži. Větší nálože nejspíše tvoří méně PBR v poměru s menšími náložemi, protože množství reziduí bude podle teorie proporční velikosti povrchu nálože. Rychlejší exploze patrně produkují méně PBR. [9]

Existují dvě teorie distribuce PBR. Jedna říká, že distribuce PBR, které ulpěly na fragmentech, záleží na pohybu fragmentů. Rychlost fragmentů je



specifická pro obsah výbušnin a hraje v ní klíčovou roli distribuce energie mezi kovovým obalem a detonačními plyny. Druhá teorie popisuje šíření PBR stejnou rychlostí, nezávisle na obsahu nálože. [9]

Extrémní teplota při výbuchu může také zapříčinit odpaření a následnou kondenzaci PBR po okolních předmětech, odkud mohou být také odebrány a analyzovány.

Při analýze PBR hrají významnou roli tzv. microtaggants – částice sloužící jako markanty konkrétních výbušnin. Využitelné jsou jak při detekci přítomnosti (nevybuchlé) výbušniny a k identifikaci výbušniny po explozi. [10]

K detekci přítomnosti výbušniny slouží těžké plynné sloučeniny, které se postupně odpařují a jsou tedy detekovatelné ve vzduchu. V mnoha zemích je jejich příměs vyžadována. Existují čtyři markery: 2,3-dimethyl-2,3-dinitrobutan (DMDNB), používaný ve Spojených státech amerických, ethylenglykoldinitrát (EGDN), orto-mononitrotoluen (o-MNT) a para-mononitrotoluen (p-MNT). Pro analýzu těchto markerů se využívají iontové mobilní spektrometry a speciálně vycvičení psi. [10]

K identifikaci výbušniny po explozi slouží nejčastěji polymerní nebo kovové mikročástice, které musí přežít explozivní děj v nezměněném stavu. Jsou to mnohvrstevnaté a mnohobarevné částičky na první pohled připomínající pepř, ale jsou až z 10 vrstev melaminu s magnetickými vrstvami. Jejich barevné kombinace slouží jako unikátní identifikátor původu (místo výroby, várka, datum atd.). [11]

#### Částice vzniklé aktivací airbagů

Aktivované airbagy samozřejmě přichází do kontaktu s těly a oblečením posádky vozidla za přenosu pevných částic – mohou to být vlasy, vlákna nebo obtisky airbagů na pasažérech. Z těchto stop lze např. určit, kdo byl řidičem a kdo spolujezdcem. Zdrojem anorganických mikrostop přímo z airbagů auta jsou chemikálie z plynového generátoru. Lze najít stopy zirkonu, draslíku, chloru nebo titania, stroncia, hliníku atd. [7]

### 2.6.2. Nátěrové hmoty

Nátěry jsou na povrchu nepřeborného množství věcí. Slouží převážně k ochraně materiálu nebo dekoraci, každý účel pochopitelně zahrnuje odlišné chemické složení. Do této kategorie patří např. automobilové nátěry, architektonické nátěry, nátěry jízdních kol, kosmetické nátěry (lak na nehty), nátěry lodí atd. Fragmenty nátěrových hmot jsou poměrně časté mikrostopy,

drobné částice nátěrů jsou běžně zajišťované např. při dopravních nehodách (lak auta), napadeních (odštěpek z útočné zbraně) a loupežích (barva z vypáčených dveří). Často mají nepatrné rozměry v řádech mm<sup>2</sup> i méně. Při analýze vzorků nátěrových hmot se určuje stupeň podobnosti mezi vzorkem odebraným z místa činu a vzorkem ze známého zdroje. Identifikuje se typ nátěru podle rámcového složení hmoty, barva podle standardizované vzorkovnice, působení vnějších vlivů na vzhled nátěru s ohledem na čas, který uplynul od použití nátěrové hmoty do jejího zkoumání atd. Ke zkoumání nátěrů se využívá primárně metoda infračervené spektrální analýzy. [7, 12, 13]

### 2.6.3. Léčiva a drogy

Této skupině stop je pochopitelně věnována extrémní pozornost nejen kvůli frekvenci jejich výskytu, ale kvůli závažnosti trestní činnosti. Tyto stopy mohou mít původní charakter (tovární forma léčiva, zajištěná pilulka drogy), formu zbytku (v injekční stříkačce, v kapse oděvu), nebo v různé fázi přirozené degradace v organismu (krev, moč). Při zajišťování materiálu je důležité jednat opatrně kvůli možnému přenosu nemocí nebo případné intoxikace (např. transdermálním přenosem). Tyto vzorky se mohou na místě činu posuzovat pouze vizuálně. Vždy se zajišťuje celé množství, pokud je nalezen enormní objem substancí, část se odebere na analýzu a zbylé množství se uschová na policejním pracovišti. Analyzuje se přítomnost, přesná identita a množství zajištěné substance ve vzorku.

## Léčiva

Léčiva se mezi důkazním materiálem mohou vyskytnout v případech podezření na padělky nebo při zásahu na nelegální varny, kdy slouží jako prekurzory drog (léčiva obsahující pseudoefedrin k výrobě metamfetaminu). Padělání léčiv je stále častějším a velmi nebezpečným jevem. V nejlepším případě může obsahovat minimum účinné látky, případně „lék“ neobsahuje danou složku vůbec. V horším případě obsahuje jiné látky, které mohou být i životu nebezpečné. V rozvojových zemích se množství padělaných léků pohybuje až kolem 50 %.<sup>[14]</sup>

## Drogy

Drogy, tedy nelegální omamné a psychotropní látky (OPL), tvoří bezpochyby jednu z hlavních skupin zkoumaného materiálu v kriminalistických laboratořích. Historicky se významně nelišily od léčiv, až postupem času došlo k výraznému odštěpení této masivní skupiny chemických látek. Mezi nelegální substance patří konopné drogy (THC, hašiš), halucinogeny (LSD, psilocybin, meskalin), opiáty (heroin, morfin) a stimulanty (amfetaminy, kokain). V posledních dekádách je velmi problematická nelegální výroba nových psychoaktivních látek. Ty se z varen velmi rychle rozšiřují zejména na taneční scéně a působí celosvětově mnoho případů vážných intoxikací. Mezi hlavní důvody jejich oblíbenosti na drogové scéně patří nízká cena, poměrně snadná dostupnost (dají se koupit přes internet, některé s označením „sůl do koupele“) a nulové právní postihy, než je zachytí kriminalisté a zavedou se do seznamu OPL. Patří mezi ně např. syntetické kanabinoidy, opiáty nebo látky ze skupiny 2C psychedelik (NBOMe halucinogeny).<sup>[15]</sup>

## Zajištění materiálu

V případech podezření na drogovou kriminální činnost probíhá zajištění podezřelých chemikálií, nádob i výrobních zařízení. Chemikálie se zajišťují z nejrůznějších povrchů, nádob atd. – v takovém případě mohou mít podobu tablet, prášku, tekutiny, rostlinného materiálu (palice marihuany, sušené houby rodu *Psilocybe*), krystalů anebo savých papírků („blotter“). Dále se vzorky mohou

zajistit od osob (podezřelí a oběti), tehdy se jedná o odběr vzorku vlasů, moči, slin nebo krve. [17]

Vlasy jsou dobrým indikátorem opakovaného užití drogy, navíc se její přítomnost dá detekovat až 3 měsíce nazpět. Z vlasu lze detekovat např. marihuanu, kokain nebo opiáty.

V moči se nejčastěji nachází vzorky marihuany, kokain, opioidy a amfetaminy. Obsah drogy v moči nám neřekne mnoho o přesném času užití drogy a jejím působení, přesto je i obecná informace o užití drogy hodnotná (zjištění množství parentální drogy a případných aktivních metabolitů) a odběr je jednoduchý a neinvazivní.

Zajištění materiálu ze slin je jednoduché a neinvazivní, ale šance na detekci přítomnosti drog z ústní dutiny je velmi krátkodobá (max. 48 h). Obsah drogy ve slinách koreluje s jejími fyziologickými efekty.

Krev je extrémně užitečný biologický materiál k detekci drog. Pokud je droga přítomna v krvi, znamená to, že byla absorbována. Navíc existuje korelace mezi obsahem látky v krvi a behaviorálním a farmakologickým působením. [16]

Vzorky musí být zabaleny tak, aby byly zachovány a nepodléhaly degradaci, vždy se bere ohled na jejich podstatu. Rostliny se tedy nemohou zabalit do vzduchotěsného pytle, injekční stříkačky nepatří do měkkého obalu apod. Vhodná úložná nádoba je klíčová, používají se zapečetěné obálky, vzduchotěsné a vodotěsné plastové obaly, kapalné vzorky je vhodné nechat v původní nádobě, pokud jsou dostatečně těsně uzavřeny, případně se vloží do řádně utěsněné nádoby s víkem z nereaktivního materiálu, aby se minimalizovala evaporace. Ve skleněných nádobách se inertním uzávěrem se skladují drogy, které se nemohou dlouhodobě přechovávat v plastových obalech z důvodu možné reakce. Chemikálie potřebné k výrobě drog bývají velmi toxické, proto se podezřelé vzorky balí v malých objemech do speciálních nádob. [16, 17]

## Analýza materiálu

Postup analýzy těchto stop se dělí na dvě části: předběžné testy a potvrzující testy. Zkoumá se přítomnost nelegální drogy a následně se přesně identifikuje, zjišťuje se přítomnost a množství různých příměsí, nečistot a ředících látek. Někdy vzorky obsahují pouze stopové množství aktivní drogy.

