

Univerzita Palackého v Olomouci

Přírodovědecká fakulta

Katedra fyzikální chemie

**Srovnání přípravy luminolu podle Grodského a Webera
(detekce krevních skvrn)**

Bakalářská práce

Vypracovala:

Marianna Krupová

Studijní obor:

Management v chemii

Vedoucí práce:

Mgr. Bancířová Martina ,Dr

Olomouc, květen 2011

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a pod vedením Mgr. Bancířová Martina, Dr, na katedře fyzikální chemie s využitím pouze uvedených pramenů a literatury v příloženém seznamu.

V Olomouci dne 11.5.2011

Marianna Krupová

Poděkování

Chtěla bych poděkovat vedoucí své bakalářské práce Mgr. Bancířové Martině, Dr za odborné vedení, připomínky a za pomoc při tvorbě této práce. Také bych chtěla poděkovat svým rodičům za jejich podporu a pomoc při mém studiu.

Obsah

Bibliografická identifikace.....	6
1. Úvod.....	8
2. Teoretická část.....	9
2.1. Luminiscence.....	9
2.1.1. Luminofory.....	10
2.2 Chemiluminiscence.....	10
2.2.1. Přímá a nepřímá chemiluminiscence.....	11
2.3. Luminol.....	12
2.3.1. Chemiluminiscence luminolu.....	13
2.4. Medicínsko-právní vyšetřovací technika detekce krevních stop – historie a vývoj.....	14
2.4.1. Luminolový test.....	15
2.5. Krev.....	15
2.5.1. Hemoglobin.....	16
2.6. Reakce sloučeniny luminolu s krevní skvrnou.....	17
3. Experimentální část.....	18
3.1. Chemikálie.....	19
3.1.1. Úprava vzorku.....	20
3.2. Experimentální vybavení.....	20
3.3. Příprava měření.....	21
3.3.1. Příprava CL směsi luminolu.....	21
3.4. Detekce krevních vzorků Luminolem I a Luminolem II.....	23
4. Výsledky a diskuze.....	23
4.1. Detekce krevních stop pomocí čerstvě připravených směsí Luminol I a Luminol II na krevních stopách.....	25
4.2. Detekce krevních stop Luminolem I a Luminolem II po 24 hodinách uskladnění CL směsi luminolu v ledničce (-4 °C).....	27
4.3. Detekce krevních stop Luminolem I a Luminolem II po 7 dnech uskladnění CL směsi luminolu v ledničce (do 4 °C).....	30

4.4. Detekce krevních stop Luminolem I a Luminolem II po 4 týdnech uskladnění CL směsi luminolu v ledničce (- 4 °C).....	32
4.5 Detekce krevních stop Luminolem I a Luminolem II po 4 týdnech uchování CL směsí luminolu v mrazáku (-18 °C).....	35
4.6. Náklady na chemikálie pro detekce pomocí Luminolu I a Luminolu II.....	37
4.6.1. Náklady na pořízení chemikálií.....	37
4.6.2. Srovnání Luminolu I, Luminolu II a Bluestar® Forensic tablets.....	38
5. Závěr	43
6. Summary	45
7. Literatura	46

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora:	Marianna Krupová
Název práce:	Srovnání přípravy luminolu podle Grodského a Webera (detekce krevních skvrn)
Typ práce:	Bakalářská
Pracoviště:	Katedra fyzikální chemie
Vedoucí práce:	Mgr. Banciřová Martina ,Dr
Rok obhajoby práce:	2011
Abstrakt:	<p>V kriminalistice se chemiluminiscenční reakce luminolu stala jednou z nepostradatelných metod využívaných k detekci krve. V této práci byl detekován vzorek, obsahující krevní stopy, pomocí CL směsí luminolu navržených podle Grodského a Webera. Porovnávala se citlivost těchto dvou CL směsí. Krevní vzorek byl zředěn postupným ředěním 100x, 500x, 1 000x, 5 000x, 10 000x, 50 000x, 100 000x, 500 000x. Celé měření proběhlo pomocí přístroje Fluoroskan Ascent FL. Porovnávaly se i náklady na chemikálie potřebné pro tyto dvě detekce.</p>
Klíčová slova:	Chemiluminiscence, luminol, Grodsky, Weber, detekce krevních skvrn
Počet stran:	48
Počet příloh:	0
Jazyk:	čeština

Bibliographical identification:

Author's first name and surname: Marianna Krupová

Title: Luminol preparation by Grodsky and Weber – The comparison (blood stain detection)