### Předběžný test

Předběžné (presumptivní, screeningové) testy jsou kvalitativní testy schopné detekovat přítomnost drogy prakticky okamžitě po zajištění, tedy často ihned na místě činu. Typicky se jedná o kolorimetrické metody, kdy se v přítomnosti drogy tvoří konkrétní barva. V případě správného provedení a interpretace jsou velmi rychlou a spolehlivou metodou potvrzení přítomnosti drogy (až 90% přesnost). Může ale dojít k falešně pozitivnímu výsledku např. vlivem nedostatečné specifity testu. Pozitivitu může vyvolat zákonem nekontrolovaná substance (což neznamená, že vzorek není drogou). Příliš vysoká koncentrace analyzované drogy může naopak způsobit falešně negativní výsledek vlivem tzv. efektu prozóny („hook effect“) kvůli vzniku extrémně nevyváženého poměru protilátka:antigen v testu. <sup>[18]</sup>

Mezi předběžné testy se řadí makroskopická analýza (pozorování okem), mikroskopická analýza (polarizační mikroskop, test detekce mikrokystalů) a enzymově zesílená imunoesej (enzyme multiplied immunoassay, EMIT). V České republice se využívá terénní D-test s devíti druhy detekčních trubiček, které jsou schopny určit téměř všechny běžně se vyskytující drogy. <sup>[3, 13, 18, 19]</sup>

### Komplementární analýza

Následuje potvrzující analýza, což zahrnuje kvalitativní i kvantitativní testy. Kvalitativní analýza je vysoce citlivá a identifikuje konkrétní nelegální substanci a její metabolity, z kvantitativní analýzy se získávají informace o množství a čistotě drogy a také se odhalí případná falešná pozitivita screeningového testu. Buď se dělá screeningový i potvrzující test dohromady, nebo rovnou detailní analýza.

Mezi primární metody komplementární analýzy patří plynová chromatografie/hmotnostní spektrometrie (gas chromatography/mass spectrometry, GC/MS), plynová chromatografie (GC) a vysokoúčinná kapalinová chromatografie (high-performance liquid chromatography, HPLC) a infračervená spektrometrie s Fourierovou transformací (Fourier transform infrared, FTIR).

#### 2.6.4. Zeminy

Zeminy jsou tzv. pedologické stopy používané k lokalizaci zdroje materiálu. Lze podle nich odhadnout, kde se dotyčný člověk (podezřelý, oběť) pohyboval. Zkoumá se chemické složení půdy, obsah pylů, rostlinných fragmentů a dalších organických složek ve vzorku. Využívají se např. v případech ekologických havárií (spolu s nimi se zkoumají i vzorky vody, rostlin, příp. uhynulých zvířat). [13]

#### 2.6.5. Polymery a vlákna

Polymery jsou významným důkazním materiálem, který může nést informaci sám o sobě, nebo ji skýtat jako podloží pro hlavní stopu, např. když jsou vlákna papíru potřísněna barvou.

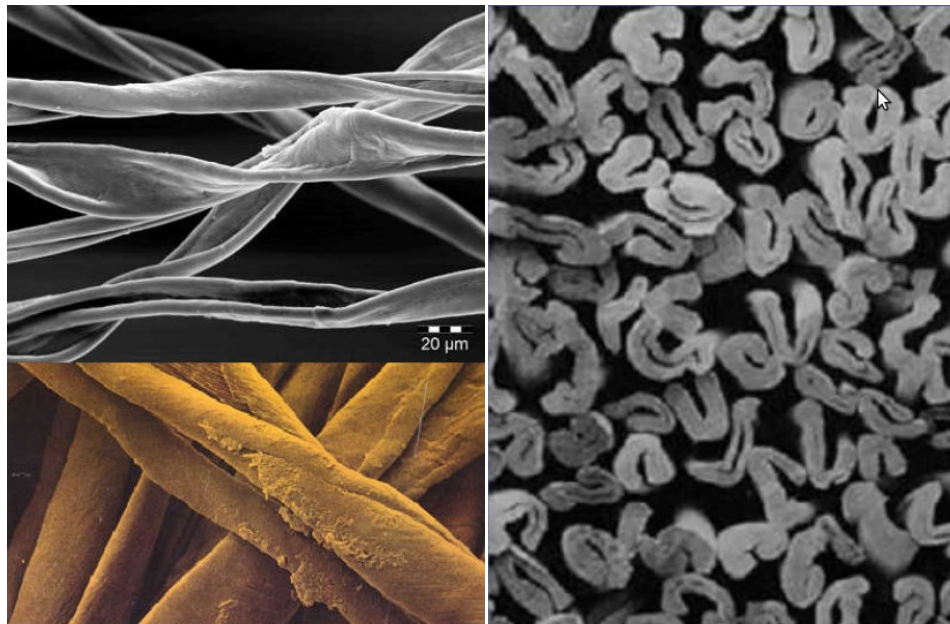
Polymery jsou tvořeny řadou spojených monomerů. Ty mohou být buď všechny stejné, nebo různé (kopolymery nebo také heteropolymery). Existuje také celá řada spojů mezi monomerními jednotkami. Polymery reagují na nárůst okolní teploty měknutím a mohou měnit své skupenství, tyto reakce se obecně označují jako termoplastické chování. Co se týká jejich chemického složení, často obsahují příměsi pro vylepšení jejich vlastností, standardně změkčovadla proti popraskání vláken. Typicky u nátěrů aut nechceme, aby barva popraskala při roztahování a smršťování kovu auta v reakci na střídání teplot. Naopak polymery zadržující nápoje sycené oxidem uhličitým musí být velmi pevné a nepoddajné. Dělí se do dvou skupin na polymery přírodní (biopolymery) a syntetické. [2]

## Biopolymery

Biopolymery se získávají z přírodních zdrojů (rostliny, živočichové). Patří sem hlavně celulóza, polysacharid a základní stavební prvek papírových a bavlněných vláken. Patří sem také polysacharid chitin, který slouží např. jako vnější kostra většiny členovců (hmyz, krabi, aj.). Chitin má zvláštní význam ve forenzní entomologii. Další biopolymery jsou složené z molekul glukózy nebo jí příbuzných látek. Patří sem škrob a glykogen, které mají funkci zásobních látek.

Biopolymery tvoří základ přírodních vláken, které se dále mohou dělit na rostlinná (bavlna, kapok, len, konopí, juta), živočišná (vlna, srst, koňské žíně, hedvábí) a anorganická (azbest).

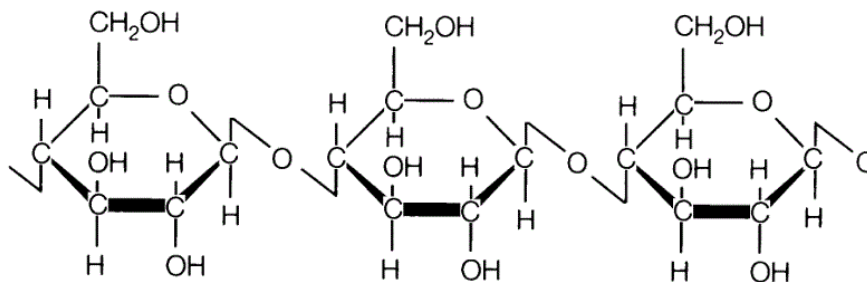
Bavlněná vlákna jsou ze všech přírodních vláken nejčastějším forezním materiálem. Bavlna je tzv. semenné vlákno, protože vzniká v tobolkách bavlníku. V laboratoři se jednoduše identifikuje pomocí polarizačního mikroskopu, mají tvar tenkých mašliček s tzv. konvolucemi – až několikanásobným stočením vlákna. [2]



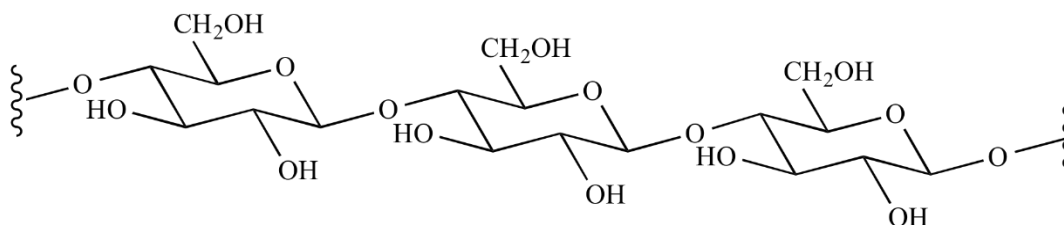
Obr. 5: Detailní pohled na vlákna bavlny pod mikroskopem. Napravo jsou pozorovatelné charakteristické mašličky s konvolucemi.

## Polosyntetické polymery

Polosyntetické polymery stojí logicky mezi biopolymery a syntetickými polymery, jsou tvořeny regenerovanou celulózą. Jejich zástupci jsou například umělé hedvábí (rayon, např. viskóza), celofán nebo nitrocelulóza (střelná bavlna). [2]



Obr. 5: chemická struktura celulózy.



Obr. 6: chemická struktura rayonu.

## Syntetické polymery

Nejznámějším syntetickým polymerním vláknem je patrně nylon. Mezi další zástupce se řadí polyamidy, polyestery, polypropyleny, polyuretany, polyvinylchloridy apod. [2, 19]

## Zajištění vláken

Vlákna se uvolňují samovolně nebo při mechanickém působení (krádež aut, vloupání, přepadení, znásilnění). Prokazují kontakt textilie s jiným předmětem, vzájemný kontakt textilií nebo kontakt textilie – tělo. Distribuce vláken určuje působ páchání trestného činu.

Vzorky se odebírají z vozidel, oděvů, částí těla a plošně. Využívá se k tomu pinzety a lupy, vytřepání nosiče stopy nebo speciální nástavce na vysavač. Vlákna můžeme odebrat také pomocí daktyloskopické fólie,



průhledné/neprůhledné lepicí pásy, hřebene či gázy. Sbírají se do plastových nebo skleněných vial, papírových obalů, sáčků atd. K vláknu se vždy musí zajistit i porovnávací vzorek. <sup>[19]</sup>

### Analýza vláken

Při zkoumání vzorků vláken se sledují nejrůznější vlastnosti jako morfologie (tvar, příčný řez, matování), fyzikální vlastnosti (teplota tání, index lomu), chemické složení (druh polymeru, zušlechťování, barviva) a barva. Ve větším měřítku lze zkoumat vlastnost textilie, její vazba (plátňová, keprová, atlasová), vlákna osnovy a útku a další důležité markanty. U textilních vláken můžeme sledovat tzv. barevnou metamerii, kdy dva pigmenty s různými absorpčními křivkami mohou tvořit stejný barevný vjem. <sup>[19]</sup>

## 3. Metody zkoumání mikrostop

Mikrostopy jsou z podstaty tvořeny naprosto minimálním množstvím materiálu (váha někdy pouze v řádech pikogramů), který se navíc často jen velmi obtížně odděluje od substrátu. Navíc by se během analýzy neměl zpracovat úplně celý a tím potažmo zničit. Proto jsou analytickými metodami první volby vždy primárně nedestruktivního charakteru, jako např. optická a elektronová mikroskopie, mikrospektrometrické metody (UV-VIS, infračervená spektrometrie), rentgenová fluorescence nebo rentgenová difrakční analýza. Tyto metody umožňují stanovení chemického složení vzorku a jeho strukturu. <sup>[7]</sup>

V následujících podkapitolách jsou popsány jednotlivé analytické metody, jejich princip, význam ve zkoumání mikrostop, a také jejich klady a zápory. Vzhledem k dřívějšímu nástupu principu nejsou dále rozebírány presumptivní testy.

### 3.1. Skenovací elektronová mikroskopie

#### 3.1.1. Princip SEM

SEM je metoda určená především k pozorování povrchu vzorků, k čemuž využívá zúžený a pohyblivý svazek elektronů. Jde o nepřímou zobrazovací metodu, protože obraz se tvoří pomocí sekundárního signálu (sekundární a odražené elektrony). Elektrony interagují s atomy na povrchu vzorku i produkují různé signály obsahující informaci o povrchu zkoumané stopy a její složení. Poloha paprsku elektronů v kombinaci s intenzitou sekundárního signálu postupně tvoří obraz s velkou hloubkou ostrosti. SEM se využívá např. při analýze povýstřelových zplodin nebo částic z airbagů. [19, 20]

#### 3.1.2. Mechanismus SEM

SEM využívá detektory sekundárních a odražených elektronů. Metoda detekce sekundárních elektronů využívá neelastických interakcí mezi paprskem primárních elektronů a vzorkem, sekundární elektrony pocházejí z povrchu vzorku a blízkého okolí, mají nižší energii a intenzita jejich signálu závisí na úhlu paprsku primárních elektronů. Nejčastějším typem je Everhart-Thorneyův detektor se scintilátorem ve Faradayově kleci, která je lehce pozitivně nabitá a přitahuje sekundární elektrony. Detektor je umístěn po straně komory k efektivnější detekci elektronů s nižší energií. Scintilátor tyto elektrony akceleruje, následně jsou konvertovány na fotony a jejich signál je amplifikován fotonásobičem. Tato metoda je velmi vhodná na detailní sledování povrchu vzorku a dá se použít také u BSE modelu, když se odstraní efekt Faradayovy klece.

Oproti tomu odražené elektrony (backscattered electrons, BSE) využívají elastických kolizí primárních elektronů s atomy vzorku, což působí změnu jejich trajektorie. U BSE metody je síla signálu přímo úměrná protonovému číslu, větší atomy tvoří mnohem silnější signál. BSE poskytují informaci o topografii, krystalické struktuře a magnetickém poli vzorku.

Zdrojem elektronů je elektronová tryska (jinak také elektronové dělo). SEM může mít termoemisní nebo autoemisní zdroj. U termoemisního zdroje se vlivem průchodu elektronů zahřívá speciální vlákno a následně dochází k úniku elektronů. Vlákno může být wolframové nebo z hexaboridu lathnatého (LaB6). U studené emise jsou elektrony emitovány studeným wolframovým vláknem vyleptaným do hrotu, anebo Schottkyho diodou. Ta je rozdílná od hrotových zdrojů více odolná a má kratší zotavovací dobu. Schottkyho zdroj se skládá z monokrystalického wolframového drátu, který je vyleptaný do hrotu.

Další částí mikroskopu jsou elektromagnetické čočky, které zmenšují průměr paprsku primárních elektronů. Je to soustava prstenců z čistého, měkkého železa zasazené v cívkách a fungují pouze ve vakuu. [20]

### 3.1.3. Zpracování vzorků

Nevodivé vzorky (např. biologické) musí být vysušené, zafixované proti *post mortem* změnám, před vlastním pozorováním potažené tenkou vrstvou kovu (typicky zlato, stříbro) o pár desítkách nm s dobrou elektrickou a tepelnou vodivostí, která zajišťuje odvod záporného náboje a tepla, ve které se přemění většina energie urychlených primárních elektronů. Některá rezidua primárních elektronů se ale mohou odklonit, spojit se sekundárním signálem a působit artefakty na obrazu. [20]

### 3.1.4. Výhody a nevýhody SEM

SEM je velmi verzatilní nástroj pro zkoumání širokého spektra vzorků. Primárně slouží k získání informací o povrchové struktuře stop. Výhody této metody tkví v nedestruktivnosti metody a ve velké hloubce ostrosti snímaného obrazu. Rozlišovací schopnost SEM může být dokonce pod 1 nm. Navíc existuje řada variant specializovaných detektorů podle typu zkoumaného objektu. Další výhodou je goniometrický stolek v přístroji, na kterém je vzorek umístěn, se kterým lze pohybovat do mnoha směrů.

Nevýhodou této metody je nutnost přípravy preparátu při vysokovakuovém SEM, specifické požadavky jednotlivých emisních vláken na hodnoty vakua a u některých vláken jejich nižší životnost. Mohou vznikat artefakty, příp. popraskání vzorku vlivem tepla z nárazu primárních elektronů. Vady se mohou týkat i soustavy elektromagnetických čoček (sférická vada, chromatická vada, osový astigmatismus). [20]

### 3.1.5. SEM s energiově disperzní rentgenovou spektrometrií

#### Princip metody

Energiově disperzní rentgenová spektrometrie (EDXS) v kombinaci se SEM je patrně nejrozšířenější metodou pro povrchovou analýzu vzorku založená na detekci rentgenového (RTG) záření. EDXS využívá interakci zkoumaného vzorku a elektronového paprsku zdroje. Každý vzorek, resp. každý prvek má své charakteristické chování, atomovou strukturu, počet elektronů v jednotlivých valenčních vrstvách s určitou energií. V klidu jsou atomy v základním stavu a jejich elektrony neexcitované. Když se však na vzorek zacílí paprsek primárních elektronů ze zdroje, elektrony ve spodním plášti atomů vzorku se odštěpí a místo po nich vyplní elektrony z vnějšího pláště s vyšší energií. Tento rozdíl energie je uvolněn ve formě RTG záření. S EDXS je možné určit prvky počínaje borem ( $Z=5$ ), ideálně ale až od sodíku ( $Z=11$ ). Tato metoda se používá např. při analýze nátěrových hmot.

Energie emitovaných RTG paprsků lze měřit a určit prvkové složení vzorku i jejich relativní množství, tato energie je totiž charakteristická pro každý atom. Specifické průběhy emisních křivek jsou odvozeny od Moseleyho zákona.

Dříve byl běžným detektorem křemíkový detektor dotovaný lithiem (Si Li) a chlazený kapalným dusíkem. Ty fungují na principu zachycení RTG záření ze vzorku, poté se tvoří nábojové pulzy proporčně k energii záření, které jsou následně konvertovány na proporční napěťové pulzy, které jsou seřazeny a

analyzovány podle napětí. Podle energie jednotlivých RTG paprsků se vyhodnocuje přítomnost konkrétních prvků.

Nyní již existuje novější křemíkový driftový detektor (SDD) z vysoce odolného křemíkového čipu. Zde jsou elektrony hnány na malou sběrnou anodu, která má extrémně nízkou kapacitu, kratší dobu zpracování, velmi vysokou propustnost a lepší rozlišení než tradiční detektory. Navíc minimalizuje proud paprsku a snižuje poškození vzorku. SDD jsou velmi vhodné k analýze těžkých kovů. Oproti Si (Li) detektoru má vyšší rozlišení a chlazení probíhá za pomoci Peltierova článku.

### Výhody a nevýhody EDXS

Výhody EDXS jsou mnohé: dokáže změřit tloušťku jednotlivých vrstev vícevrstvého povrchu (např. u kovů a slitin), má výbornou hloubku ostrosti díky velmi přesně zaměřenému primárnímu paprsku, ještě detailnější kvantitativní a kvalitativní informace. Navíc se množství analyzovaného vzorku může pohybovat už kolem jednotek  $\mu\text{m}^3$ . Je to rychlá, poměrně levná a nedestruktivní analytická metoda povrchu a prvkového složení mikrostop. [22, 23, 24]

Nevýhoda EDSX tkví hlavně v tom, že některé prvky mohou mít podobná maxima emisních spekter a výsledky se mohou poměrně snadno misinterpretovat. To lze odstranit provedením spektrální dekonvoluce v každém bodě k odstranění překryvů. Překryv spekter může nastat např. u dvojic fosfor-zirkonium, zinek-lanthan, hliník-lanthan atd. Další možnou komplikací je, že RTG paprsky jsou ze vzorku vyzařovány izotropicky a všechny tak nemusí být detekovány, pokud není signál dostatečně silný. [22, 23, 24]

### 3.1.6. SEM s vlnově disperzní spektrometrií

SEM s vlnově disperzní spektrometrií (WDXS) funguje na podobném principu jako SEM/EDXS, ale oproti analýze celého vyzářeného spektra sekundárního signálu hodnotí prvek po prvku na základě prvkově specifických vlnových délek. WDXS metoda dokáže určit prvky už od beryllia ( $Z=4$ ).