Department: Department of Physical Chemistry

Type of thesis: Bachelor

Supervisor: Mgr. Banciřová Martina ,Dr

The year of presentation: 2011

Abstract: Luminol chemiluminescence reaction has become one of the most common methods used to detect blood in the crime scene. The mixture of luminol was improved. In this study, a blood sample was detected with the help of mixture of luminol. These luminol mixtures were designed by Grodsky and Weber. A blood sample was diluted by the gradual dilution of 100x, 500x, 1 000x, 5 000x, 10 000x, 50 000x, 100 000x, 500 000x. Measurements were performed with instruments Fluoroskan Ascent FL. In the economic part, there was a comparison of the cost of the chemicals that were used for detection.

Keywords: Chemiluminescence, luminol, Grodsky, Weber, blood stain detection

Number of pages: 48

Number of appendices: 0

Language: Czech

1. Úvod

Cílem této bakalářské práce je srovnání přípravy luminolu podle Grodského a Webera. Luminol je látka, která po smíchání s vhodným oxidačním činidlem vykazuje chemiluminiscenci. Chemiluminiscence luminolu se uplatňuje při stanovení reaktivních forem kyslíku, v medicíně, biochemii a v neposlední řadě i v kriminalistice. V kriminalistice se využívá k detekci krevních stop.

Porovnávala se citlivost dvou chemiluminiscenčních směsí luminolu a to konkrétně Luminol I navržen Grodskym a Luminol II navržen Weberem.

Účinnost obou směsí je porovnávána na krevním vzorku, který je zředěn 100x, 500x, 1 000x, 5 000x, 10 000x, 50 000x, 100 000x a 500 000x. Krev obsahuje červené krvinky (erytrocyty), které obsahují červené krevní barvivo - hemoglobin. V hemoglobinu se jako centrální atom nachází dvojmocné železo, které katalyzuje chemiluminiscenční reakci luminolu. Měření probíhalo při dvou teplotách (25 °C a 35 °C) a pomocí přístroje Fluoroskan Ascent FL.

Detekce krevních vzorků pomocí Luminolu I a Luminolu II byla v této práci prováděna za podmínek, kdy tyto směsi jsou čerstvě připraveny a ihned použity k detekci. Dále jsou směsi použity pro detekci, kdy jsou po dobu 24 hodin skladovány v ledničce (do 4 °C), po dobu 7 dnů v ledničce, po dobu 4 týdnů v ledničce a mrazáku (-18 °C).

Celý experiment je zhodnocen i po ekonomické stránce. Obě detekce jsou porovnány podle svých nákladů na použité chemikálie potřebné k jejich přípravě. Dále jsou tyto náklady srovnány i s komerčně používaným Bluestar® Forensic Tablets.

2. Teoretická část

2.1. Luminiscence

Luminiscence^{1,2} je proces emise elektromagnetického záření. Nastane při relaxaci (přechodu) fotonů z excitovaného stavu na základní hladinu a to proto, že tento excitovaný stav není stabilní.

Jedná se tedy o spontánní neboli samovolné záření. Vyzařování nastává i při nízkých teplotách na rozdíl od tepelného záření. Princip luminiscence lze také popsat jako záření o kratší vlnové délce (větší frekvenci), které vyvolává v látce určitého složení vznik záření o delší vlnové délce (nižší frekvenci). Přechod mezi povolenými stavy atomů se označuje jako fluorescence. Doba trvání záření je pár nanosekund. Na druhé straně je fosforescence, jejíž přechod je zakázaný a vyzáření fotonů může trvat až několik minut.

Luminiscenci^{1,3} je možné rozdělit podle použitého zdroje, který dodá energii k excitaci (přechodu elektronů do vyšší energetické hladiny), aby mohlo dojít k následné emisi. Rozdělení je shrnuto v tabulce 1.

Tabulka 1. Rozdělení luminiscence

Typ luminiscence	Budící zdroj
Fotoluminiscence	UV/VIS záření
Elektroluminiscence	Elektrický proud
Chemiluminiscence	Chemická reakce
Radioluminiscence	Radioaktivní záření
Termoluminiscence	Tepelná energie
Triboluminiscence	Mechanická energie
Sonoluminiscence	Ultrazvuk
Bioluminiscence	Oxidace luciferinu za přítomnosti enzymu luciferázy

2.1.1. Luminofory

Luminiscence nastává u látek, které se označují jako luminofory¹. Jedná se o látky převážně pevné a sloučeniny vytvářející tzv. luminiscenční centra. K těmto látkám patří sulfid zinečnatý, sulfid kademnatý a příměsi stříbra, mědi, hořčíku, železa. Luminofory jsou tedy schopny uchovat dodanou energii a následně ji vyzařovat ve formě světla (luminiscence).

2.2. Chemiluminiscence

To, že někteří živočichové mohou vyzařovat světlo, jsou schopni luminiscence, objevili již lidé v dávné řecké civilizaci.

Chemiluminiscence (CL) byla popsána v roce 1877 Radziszewskim. Sledoval žluté emisní světlo při reakci, kde byl kyslík probubláván v alkalickém alkoholovém roztoku 2, 4, 5 - triphenylimidazole (lophine)¹.

CL^{3,4} je elektromagnetické záření ve formě světla. K vyzáření tohoto světla je nutné dodat reakci energii. V tomto případě energie vzniká z chemické reakce.

Chemická reakce, která produkuje záření, musí splňovat tři základní energetické požadavky⁵:

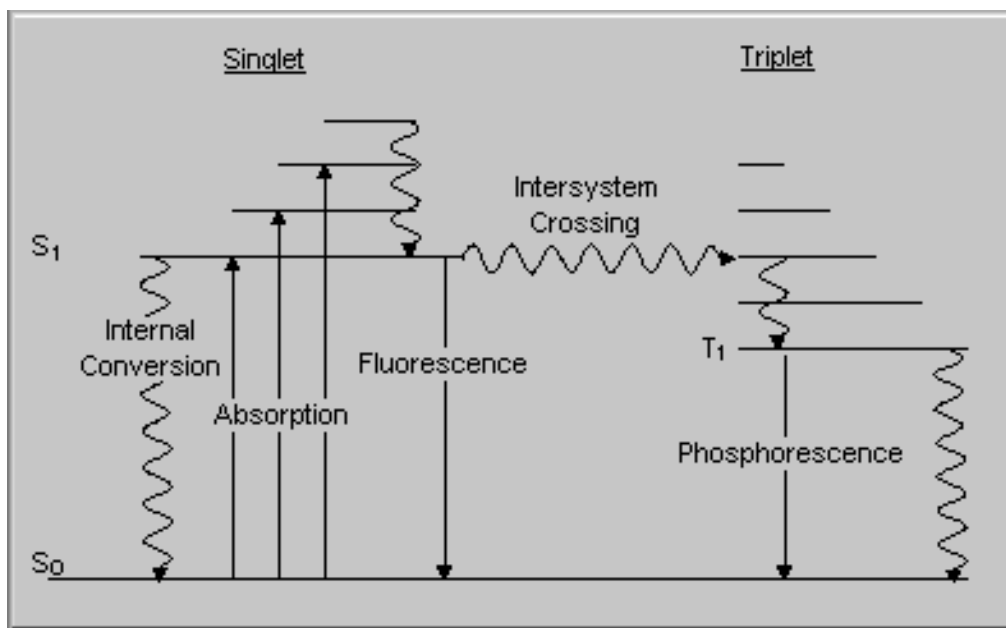
- Reakční cesta by měla být energeticky výhodná pro vytváření excitovaných stavů.
- Reakce musí být exotermní s volnou energií.
Ta by měla být v rozmezí 170 – 300 kJ/mol.
- Chemiluminiscenční emise musí být výhodný deaktivací proces ve vztahu s jinými nezářivými procesy, které mohou být součástí reakce.

Při CL dochází k přesunu elektronů z tripletního excitovaného stavu do singletního, tedy na základní hladinu. Při tomto přechodu dochází k emisi fotonů^{2, 5}. Tento proces obecně popisuje Jablonského diagram. Tento diagram je vyobrazen na obrázku 1^{2,5}.

Zobrazuje děje vedoucí k luminiscenci. Jsou zanedbány jevy jako samozhášení nebo nezářivé energetické přechody. Svislé čáry označují přechody mezi jednotlivými energetickými stavy. S₀ označuje základní stav. S₁ označuje první excitovaný singletní stav.

Na každé z těchto úrovní mohou existovat elektrony v různých vibračních stavech. T_1 je označení pro tripletní stav. Elektrony mohou přejít z S_1 přesmykem do stavu T_1 a následně dochází k emisi při relaxaci z úrovně T_1 na základní úroveň. Tento děj se označuje jako fosforescence.