Nesporné výhody skýtají větší přesnost, nižší detekční limity a nedestruktivita metody. Nevýhodou je časová náročnost měření (desítky minut) a vysoká cena i objemnost přístroje. [24]

## 3.2. Rentgenová fluorescenční spektrometrie

### 3.2.1. Princip metody

Rentgenová fluorescenční spektrometrie (X-Ray fluorescence, XRF) je metoda používaná k detekci prvkového složení vzorků. K analýze se využívá krátkovlnného RTG záření ze zdroje a následné interakci s materiálem. Je vhodná pro chemickou analýzu kovů, slitin, hornin, skla a různých pigmentů. Opět se obvykle pracuje ve vakuu. [25]

Princip XRF je podobný jako EDXS, elektrony ve vnitřním obalu atomů vzorku kompenzují elektrony uniklé z vnějšího obalu po zásahu RTG zářením a vyzáří tak energii ve formě fotonu. Tato fluorescenční energie je opět charakteristická pro každý prvek.

Podobně jako u EDXS/WDXS se dá analyzovat detekovaný signál dvěma způsoby. Může se kvantifikovat energie vzorkem vyzářeného paprsku metodu disperzní energie, která je rychlá, velmi přesná a nedestruktivní. Druhou možností je měření vlnové délky emitovaného paprsku metodu disperzní vlnové délky, kdy se fotony před snímáním na detektoru separují difrakcí. Tato metoda má ovšem destruktivní charakter, navíc vyžaduje specifickou formu vzorku (stlačený prášek).

Existují také mobilní XRF analyzátory pro rychlé předběžné testy, kdy není nutná žádná příprava vzorku. Ty mají pochopitelně nižší detekční limity a nejsou vhodné pro analýzu lehkých prvků nebo tenkých povrchů. [25]

### 3.2.2. Výhody a nevýhody XRF

Je to velmi rychlá a nedestruktivní metoda, která nevyžaduje složitou přípravu vzorku. Poskytuje analýzu širokého spektra materiálů, ke které u některých materiálů (sklo) stačí velmi malá tloušťka vzorku v řádech mm.

Naopak při zkoumání kovů je potřeba odstranit případnou korozi a mít co nejméně porušený vzorek. [25]

### 3.3. Rentgenová difrakční spektrometrie

#### 3.3.1. Princip metody

Rentgenová difrakční spektrometrie (XRDS) zkoumá a charakterizuje strukturu práškových nebo tenkých mikrokrytalických materiálů, jejich chemické složení a krystalickou orientaci. Takto se dají analyzovat např. chemické substance a nejrůznější polymery.

Krystalický materiál má charakteristické opakující se uspořádání atomů. Po dopadu RTG paprsku konkrétní vlnové délky s ním elektrony zkoumaného vzorku reagují oscilací a vzniká elektronový mrak, fungující jako sekundární zdroj informace, protože generuje elektromagnetickou radiaci se stejnou frekvencí a fází jako dodané RTG záření. Každý atom emituje radiaci, která podstoupí buď konstruktivní nebo destruktivní interferenci. Konstruktivní inference se dá analyzovat, konkrétně její difrakční maximum, a tak určit konkrétní vlastnosti vzorku. [26]

#### 3.3.2. Výhody a nevýhody XRDS

Tato metoda poskytuje precizní analýzu krystalické struktury a typu sloučenin minerálního charakteru. Je jednoduchá a spolehlivá, přináší důležité kvantitativní informace a má nedestruktivní povahu.

Nevýhodou je, že pro určení struktury organických makromolekul je třeba zajistit krystalickou strukturu vzorku, což může být limitujícím faktorem. [26]

### 3.4. Infračervená spektrometrie

#### 3.4.1. Princip metody

Metoda infračervené spektrometrie (infrared, IR) je založena na interakci IR záření se vzorkem. IR spektrometrie se podle rozsahu vlnových délek dělí na dalekou, střední a blízkou IR oblast elektromagnetického spektra, pro identifikaci chemické struktury vzorků je nejvýznamnější střední IR oblast ( $4000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$ ). Oblast mezi cca  $1400\text{--}650\text{ cm}^{-1}$  je tzv. „oblastí otisku prstu“, protože obsahuje informace o vibracích molekul, podle kterých lze určit prvkové složení vzorku. Využívá se zde principu, že neexistují dvě sloučeniny se stejným vzorem IR spektra v této oblasti. Touto metodou se identifikuje chemická struktura vzorků pevného, kapalného i plynného skupenství jako polymery (jejich degradace a stupeň polymerace), barviva atd.

Síla IR záření nestačí k vybuzení elektronů, ale způsobí změnu rotačního nebo vibračního stavu molekul. IR spektrum vzorku je zachyceno procházejícím monochromatickým paprskem z přístroje. Pokud je frekvence IR stejná jako vibrační frekvence molekul, paprsek je absorbován. Analýza prošlého paprsku odhalí, kolik energie bylo absorbováno a v jaké části spektra a výsledek se poté porovnává s referenčními materiály. Spektrometr je schopen určit frekvenční spektrum vzorku během vteřiny, proto je IR spektrometrie vhodná i pro méně stabilní vzorky. [27]

#### 3.4.2. Techniky měření spekter pevných vzorků

Pevné vzorky se dají měřit vícero způsoby. K měření spekter se může použít přímá (transmisní) technika nebo odrazová (reflexní) technika měření.



## Přímé měření

Přímé měření je nejlepší pro získání absorpčních spekter z pevných vzorků, jde však použít jen u samonosných vrstev polymerů. Variantou je vytvořit ze vzorku slisovanou tabletu ze vzorku a vhodného optického materiálu (např. bromid draselný). U této techniky může nastat chyba v případě reakce vzorku s přimíchaným optickým materiálem.

## Odrázové měření

Další variantou je odrazová technika měření vzorku, která se užívá u pevných, kapalných nebo velmi viskózních vzorků. Těchto technik je vícero, pro nástin zmiňuji dvě vybrané. Existuje metoda difuzní reflexe (diffuse reflectance infrared Fourier transform spectroscopy, DRIFTS), vhodná pro pevné vzorky ve formě prášku. Je nedestruktivní, vzorky se nemusí mlít ani lisovat. Navíc stačí malé množství vzorku. Je vysoce citlivá a dokáže analyzovat i téměř neprůhledné a slabě absorbující povrchy. Další možností je metoda zeslabené totální reflexe (attenuated total reflectance, ATR), která je zvláště vhodná pro analýzu povrchů silně absorbujících kapalných či viskózních vzorků (pasty, gely, prášky apod.) a využívá ATR krystalu s velkým indexem lomu. <sup>[27]</sup>

### 3.4.3. Výhody a nevýhody IR spektrometrie

Mezi výhody IR spektrometrie patří její jednoduchost, spolehlivost, rychlost měření a nedestruktivita. IR spektrometrie poskytuje přesnou identifikaci neznámých vzorků všech skupenství, ale také možnost charakterizace nových.

Nevýhodou je neaplikovatelnost na vzorky obsahující vodu vlivem její silné absorpce IR záření. Také ji nelze použít pro prvky v krystalickém stavu. Je potřeba vzorky před analýzou upravit (drcení na prášek, tvorba tablet). Také je důležité zmínit, že IR spektra jsou velmi komplikovaná a jejich analýza vyžaduje jisté zkušenosti. Občas se také stává, že vzorek nelze definitivně určit na základě jediného IR spektra, potom je vhodná IR spektrometrie s Fourierovou transformací (viz dále), případně další metody jako je hmotnostní spektrometrie.

Kvantitativní analýza může být problematická, pokud je vzorek příliš málo nebo naopak až příliš koncentrovaný. [27]

#### 3.4.4. Infračervená spektrometrie s Fourierovou transformací

Metoda infračervené spektrometrie s Fourierovou transformací (FTIR) používá oproti klasické IR spektroskopii Michelsonův interferometr, který používá polychromatický paprsek a je tak schopen zachytit mnohem detailnější signál (rozlišení až  $0,1-0,005 \text{ cm}^{-1}$ ), takže si poradí i s komplexnějšími vzorky. Navíc k detekci stačí extrémně malé množství vzorku ( $1^{-10} \text{ g}$ ). V kombinaci s ATR metodou navíc není potřeba jakékoliv přípravy vzorků. Metoda je ideální pro zkoumání vzorků polymerů, drog, chemikálií a neznámých materiálů. [27, 28]

#### 3.4.5. Blízká infračervená spektrometrie

Blízká infračervená spektrometrie (near-infrared, NIR) je metoda analýzy blízké IR oblasti ( $12500-4000 \text{ cm}^{-1}$ ) z elektromagnetického spektra vzorků. Dokáže proniknout hlouběji do vzorku, ale je méně citlivá. Výhodou NIR metody je, že pro ni není třeba vzorek upravovat a neničí se. Je to vhodná metoda např. pro analýzu potravin. [29]

### 3.5. Ultrafialovo-viditelná spektrometrie

#### 3.5.1. Princip metody

Ultrafialovo-viditelná (UV-VIS) spektrometrie funguje na principu vystavení zkoumaného materiálu primárnímu paprsku UV/VIS záření, změří se míra absorpce primárního paprsku při průchodu vzorkem, resp. poměr intenzity světelného paprsku prošlého vzorkem a intenzity paprsku před průchodem. Různé vzorky opět absorbují světlo odlišně na základě svého chemického složení a mohou tak napovědět, co je v daném materiálu přítomno.

Spektrofotometr může měřit také tzv. odrazivost, což je poměr intenzity světla odraženého od vzorku ku intenzitě světla odraženého od referenčního materiálu. UV-VIS se používá primárně pro měření kapalných vzorků, ale absorbance plynů a pevných látek lze změřit také. Metodou lze např. sledovat degradaci drog. Vlnová délka bezbarvých vzorků se pohybuje kolem 10-380 nm (UV oblast), u viditelně barevných vzorků je kolem 380-780 nm (VIS oblast). [30]

UV-VIS spektrofotometr obsahuje následující části:

Zdroj elektromagnetického záření – wolframová žárovka (350-3000 nm, VIS oblast), deuteriová výbojka (190-400 nm, UV oblast), xenonová výbojka (160-2000 nm) nebo v současnosti také LED dioda (VIS oblast).