Intenzita emise je závislá na tom, jak rychlá bude tato reakce a jak rychle budou fotony emitovat.

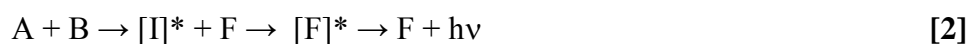


Obr.1. Jablonskeho diagram

2.2.1. Přímá a nepřímá chemiluminiscence

CL probíhá dvěma mechanismy. Přímá CL^{1, 3, 5} je charakterizována reakcí rovnice 1, kde A a B jsou reaktanty, obvykle substrát a oxidační činidlo. Meziproduktem reakce je excitovaný stav $[I]^*$. Z excitovaného stavu následně dochází k emisi fotonů a vzniku produktu. CL reakce luminolu je příkladem přímé CL.

Nepřímá (senzitivovaná) CL^{1, 3, 5} se liší od přímé CL tím, že dochází k přenosu energie z excitovaného stavu $[I]^*$ na sensitizer $[F]^*$ (fluorofor), který poté emituje fotony. Nepřímá CL je znázorněna rovnicí 2.

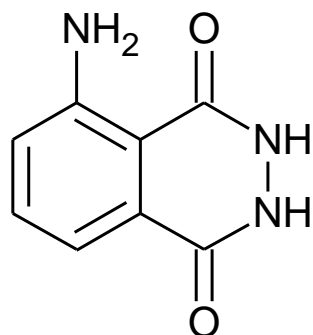


2.3. Luminol

Huntress⁶ publikoval metodu syntézy sloučeniny z kyseliny 3 - nitroftalové a hydrazin sulfátu. Tuto sloučeninu pojmenoval luminol (obrázek 2).

Luminol^{5,6} (5 - amino - 2, 3-dihydro - 1, 4 - phthalazine) je bílá až světle žlutá krystalická pevná látka. Luminol (C₈H₇N₃O₂) je citlivý na světlo a na přítomnost kovových kationtů.

V tabulce 2 je uvedeno několik fyzikálně chemických vlastností luminolu. Luminol je používán, mimo jiné jako látka k detekci krevních stop. Dále se uplatňuje ke stanovení reaktivních forem kyslíku, v medicíně i biochemii.



Obr. 2 Luminol (5 - amino - 2, 3-dihydro - 1, 4 - phthalazine)

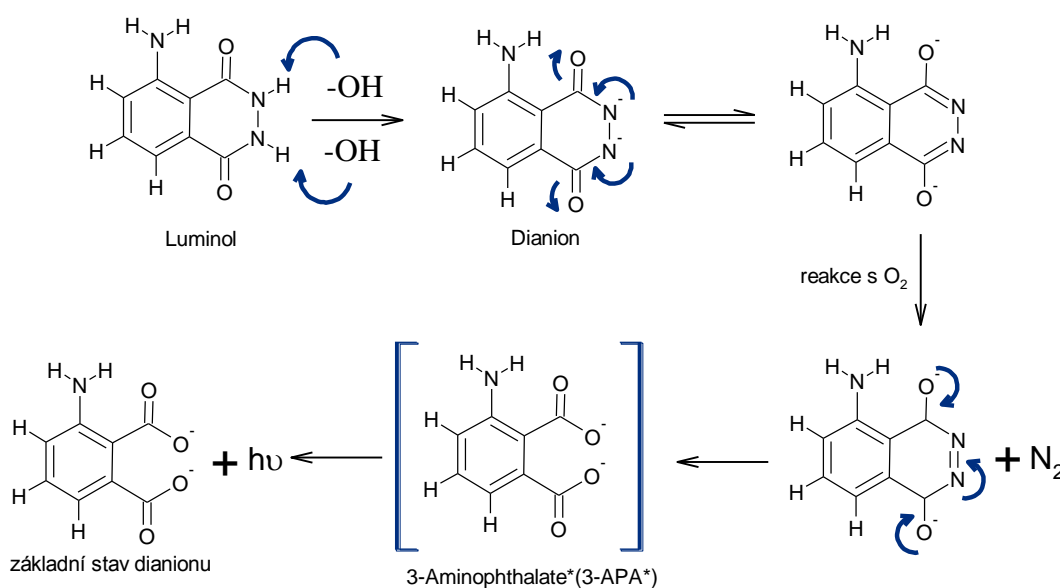
Tabulka 2. Fyzikálně chemické vlastnosti luminolu

Molekulová hmotnost	177,16 g/mol
Bod tání	319 °C; 592 K; 606 °F
pKa1	6,74
pKa2	15,1
Rozpustnost ve vodě	<0,1 g/100 ml za pokojové teploty
Obecné vlastnosti	Stabilní za pokojové teploty, citlivý na světlo, hořlavý

2.3.1. Chemiluminiscence luminolu

Chemiluminiscenční reakce obvykle zahrnují štěpení vazby O-O u organických peroxidových sloučenin. Vazby O-O jsou v nich relativně slabé a lépe se štěpí. Reorganizace výsledné molekuly pak dává větší množství energie, která je právě potřebná pro elektromagnetické záření.

Reakce luminolu s peroxidem vodíku dává vzniku molekule dianionu. Dianion reaguje s molekulou kyslíku, který se uvolní z peroxidu vodíku. Odstraněním dusíkových protonů za sebou zanechává negativní náboj, který přechází na kyslík, nacházející se na karbonylové skupině. Postupně se tak vytváří enol forma (keto-enol tautomerie). Vazby dusíku jsou dostatečně silné, aby opustily molekulu ve formě N₂. Dostáváme tak vznik cyklické formy peroxidu 3-APA* se současným uvolněním fotonů z excitovaného stavu na základní hladinu ve formě modrého světla. Celé reakční schéma CL luminolu je znázorněna na obrázku 3.



Obr. 3. Schéma chemiluminiscence luminolu

2.4. Medicínsko – právní vyšetřovací technika detekce krevních stop – historie a vývoj

První záznamy o vzniku a vývoji soudního lékařství sahají až do Číny 6. století našeho letopočtu. Přesto je začlenění chemických technologií do procesu vyšetřovacích metod relativně nová a moderní oblast. Jednou z hlavních postav figurující při vývoji medicínsko – právních vyšetřovacích metod je Mathieu Joseph Bonaventure Orfila⁷.

Svou pozornost zaměřil hlavně na krev a tělní tekutiny. Jeho publikace patří mezi nejstarší studie. Roku 1827 navrhl sérii chemických testů pro identifikaci krevních stop. Tyto testy měly rozpoznat, zda se jedná o krev nebo jiné substráty. Měly být schopny identifikace krve i v prostředí rezavých skvrn nebo v řadě červených barviv⁷.

Orfilův test byl založen hlavně na schopnosti rozpustnosti složek krvavých skvrn ve vodě, chování těchto skvrn ve vodném extraktu nebo na lakmusovém papíře.

Orfila se setkal i s kritikou. Raspail nesouhlasil s provedenými sériovými testy⁷. Nesouhlasil s jeho kritérii, která nebyla dostatečná, aby prokázala přítomnost krve. Raspail poukázal na možnost “falešně” pozitivního výsledku. Předpokládal možnost existence látek nebo materiálu podobným těm, které dávají pozitivní výsledky Orfilovým testům.

Orfila však nebyl schopný podat uspokojivé výsledky a prokázat, že chemické metody jsou mnohem spolehlivější.

Kolem roku 1836 profesor Persoz, Jean-François ve Štrasburku představil použití kyseliny chlorné jako činidla pro odlišení krevních stop od jiných červených skvrn (barviv)⁷.

Začlenění luminolového testu do medicínsko – právního vyšetřovacího procesu provedl až roku 1937 Specht⁷ po sériích rozsáhlých studií. McGrath⁷ tuto techniku podpořil pro využití ve forenzním vyšetřování. Poukázal i na to, že starší vzorek krve dává silnější a déle trvající luminiscenci než čerstvý vzorek.

2.4.1. Luminolový test

W. Lommel⁷ prvně pozoroval CL reakci luminolu v alkalickém prostředí za vývoje intenzivního modrého světla.

Vlastnosti této reakce objevil a popsal roku 1928 H.O.Albrecht^{5,7}. První podnět k využití luminolu ve forenzních vědách dal roku 1937 Specht⁷.

1936-1938 byly pozorovány katalytické účinky hemové skupiny na chemiluminiscenční reakci luminolu.

Až roku 1951 Grodsky navrhl chemiluminiscenční směs Luminol I⁸. Tato CL směs obsahuje luminol, uhličitan sodný, boritan sodný a destilovanou vodu. Postupem času se stala jednou z nejpoužívanějších CL směsí luminolu pro detekci krevních stop.

Weber navrhl zlepšení chemiluminiscenční směsi pro detekci krve. CL směs podle Webera - Luminol II⁸ tvoří luminol, hydroxid sodný nebo hydroxid draselný, peroxid vodíku a destilovaná voda.