Monochromátor – k rozptylu polychromatického paprsku na jednotlivé monochromatické paprsky, kdy se pustí dále na vzorek jen jeden.

Kyveta s měřeným vzorkem – transparentní nádoba tvaru kvádru, ideálně z taveného oxidu křemičitého nebo z křemenného skla. Skleněné nebo plastové se dají použít pouze omezeně, protože absorbují v UV spektru. Stěny kyvety musí být naprosto čisté.

Detektor – zařízení může mít fotonásobič, fotodiodu, fotodiodové pole nebo detektory CCD. Ty ve spojení s pevně nastaveným monochromátorem jako jediné mohou měřit více vlnových délek simultánně. [30]

### 3.5.2. Příprava vzorku

Vzorek pro UV/VIS spektroskopii musí být naprosto propustný pro paprsek ze zdroje. Nesmí obsahovat žádné pevné částice, proto je třeba použít vhodné rozpouštědlo (solvent). Někdy je vhodné použít k rozpuštění vzorku sonikátor. Rozpouštědlo musí být opticky čisté. [30]

### 3.5.3. Výhody a nevýhody UV/VIS spektrometrie

UV/VIS spektrometrie je kvantitativní analýza koncentrací organických či anorganických látek (barviva). Je to rychlá, jednoduchá a velmi přesná metoda, i malé spektrometry poskytují excelentní výsledky.

Mezi její nevýhody patří náročnější příprava experimentu (zamezení okolního světla, vibrací okolních elektronických zařízení), omezené pole použitelnosti z důvodu absorpce záření některými analyty, destruktivita metody, nutnost dokonalé čistoty květ a naprosto rozpuštěných vzorků. Spolehlivější květy jsou poměrně drahý spotřební materiál, levné mají zase poměrně omezené použití (např. jen pro VIS). Vzorky s neznámou kombinací látek mohou být velmi náročné na určení. <sup>[30]</sup>

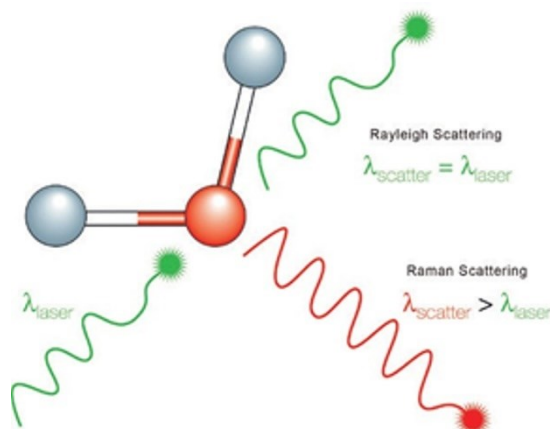
## 3.6. Ramanova spektrometrie

### 3.6.1. Princip metody

Ramanova spektrometrie (RS) je nedestruktivní metoda analýzy vzorků komplementární k IR spektroskopii – RS je také metoda založená na rozdílu energií vibračních hladin molekul. RS ale měří neelastický rozptyl světla, IR spektrometrie se zaměřuje na absorpci fotonů. Využívá Ramanova rozptylu, což je jev pozorovaný při interakci fotonů primárního paprsku s pohybem molekul. Rozptýlené záření slouží ke určení specifických změn vibrační energie látek (Ramanův „fingerprint“). RS se používá pro identifikaci drog, analýzu vláken, inkoustů, výbušnin, biologického materiálu atd. Poskytuje detailní informace o chemické struktuře, fázi, krystaličnosti a molekulárních interakcích vzorků. Vzhledem ke komplexitě naměřených spekter se využívá knihoven se známými spektry konkrétních látek.

Vzorky se ozařují paprskem fotonů ze zdroje, při této interakci se dá pozorovat energetický přechod molekul vzorku. Molekuly vzorku mohou po stimulaci fotony emitovat foton o stejné vlnové délce (Rayleighův rozptyl, jediný elastický, nenese žádnou informaci), foton o delší vlnové délce (Stokesův rozptyl) nebo o kratší vlnové délce (anti-Stokesův rozptyl). Nejčastější je

Stokesův rozptyl. Stokesův rozptyl je statisticky pravděpodobnější a intenzivnější než anti-Stokesův rozptyl, takže se měří při RS prakticky vždy. [31]



Obr. 8: Znáornění interakce molekuly vzorku s paprskem fotonů při RS.

### 3.6.2. Výhody a nevýhody Ramanovy spektrometrie

RS je vysoce specifická kvalitativní i kvantitativní analýza, kterou lze využít i v terénu. Je to precizní, rychlá, a hlavně nedestruktivní analýza bez potřeby přípravy vzorku. Toho navíc stačí velmi malé množství a může obsahovat vodu.

Hlavní nevýhodou metody je, že Ramanův efekt je velmi slabý, proto je potřeba pečlivě a precizně nastavit veškeré komponenty. RS je navíc mnohem dražší než např. IR spektroskopie vzhledem k využití vysoce výkonných laserů. Dále se vlivem zahřívání mohou narušit vzorky. RS nelze použít k analýze kovů a není moc vhodná k měření komplexních směsí, protože poskytne fúzi všech spekter jednotlivých molekul dohromady, což může značně ztížit práci. V takovém případě je vhodné použít chemometrické metody k identifikaci konkrétních molekul. [31]

### 3.7. Mikrospektrofotometrie

Mikrospektrofotometrie (micro-spectrophotometry, MSF) je nedestruktivní metoda pojící pozitiva mikroskopie a spektrometrické analýzy. Může měřit transmitanci, absorbanci, odrazivost nebo fluorescenci vzorku podle nastavení. Je extrémně detailní, může měřit plochy s průměrem pod 1  $\mu\text{m}$  a mikroskopem se dá velmi přesně kontrolovat zkoumaná oblast. Využití nalézají v kriminalistické analýze vláken, barviv nebo pigmentů (např. komparace barevnosti), dá se s nimi sledovat chování vzorků při různých typech průchodu/odrazu světla. <sup>[32]</sup>

Konkrétní typy MSF mohou být mikroskopem doplněné již zmiňované metody jako mikro-UV/VIS (nedestruktivní analýza vláken, pigmentů, inkoustů), mikro-ATR (analýza drog, pigmentů) nebo mikro-RS (analýza pigmentů, inkoustů).

Tyto metody poskytují možnost zkoumat vzorky do ještě většího detailu, vzorek prověří strukturně i spektrálně, jsou schopny rozlišit jednotlivá absorpční spektra komplexního mikroskopického obrazu. Nevýhodou MSF metod je horší opakovatelnost měření. <sup>[32]</sup>

### 3.8. Plynová chromatografie

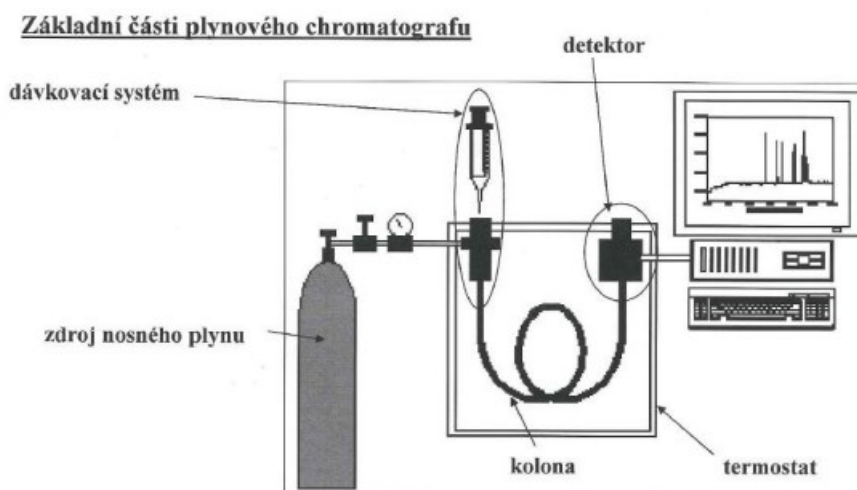
#### 3.8.1. Princip metody

Plynová chromatografie (gas chromatography, GC) je metoda analýzy vzorků založená na převedení vzorků do plynné fáze a teplotní separaci odlišného obsahu vzorku. Zkoumané vzorky mohou mít plynné, kapalinné i pevné skupenství. GC má velmi široké využití, je vhodná ke studiu anorganických i organických látek, k identifikaci léčiv a drog, rozpouštědel, příměsí, a to i ve stopových koncentracích. Zcela běžně se také používá jako předběžná metoda k oddělení složek pro jiné testy. <sup>[33]</sup>

Přístroj je složen z následujících komponent:

Zdroj nosného plynu: tlaková lahev s heliem, vodíkem, dusíkem nebo argonem. Plyn musí být inertní a extrémní čistoty (min. 99,99 %). Plyn je mobilní fáze vedoucí vzorek GC kolonou.

Dávkovací systém: tudy se malé, přesně definované množství zkoumaného vzorku vpravuje do systému. Analyzované vzorky musí mít plynný charakter, takže pevné látky se nejdříve rozpouštějí v rozpouštědle (dostaneme kapalný vzorek) nebo se zahřívají, čímž se získá volatilní (plynná) složka vzorku. Kapalina se před vstupem do kolony nejprve musí ve vyhřívané nástříkové komoře odpařit.



Obr. 9: Jednoduché schéma plynové chromatografie.

Kolona: v ní je umístěna stacionární fáze, která zapříčiní separaci vzorku hnaného mobilní fází (nosným plynem) na jednotlivé chemické složky na základě rozdílných chemických a fyzikálních vlastností, tyto rozdělené fragmenty vzorku potom putují kolonou s rozdílnou rychlostí. Existují dva typy kolon: náplňová – velmi tenká trubice (jednotky mm) o délce v řádech jednotek metrů, vyplněná sloupcem jemně zrněné stacionární fáze. Kapilární kolona je o něco širší trubice (desetiny mm) s délkou v desítkách metrů. Stacionární fází je tenká vrstva na vnitřní stěně kapiláry ve formě adsorbentu, nosiče s kapalinou, nebo filmu kapaliny. [33]

Detektor: zachycuje a digitalizuje signál z jednotlivých chemických podsložek vzorku postupně přicházejících z kolony. Existuje celá řada detektorů specializovaných na konkrétní látky. Např. plameno-ionizační (FID) detektor se širokým rozsahem a vysokou citlivostí na uhlíkaté sloučeniny, tepelněvodivostní detektor detekující všechny látky s nižší citlivostí, detektor elektronového záchytu (ECD) pro detekci halogenů, plamenofotometrický detektor pro detekci sirných nebo fosfor obsahujících látek aj.

Analýza: vyhodnocení chromatogramu, což je soubor všech signálů z detektoru v podobě řady „píků“. Časový průběh a intenzita jednotlivých signálů se porovná s referenčními látkami a přesně se identifikují jednotlivé chemické složky i jejich koncentrace. <sup>[33]</sup>

### 3.8.2. Výhody a nevýhody plynové chromatografie

GC je hlavní analytickou metodou pro separaci volatilních látek – plynů, kapalin i pevných látek (organických sloučenin). GC je rychlá, poměrně jednoduchá, opakovatelná, díky široké nabídce specializovaných detektorů má široké spektrum využití a přináší precizní kvantitativní výsledky. Velkým pozitivem je schopnost odlišit i jednotlivé složky velmi komplexních sloučenin.

Nevýhoda GC je, že je omezená na volatilní vzorky, které nesmí vlivem tepla degradovat. Nosný plyn musí být velmi čistý, popř. se musí dočistit. Detektory musí být nosným plynem neustále promývány, nesmí se k nim dostat kyslík, aby neoxidoval jejich povrch a nepoškodily se. GC je většinou destruktivní metodou (záleží na použitém detektoru) a nelze ji použít k separaci těžkých makromolekul vzhledem k nutnosti volatility složek. <sup>[33]</sup>

### 3.9. Kapalinová chromatografie

Kapalinová chromatografie (LC) je metoda látkové separace podobná GC, ale namísto nosného plynu využívá jako mobilní fázi kapalinu. Logicky tedy



nezahrnuje nutnost odpaření vzorků, namísto toho musí být kapalné. Tento princip využívá vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC).

LC můžeme rozdělit podle mechanismu separace na adsorpční (liquid-solid, LSC, popř. liquid-liquid, LLC), gelovou (gel permeation, GPC), ionexovou (ion-exchange, IEC) aj. LSC využívá k separaci interakce molekul vzorku s povrchem sorbentu, LLC interakce se zafixovanou stacionární fází. GPC využívá různé velikosti částic a velikosti pórů analytického gelu a IEC funguje na principu interakce s nabitým nosičem a následné separace iontů ze vzorku. [34]

### 3.9.1. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

HPLC je extrémně účinná metoda látkové separace organických látek, jako jsou kyseliny, bílkoviny, léčiva, drogy, různé metabolity apod. Využívá se i při analýze PBR. Ve srovnání s klasickou sloupcovou chromatografií je separace látek mnohem efektivnější. Většina analytických separací nízkomolekulárních látek se provádí touto metodou. Zkoumané vzorky musí být rozpustné ve vodě nebo v organických rozpouštědlech.

HPLC systém je podobný GC systému. HPLC ale vzhledem k využití obsahuje pumpu s odplyňovačem mobilní fáze. Pumpa může mít různý počet přívodných kanálů s nosnou kapalinou podle vybraného typu eluce. Isokratická eluce znamená, že složení mobilní fáze bude konstantní po dobu separace, což vede ke stabilní základní linii chromatogramu, ale také k širším píkům později eluovaných frakcí. Isokratické čerpadlo tvoří vysoký tlak, je pouze jednakanálové a mobilní fáze se musí předem připravit a promíchat. Složení mobilní fáze je stejné po celou dobu měření. Nevýhodou je nutnost neustále proplachovat kolonu rozpouštědlem pod vyšším tlakem, aby se pročistila od všech složek. [35]

U gradientové eluce je proměnlivé složení mobilní fáze a vede k tomu, že píky na chromatogramu jsou užší a také může být dosaženo separací složek nižších koncentrací, kterých bychom s isokratickou elucí nedosáhli. Gradientní eluce probíhá rychleji. Nevýhodou je drift základní linie, nezbytný čas na

vyčištění kolony na originální složení kapaliny a nemožnost použití některých detektorů. U gradientové eluce se používá buď kvarterní nízkotlaké gradientové čerpadlo, které je čtyřkanálové a tvořená směs až ze čtyř rozpouštědel je softwarově ovládaná a proměnlivá v čase. Druhým typem pumpy je binární vysokotlaké gradientové čerpadlo, které má dva kanály. Až čtyři různé mobilní fáze se posléze mísí ve směšovacím ventilu. [35]

Stacionární fáze mohou mít podobně jako u GC podobu adsorbentů nebo jsou zakotvené na nosiči. Mobilní fází je nejčastěji voda, mohou se použít i organická rozpouštědla a jejich směsi. Vzorek je dávkován do kolony pod vysokým tlakem, interaguje s oběma fázemi. Dále je veden do chromatografické kolony spojené s detektorem. Eventuálně může být zapojen ještě sběrač separovaných frakcí. [35]

#### Výhody a nevýhody HPLC

HPLC je vysoce univerzální, robustní, účinná, přesná, rychlá a opakovatelná metoda separace a analýzy méně těkavých kapalných a tuhých látek organické povahy rozpustných ve vodě nebo v organických rozpouštědlech. Je z většiny zautomatizovaná, takže je poměrně nenáročná na provedení. Je vhodná pro materiál citlivý na vyšší teploty (kontrast s GC).

Nevýhodou je, že je to velmi drahá metoda („high-priced LC“) a nehodí se pro všechny typy vzorků, navíc v případě vyskytlého problému je zapotřebí mít hlubší znalosti k „troubleshootingu“. [35]

#### 3.10. Chromatografie na tenké vrstvě

Chromatografie na tenké vrstvě (thin layer chromatography, TLC) je snadnou a rychlou metodou analýzy vzorků. Opět obsahuje mobilní a stacionární fázi, se kterými vzorek interaguje. TLC se využívá např. pro analýzu barvených vláken. [36]

Stacionární fáze je opět sorbent (nejčastěji silikagel), kterým je potažena skleněná, hliníková nebo plastová destička. Mobilní fázi tvoří organické

rozpouštědlo (ethanol, chloroform s ethanolem). Na destičce se označí horizontální čarou vespod místa nanesení vzorků. Kapky testovaných vzorků se aplikují na definované místo a destička se vloží do vyvíjecí komory s malým množstvím mobilní fáze (hladina musí být těsně pod nanesenými vzorky). Komora se musí rychle zavřít, protože organické solventy se rychle odpařují. Rozpouštědlo začne vzlínat po destičce vzhůru, interaguje se vzorky a separuje jednotlivé složky podle afinity k solventu. Jakmile mobilní fáze dosáhne cca 1 cm pod horní okraj destičky, destička se vyndá a rychle se označí, kam rozpouštědlo doputovalo. Poté se rozložené vzorky vizualizují např. pod UV lampou nebo se provádí speciální nástřik pro zviditelnění aminokyselin apod., někdy jsou rozložené vzorky barevné a viditelné pouhým okem. Poté se měří retenční faktor, což je poměr vzdálenosti doputovaného vzorku ku vzdálenosti, kam doputoval solvent. Retenční faktor je poměrně charakteristický pro každou látku.

Silikagel je velmi polární, proto vzorky spíše vespod budou více polární, protože byly atrahované k silikagelu. Naopak vzorky, co vystoupaly výše jsou spíše méně polární.

TLC je velmi rychlá, levná a jednoduchá orientační metoda pro určení přítomnosti nevolatilních látek ve vzorku. Nevýhodou je, že funguje pouze pro nevolatilní látky a musí se vybrat vhodné rozpouštědlo, aby se v něm vzorek nerozpouštěl až příliš, a tak celý vyvzlínal spolu s rozpouštědlem. <sup>[36]</sup>

### 3.11. Hmotnostní spektrometrie

#### 3.11.1. Princip hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie (mass spectrometry, MS) je kvalitativní i kvantitativní analytická metoda komplementární k mnoha metodám, obzvlášť separačním (GC-MS, LC-MS). Je také vhodná např. k IR spektroskopii pro detailnější interpretaci vzorku (někdy nelze určit strukturu na samotném IR spektru). Z názvu vyplývá, že se užívá ke stanovení hmotnosti částic, ale také prvkového složení a pro objasnění chemických struktur vzorku. MS lze použít

volatilní vzorky, pro méně volatilní vzorky se musí rozpustit ve vhodném solventu. MS je ideální pro komplexní analýzu léčiv a metabolitů, analýzu drog a řady dalších látek. [37]

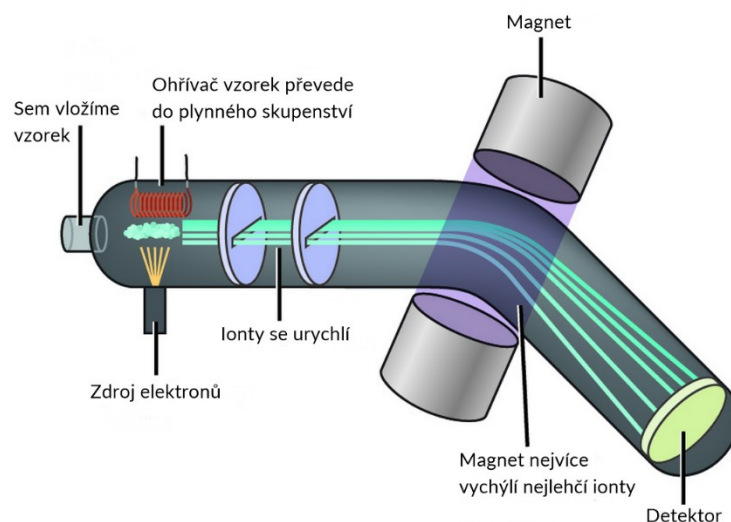
Princip MS je založen na ionizaci separovaných složek vzorku primárním proudem elektronů a jejich rozlišení podle intenzity poměru hmotnosti a náboje ( $m/z$ ). Metoda pracuje se vzorky ve vysokém vakuu pro odstranění kolize rychle proudících vzorků s molekulami kyslíku. Molekuly se vždy rozpadají stejně vlivem chemické struktury. Hmotnostní spektra lze následně porovnat s databází známých spekter.