Grodsky⁷ prokázal citlivost CL směsi luminolu při hodnotě ředění krve v poměru 1:5.10⁶. Weber⁷ tuto citlivost prokázal při hodnotách ředění krve v poměru 1:10⁷. Grodsky, Wright a Kirk⁹ ve své studii porovnávají CL techniky detekce krevních stop. Při detekci pomocí luminolu uvádí citlivost reakce při hodnotě ředěné krvi v poměru 1: 5 000 000.

2.5. Krev

Krev¹⁰ lze charakterizovat jako neprůhlednou, červenou, vazkou kapalinu. Skládá se z červených krvinek, bílých krvinek, krevních destiček a krevního plazmatu. V krvi jsou přítomny bílkoviny, organické i anorganické látky. K těm významným patří draslík, sodík, vápník, hořčík, chloridy a v neposlední řadě železo.

Objem krve v organismu představuje 9 - 10% celkové tělesné hmotnosti (4,5 – 6 l). Tento objem je ovlivňován řadou faktorů, jako je pohlaví, věk, fyzická aktivita, hmotnost, výška a zdravotní stav.

2.5.1. Hemoglobin

Hemoglobin^{10,11} je červené krevní barvivo (obrázek 4). Nachází se v membránách erytrocytů, tedy v červených krvinkách.

Červené krvinky obsahují 60% vody a 40% sušiny. Sušina z 95% obsahuje červené krevní barvivo - hemoglobin. Zbytek připadá na proteiny, lipidy, v malém množství na sacharidy a elektrolyty¹¹.

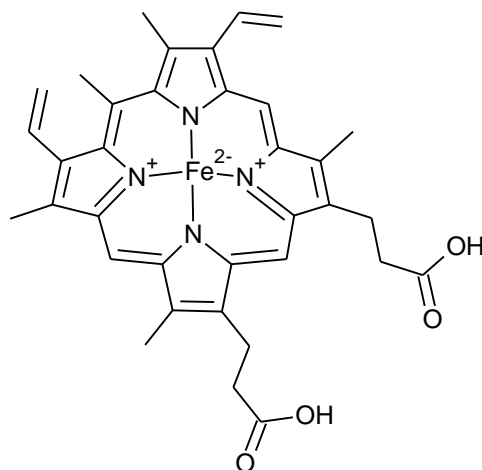
Erytrocyty jsou bezjaderné buňky jedinečného tvaru bikonkávního disku. Stejně jako krevní plazma i červené krvinky nejsou ve stejném množství u mužů a žen.

U mužů je to $4,3 - 5,3 \cdot 10^{12}$ erytrocytů/l a u žen $3,8 - 4,8 \cdot 10^{12}$ erytrocytů/l.

Hemoglobin je konjugovaná bílkovina skládající se ze čtyř subjednotek. Každou subjednotku tvoří polypeptidový řetězec, ke kterému se váže prostetická skupina – hem.

Hem je komplexní sloučenina tvořena protoporphyrinem IX (tetrapyrrolový kruh) s centrálním atomem dvojmocného železa.

Čtyři polypeptidy tvoří bílkovinu – globin, která zaujímá asi 96% molekuly hemoglobinu. Vždy dva a dva polypeptidové řetězce jsou stejné, jednotlivé typy řetězců se liší sekvencí aminokyselin.