Hmotnostní spektrometr obsahuje iontový zdroj ionizující molekuly vzorku, iontovou optiku akcelerující ionty a zaměřující je do paprsku, hmotnostní analyzátor rozdělující plynné ionty podle  $m/z$  poměru a detektor detekující ionty podle  $m/z$  a určující jejich relativní intenzitu.

Techniky ionizace molekul jsou různé, tzv. tvrdé ionizační techniky (EI) dodají iontům nadbytek vnitřní energie, takže se rozpadá na menší fragmenty. Měkké ionizační techniky dodají molekule menší energii, takže je ve spektru viditelné minimum fragmentů. Ionizační technika se vybírá podle vlastností vzorku a podle separační metody.

Analyzátor rozděljuje ionty podle  $m/z$ . Existuje řada druhů analyzátorů (kvadrupólový, průletový, magnetický sektorový). Podle způsobu rozdělení částic se dělí na skenující, iontové pasti, průletové a na analyzátory pohyblivosti iontů, které využívají několik fyzikálních principů jako např. zakřivení dráhy letu v magnetickém/elektrickém poli, doba rychlosti letu atp.

Detektor následně naměří všechny hodnoty  $m/z$  a převede je do digitální podoby. Signál všech přítomných iontů je dále zpracován Fourierovou transformací a získávají se data koncentrace každého iontu v reálném čase. [37]



Obr. 10: Znárodnění základního mechanismu hmotnostního spektrometru.

### 3.11.2. Výhody a nevýhody MS

Mezi výhody MS patří extrémně vysoká citlivost, automatizace a možnost „large scale“ analýzy. Je to komplexní kvalitativní a kvantitativní analýza schopná identifikovat neznámé komponenty a potvrdit přítomnost známých. Odlišuje i příbuzné molekuly na základě molekulové hmotnosti, a přitom spotřebuje velmi nepatrné množství vzorku.

Mezi její nevýhody patří velmi drahá pořizovací cena a celkový provoz. Navíc se řadí mezi destruktivní metody, což může být při forenzní analýze problematické. Není moc silná v identifikaci uhlovodíků, které produkují stejné ionty, stejně tak neodliší izomery molekul. Tomuto se dá zamezit použitím vhodné kombinace metod (např. GC-MS).<sup>[37]</sup>

## 4. Kritické zhodnocení metod ve zkoumání mikrostop

Samotná podstata mikrostop vyžaduje při jejich analýze použití velmi citlivé analytické testy. Některé jsou však natolik precizní, že se můžeme potýkat

s problematickým určením toho, co je ještě relevantní informace pro řešenou kriminální činnost, a co s ní už nesouvisí. Je třeba být obezřetní ve správné interpretaci výsledků a získávání podstatných informací. [3]

Zkoumání vzorků převážně pro určení jejich morfologických struktur se provádí metodami optické mikroskopie a skenovací elektronové mikroskopie (např. technologie výroby vláken). Pokud se SEM rozšíří o metodu EDXS, lze zkoumat i materiálové složení. Takto se zkoumají např. hutnická vlákna. Výhodou EDXS oproti např. XRD je jednoduchost, není potřeba velké expertízy ani mnoho informací o vzorku. Nevýhodou metody je množství pozorovaných artefaktů a poměrně malé rozlišení.

Sofistikované konfirmační testy zahrnují metody separace, identifikace, detailní charakterizace prvkového složení a koncentrací jednotlivých složek vzorků mikrostop. Obvykle je to dvoustupňový proces.

Spektroskopické metody zahrnují interakci mezi paprskem elektromagnetického záření (fotony světla) a atomy zkoumaného materiálu. Spektroskopická analýza slouží k rychlé analýze, z čeho je vyroben např. vzorek vlákna. Kriminalistické laboratoře tyto metody upřednostňují, protože nepotřebují přípravu vzorků před experimentem a jsou nedestruktivní. IR spektrometrie, RTG spektrometrie, Ramanova spektroskopie a mikrospektrofotometrie jsou metody široce používané k charakterizaci a srovnání vzorků barviv, laků, nátěrů, polymerů atp. Nicméně je potřeba mít referenční vzorek k určení přesné identity barviva, proto je vhodné je doplnit specifitějšími metodami.

Chromatografické metody fungují na principu separace vzorků podle jejich fyzikálně-chemických vlastností. Mezi nepoužívanější metody k separaci sloučenin ve vzorku patří jednoznačně LC a GC. Jejich nevýhodou je vysoká cena přístrojů a jejich chodu. LC je upřednostňovanější ve většině laboratoří, protože je oproti GC univerzálnější, extrémně rychlá a účinná, navíc pro analýzu stačí opravdu miniaturní množství vzorku, i když ani GC není náročná na jeho objem. Naopak GC je vhodnější metodou pro separaci vzorků volatilní povahy. Nicméně jsou to metody destruktivního charakteru. Mobilní fáze v LC navíc obsahují látky toxické pro životní prostředí. V tomto má výhodu „zelenější“ GC,

kteřá jako mobilní fázi využívá nejčastěji vodík nebo helium. Pokud se metody kombinují např. s infračervenou spektroskopií nebo hmotnostní spektrometrií, vzniká silná kombinace ke specifické detekci a identifikaci jednotlivých složek vzorků.

TLC je opět destruktivní metodou, která srovnává barviva a polymery. Jedna z mála dostatečně senzitivních metod k detekci a separaci miniaturního množství barviv obsažených ve vláknech, a zároveň je extrémně jednoduchá a levná. Analýza barviv je však omezená kvůli nutnosti komparace s knihovnou známých vzorků, retenční faktor není pro identifikaci látek dostatečným ukazatelem. Slabým místem TLC je řada faktorů ovlivňujících opakovatelnost experimentu jako je výběr vhodné destičky, stabilita mobilního nosiče, pre-eluce apod.

Po separaci jednotlivých složek vzorků následuje detailní spektrometrické měření k identifikaci každé složky porovnáním jejího chemického podpisu s referenčními materiály. MS je nebo není destruktivní podle způsobu ionizace. Velmi detailně charakterizuje organické látky.

Existují různé kombinace chromatografických a spektrometrických metod, jedna z nejběžnějších je kombinace plynové chromatografie/hmotnostní spektrometrie (GC/MS). Ta má zvláštní význam v separaci, identifikaci a kvantifikaci např. vzorků drog. Není ale vhodná pro analýzu všech vzorků (např. vlákna). V poslední době se ale stává metodou hlavní volby tandemová hmotnostní spektrometrie (MS-MS) v kombinaci např. s LC (LC-MS/MS). Poskytují ještě větší citlivost a flexibilitu pro detekci větších a polárních sloučenin, které je obtížné nebo nemožné analyzovat metodami „prosté“ plynové chromatografie. Při MS-MS se dějí dvě částicové fragmentace za sebou. První fragmentační reakce vygeneruje ionty, z těch se vybere konkrétní iont našeho zájmu. Ten se následně podrobí druhé fragmentaci a z něj vzniklé dceřiné ionty se analyzují. Fragmentace, přesněji děj kolizní disociace, jsou srážky s kolizním plynem, nejčastěji argonem.

Analytická chemie poskytuje kvalitativní i kvantitativní údaje, které jsou nutné k zodpovězení důležitých otázek původu vzorku a jeho významu ve vztahu s místem činu.

## 5. Závěr

Tato práce se zabývá tématem významných metod kriminalistické chemie spojených s analýzou, identifikací a charakterizací mikrostop. Protože je to velmi složité téma, vybrala jsem si k rozboru několik důležitých metod, kterým jsem poskytla přímo úměrně prostor podle významnosti při zkoumání mikroskopického forenzního materiálu.

Téma jsem si vybrala poměrně ambiciózně vzhledem k tomu, že nepracuji na žádném pracovišti Policie ČR, natož na Kriminalistickém Ústavu nebo OKTE. Nicméně téma mikrostop a kriminalistika celkově je natolik zajímavá oblast, že mi stálo za to potýkat se s velkým množstvím zdrojů a nových informací, založených převážně na technických principech fungování velmi složitých přístrojů. Snahou této bakalářské práce je zevrubný, ale nevyčerpávající popis principů důležitých analytických metod a jejich vzájemné srovnání.

Techniky pro chemickou analýzu se neustále posouvají dopředu ruku v ruce s vědeckým pokrokem a našimi stále se rozšiřujícími se vědomostmi o zákonitostech ve světě mikroskopických struktur. To, co bylo ještě před několika dekádami nemyslitelné, je nyní dosažitelné ve standardně vybavené chemické laboratoři i s přípravou vzorku v řádech desítek minut. Tyto metody již v současnosti poskytují minimum prostoru pro nerozluštěné kriminální činy.



## BIBLIOGRAFIE

- [1] Musil, Jan, Konrád, Zdeněk a Suchánek, Jaroslav. Kriminalistika. Vydání prvnı. Praha: C. H. Beck, 2001. 512 stran. ISBN 9788071793625.
- [2] Bell, Suzanne. Forensic chemistry [online]. Vydání druhé. Essex. Pearson. c2014 [cit. 2022-02-22]. Počet stran: 616. ISBN 13: 9781292020440. Dostupné z: <https://appsucc.library-gh.net>
- [3] Straus, Jirı, Suchánek, Jaroslav, Porada, Viktor. KRIMINALISTICKÉ STOPY OBSAHUJCı INFORMACı O VLASTNOSTECH VNITRNı STAVBY (STRUKTURY) NEBO VNITRNıHO SLOZENı OBJEKTU [online]. Policejní akademie R Praha, c2004 [cit. 2022-02-24] Dostupné z: <http://www.sinz.cz/archiv/docs/si-2004-03-131-145.pdf>
- [4] Cherny, G. (2020). Microtraces in the system of criminal characteristics of terrorist nature crimes. *Suchasni Problemy Kryminalistyky*, 60–72. <https://doi.org/10.32353/khrife.2.2020.05>
- [5] Trace Evidence Recovery Guidelines. National Institute of Standards and Technology [online]. [cit. 2022-02-25] Dostupné z: [https://www.nist.gov/system/files/documents/2016/09/22/trace\\_evidence\\_recovery\\_guidelines.pdf](https://www.nist.gov/system/files/documents/2016/09/22/trace_evidence_recovery_guidelines.pdf)
- [6] Policie R [online]. Praha: Policie R, 2021 [cit. 2022-02-25]. Dostupné z: <https://www.policie.cz/clanek/prirodovedne-zkoumani>
- [7] Matusiewicz, Henryk, Bulska, Ewa. Inorganic trace analytics. [online] De Gruyter 2018. ISBN: 9783110366730. Dostupné z: <https://books.google.cz/>
- [8] Jedlička, Jaroslav. Povystfelove zplodiny a možnosti jejich využití v kriminalistické praxi. [online] [cit. 2022-02-25] Dostupné z: <https://kriminalistika.eu/balistika/zplodiny.html>
- [9] Abdul-Karim, N., Blackman, C. S., Gill, P. P., Wingstedt, E. M. M., & Reif, B. A. P. (2014). Post-blast explosive residue-a review of formation and dispersion theories and experimental research. *RSC Advances*, 4(97), 54354–54371. <https://doi.org/10.1039/c4ra04195j>
- [10] Perr, J. M., Furton, K. G., & Almirall, J. R. (2005). Solid phase microextraction ion mobility spectrometer interface for explosive and taggant detection. *Journal of Separation Science*, 28(2), 177–183. <https://doi.org/10.1002/jssc.200401893>
- [11] Kruszelnicki, Karl. Tagging explosives. [online] [cit. 2022-02-26] Dostupné z: <https://www.abc.net.au/science/articles/1999/08/06/42124.htm>
- [12] Paint. Bureau of Criminal Apprehension. [online] Minnesota Department of Public Safety. [cit. 2022-02-26] Dostupné z: <https://dps.mn.gov/divisions/bca/bca-divisions/forensic-science/Pages/trace-paint.aspx>
- [13] Vichlenda, Milan. Kriminalistika. [online] Strednı odborna kola ochrany osob a majetku s.r.o. Karvina, 2011. [cit. 2022-02-26] Dostupné z: <https://www.sosoom-zlin.cz/media/skripta/kriminalistika.pdf>
- [14] Dowell, F. E., Maghirang, E. B., Fernandez, F. M., Newton, P. N., & Green, M. D. (2008). Detecting counterfeit antimalarial tablets by near-infrared spectroscopy. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 48(3), 1011–1014.

<https://doi.org/10.1016/j.jpba.2008.06.024>

[15] Baumeister, D., Tojo, L. M., & Tracy, D. K. (2015). Legal highs: Staying on top of the flood of novel psychoactive substances. *Therapeutic Advances in Psychopharmacology*. <https://doi.org/10.1177/2045125314559539>

[16] Adatsi, F. K. (2014). *Forensic Toxicology. Encyclopedia of Toxicology: Third Edition* (Third Edition, Vol. 2). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386454-3.00387-0>

[17] Evidence that may be collected. [online] National Forensic Science Technology Center, 2013. [cit. 2022-02-26] Dostupné z: <http://www.forensicsciencesimplified.org/drugs/how.html>

[18] Maskell, P. D., & Jackson, G. (2020). Presumptive drug testing—The importance of considering prior probabilities. *WIREs Forensic Science*, 2(4). <https://doi.org/10.1002/wfs2.1371>

[19] Turková, Ivana. Analýza vláken a biologických objektů, mikrostopy. [online] VŠCHT 2013. [cit. 2022-02-27] Dostupné z: <https://docplayer.cz/104657830-Analyza-vlaken-a-biologicky-objektu-mikrostopy.html>

[20] Kostelanská, Klára, Gajdziok, Jan. Elektronová mikroskopie pro předmět „Instrumentální analytické metody ve farmaceutické technologii“. [online] Brno 2017. Dostupné z: <https://docplayer.cz/110961010-Veterinari-a-farmaceuticka-univerzita-brno-elektronova-mikroskopie-pro-predmet-instrumentalni-analyticke-metody-ve-farmaceuticke-technologie.html>

[21] Scanning electron microscopy coupled with Energy Dispersive X-ray (SEM/EDX) Spectroscopy. [online] Western University 2021. [cit. 2022-02-26] Dostupné z: <https://www.surface-science-western.com/analytical-services/scanning-electron-microscopy-coupled-with-energy-dispersive-x-ray-sem-edx-spectroscopy/>

[22] Energy dispersive X-ray spectroscopy (EDS). [online] Materials evaluation and engineering, Inc. 2021. [cit. 2022-02-26] Dostupné z: <https://www.mee-inc.com/hamm/energy-dispersive-x-ray-spectroscopyeds/>

[23] Nanakoudis, Antonis. EDX Analysis with SEM: How does it work? [online] ThermoFisher Scientific, 2019. [cit. 2022-02-26] Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/blog/microscopy/edx-analysis-with-sem-how-does-it-work/>

[24] Henry, Darrell, Goodge, John. Wavelength-Dispersive X-Ray Spectroscopy. [online] Science Education Resource Center at Carleton College, 2016. [cit. 2022-02-26] Dostupné z: [https://serc.carleton.edu/research\\_education/geochemsheets/wds.html](https://serc.carleton.edu/research_education/geochemsheets/wds.html)

[25] Rentgen-fluorescenční spektrometrie (XRF). [online] Masarykova univerzita, 2017. [cit. 2022-02-26] Dostupné z: [https://is.muni.cz/el/sci/podzim2017/C6920/um/XRFLIBS\\_teorie.pdf](https://is.muni.cz/el/sci/podzim2017/C6920/um/XRFLIBS_teorie.pdf)

[26] Venkateshaiah, Abhilash, Nutenki, Rajender, Kattimuttathu Suresh. X-ray diffraction spectroscopy of polymer nanocomposites. *Spectroscopy of Polymer nanocomposites*. 2016. Str 410-451.

[27] Kania, Patrik. Infračervená spektrometrie. [online] VŠCHT Praha, [cit. 2022-02-26] Dostupné z: <https://www.vscht.cz/files/uzel/0005766/Infra%C4%8Derven%C3%A1+spektrometrie.pdf>

- [28] Petit, S. Fourier Transform Infrared Spectroscopy. [online] Handbook of Clay Science, 2006. [cit. 2022-02-27] Dostupné z: <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S1572435205010329>
- [29] Ferrari, M., Mottola, L., & Quaresima, V. (2004). Principles, techniques, and limitations of near infrared spectroscopy. In *Canadian Journal of Applied Physiology* (Vol. 29, pp. 463–487). <https://doi.org/10.1139/h04-031>
- [30] Berry, David. Ultra-violet and visible spectroscopy. [online] University of Victoria, 2005. [cit. 2022-02-26] Dostupné z: <http://web.uvic.ca/~berryde/techniques/uvvis.pdf>
- [31] Wolverson, D. (2008). *Raman spectroscopy. Characterization of Semiconductor Heterostructures and Nanostructures*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53099-8.00008-7>
- [32] Reffner, J. A. (2017). Microspectroscopy in Forensic Science. *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, 1–17. <https://doi.org/10.1002/9780470027318.a1117.pub2>
- [33] Zachař P., Sýkora D. Plynová chromatografie. [online] Ústav analytické chemie VŠCHT, 2019. [cit. 2022-02-26] Dostupné z: <http://old.vscht.cz/anl/lach2/GC.pdf>
- [34] Liquid chromatography. [online] Linde 2022. [cit. 2022-02-26] Dostupné z: [http://hiq.linde-gas.com/en/analytical\\_methods/liquid\\_chromatography/index.html](http://hiq.linde-gas.com/en/analytical_methods/liquid_chromatography/index.html)
- [35] Horváth, Csaba. High-Performance Liquid Chromatography: Advances and Perspectives. [online] Elsevier, 2013 [cit. 2022-02-28] Dostupné z: <https://books.google.at/>
- [36] Coufal, Pavel. Thin Layer Chromatography, TLC [online] Katedra analytické chemie PřFUK, 1996. [cit. 2022-02-26] Dostupné z: <https://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/tlcpc.html>
- [37] Friedecký, D., & Lemr, K. (2012). Úvod do hmotnostní spektrometrie. *Klinická Biochemie a Metabolismus*, 20(3), 152–157.

## GRAFICKÁ DÍLA

- [1, 2] [researchgate.net](https://www.researchgate.net)
- [3, 4] Matusiewicz, Henryk, Bulska, Ewa. Inorganic trace analytics.
- [5, 6] [tekstilsayfasi.blogspot.com/2013/01/cotton-fibres.html](http://tekstilsayfasi.blogspot.com/2013/01/cotton-fibres.html)
- [7] [chem.ucla.edu/~harding/IGOC/R/rayon.html](http://chem.ucla.edu/~harding/IGOC/R/rayon.html)
- [8] [legacyias.com/detecting-rna-virus-using-raman-spectroscopy](http://legacyias.com/detecting-rna-virus-using-raman-spectroscopy)
- [9] [fzp.ujep.cz/ktv/uc\\_texty/1IAME/8%20IAME-GC.pdf](http://fzp.ujep.cz/ktv/uc_texty/1IAME/8%20IAME-GC.pdf)
- [10] [cs.khanacademy.org](http://cs.khanacademy.org)