Obr. 4. Struktura hemoglobinu

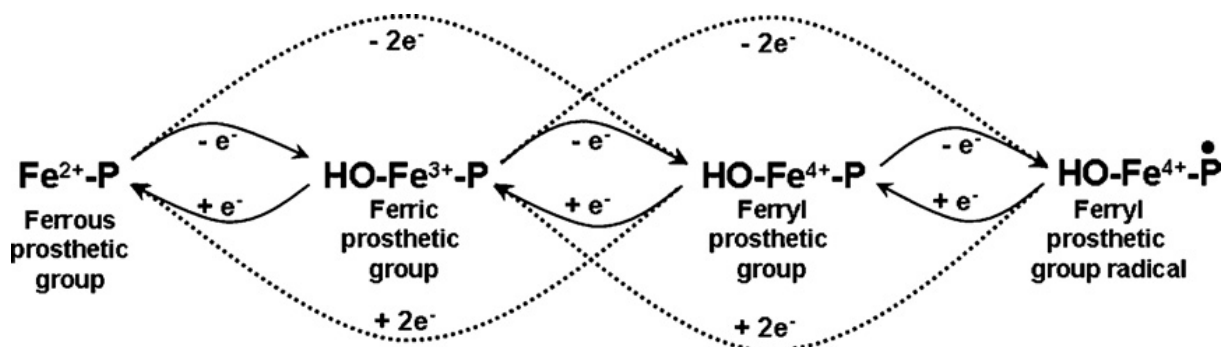
2.6. Reakce luminolu s krevní skvrnou

CL směsi luminolu jsou citlivé na světlo a na přítomnost kovových kationtů. Důležitou roli v CL reakci luminolu je katalýza této reakce. Při detekci krevních stop CL směsí luminolu je katalyzátor přítomen právě v krvi ve formě dvojmocného železa.

Krevní vzorky, které schnou, podléhají vlivem vnějších podmínek mnoha degradačním procesům⁵. Hlavně probíhá degradace polypeptidového řetězce hemu a samovolná oxidace Fe^{2+} iontu (centrálního atomu hemoglobinu) na Fe^{3+} ion. V hemu se tak místo dvojmocného železa vyskytuje trojmocné.

Aplikaci CL směsi luminolu na krevní vzorek se podpoří redukční reakce. V alkalickém prostředí OH^- skupina nahrazuje O_2 v hemu (oxyhemoglobinu) a tak vzniká hematin ($\text{OH}-\text{Fe}^{3+}-\text{P}$). Tato redukční reakce je zodpovědná za změnu barvy krve. Z červeného zbarvení na žlutohnědou.

Fe^{3+} ion v hematinu je schopen katalyzovat rozklad peroxidu vodíku a také oxidaci luminolu. $\text{OH}-\text{Fe}^{3+}-\text{P}$ přijme dva elektrony a oxiduje se na hydroxy-ferryl-porphyrinový radikál ($\text{OH}-\text{Fe}^{4+}-\text{P}\cdot$). Celý cyklus je popsán na obrázku 5. Z tohoto oxidovaného stavu se poté redukcí dvou elektronů vrací zpět na hematin ($\text{OH}-\text{Fe}^{3+}-\text{P}$). Jedná se o jeden z cyklů pro popis tří oxidačních stavů železa v hemoglobinu.



Obr. 5. Cyklus tří oxidačních stavů železa v hemoglobinu

3. Experimentální část

K detekci krevního vzorku bylo použito dvou směsí luminolu. Luminol I (navržen podle Grodského) a Luminol II (navržen podle Webera). Citlivost těchto dvou CL směsí byla porovnávána při dvou teplotách, 25 °C (detekce krevních vzorků při pokojové teplotě) a 35 °C (teplota vyšší než je pokojová teplota). V případě, že by se krevní vzorky pro detekci nacházely na teplejších místech. (Uzavřené prostory, místa v blízkosti topení, kamen)

Krevní vzorek byl získán od rodinného příslušníka při preventivní prohlídce u lékaře. Jednalo se o odběr do vakuové odběrové zkumavky určené pro hematologické vyšetření. Zkumavka již obsahovala 0,4 ml protisrážlivého roztoku K EDTA. Krev by se bez tohoto roztoku během 4 – 9 minut srazila. Celkový objem odebrané krve činil 2,5 ml.

Pro detekce byl krevní vzorek připraven do devadesáti šesti jamkových destiček. Destičky s krevním vzorkem byly ponechány v laboratoři při pokojové teplotě. Krevní vzorky se detekují zaschlé. Zaschlé krevní vzorky se detekovaly proto, že na místě trestného činu jsou nacházeny krevní vzorky již zaschlé. Většinou jsou zaschlé na nějakém povrchu (koberec, oblečení, stěna).

3.1. Chemikálie

Tabulka 3. Seznam použitých chemikálií.

Název	Vzorec	Čistota	M [g/mol]	Výrobce
Luminol	$C_8H_7N_3O_2$	p.a.* 97 %	177,16	Sigma - Aldrich
Hydroxid sodný	NaOH	p.a.* 98 %	40,00	Lachner
Peroxid vodíku 3 %	H_2O_2	3 %	34,01	Sigma - Aldrich
Uhličitan sodný bezvodý	Na_2CO_3	p.a.* 99,8 %	106,00	Lachner
Perboritan sodný tetrahydrát	$NaBO_3 \cdot 4H_2O$	čistý	153,86	Penta

*p.a. pro analýzu, chemikálie pro analytické účely

3.1.1. Úprava vzorku

Z celkového objemu (2,5 ml) byla krev rozdělena po 0,5 ml do čtyř mikrozkušavek pomocí mikropipety. Mikrozkušavky s krevním vzorkem byly k dalšímu použití uskladněny v mrazáku (-18 °C).

Získaný krevní vzorek byl dále zředěn pipetováním pomocí mikropipet s variabilním nastavením objemu (20 – 200 µl). Krev se postupným ředěním zředila 100x, 500x, 1 000x, 5 000x, 10 000x, 50 000x, 100 000x, 500 000x do jamek devadesáti šesti jamkových destiček.

Tato ředění byla vybrána proto, že v rozmezí od 10 000x - 500 000x není na pohled patrné, že vzorek krev obsahuje. Tím se sleduje, jaká byla citlivost CL směsí luminolu v těch nejnižších hodnotách zředění. Detekce se porovnávala se studii^{7,9} detekcí krevních vzorků pomocí těchto CL směsí luminolu, kde byla prokazována jejich citlivost při hodnotách zředění krve v poměrech 1 : 5.10⁶, 1 : 10⁷, 1 : 500 000.

Pro detekce byl krevní vzorek připraven do 24 jamek po 100 µl. 24 jamek proto, že byly detekovány vždy tři jamky o stejné hodnotě zředění (výše uvedeného) a objemu krevního vzorku

3.2. Experimentální vybavení

Fluoroskan Ascent FL

Fluoroskan Ascent FL¹² (obrázek 6) je vybaven pro fluorescenční a luminiscenční detekci. Ascent Software kontroluje a řídí všechny funkce. Umožňuje snadné ovládání, optimalizaci funkcí a stanovení dat. Přesné čtení zajišťuje vysoké zostření světelného paprsku. Výběr ze dvou nastavení paprsků umožňuje čtení až 384 jamek destičky. Vstříkovaný objem lze nastavit v rozsahu 1 – 1000 µl. Detektorem je PMT (photomultiplier tube). Automatické nastavení zesílení fotonásobiče umožňuje maximální citlivost a rozsah pro všechny vlnové délky. Oblast spektra pro luminiscenční detekci je 270 – 670 nm. Pomocí inkubátoru můžeme měřit v teplotních systémech rozsahu od +10 °C do +50 °C. Výsledky měření jsou získány v relativních světelných jednotkách RLU (Relative Light Units).



Obr. 6. Fluoroskan Ascent FL

3.3. Příprava měření

3.3.1. Příprava CL směs luminolu

CL směsi luminolu navrženy podle Grodského - Luminol I⁵ a Webera Luminol II⁵ byly připraveny podle původního protokolu, jehož postup shrnuje tabulka 4.

Tabulka 4. CL směsi luminolu

Grotsky (1951) ⁵	Weber (1966) ⁵
Navážíme 3,5g boritanu sodného ($\text{NaBO}_3 \cdot n\text{H}_2\text{O}$), (skladujeme ve skleněné nebo plastické nádobě).	Navážíme 8 g hydroxidu sodného (NaOH) a úplně rozpustíme v 0,5 l destilované vody. Získáme 0,4 N roztok. (zásobní roztok A)
Přidáme 0,5 l destilované vody	10 ml 30% peroxidu vodíku (H_2O_2) a přidáme jej k 0,49 l destilované vody. Získáme 0,176 M roztok. (zásobní roztok B).
Mícháme do úplného rozpuštění boritanu sodného.	Navážíme 0,354 g luminolu a necháme rozpustit v 0,0625 l 0,4 N hydroxidu sodného. Získáme roztok o celkovém objemu 0,5 l (0,004 M). (zásobní roztok C)
Postupně přidáváme 0,5 g luminolu a 25 g uhličitanu sodného (Na_2CO_3), (skladujeme ve skleněné nebo plastické nádobě, luminol musí být chráněn proti světlu)	Tři zásobní roztoky skladujeme ve skleněných nebo plastických nádobách při 4 °C, mimo dosah přímého světla.
Mícháme do úplného rozpuštění.	Testovací roztok připravíme smísením 0,01 l z každého ze tří zásobních roztoků s 0,07 l destilované vody. Získáme 0,1 l pracovního roztoku.
Roztok přelijeme do spreje k okamžitému použití.	Roztok přelijeme do spreje k okamžitému použití.

3.4. Detekce krevních vzorků Luminolem I a Luminolem II

Pomocí Ascent softwaru se nejprve zadaly podmínky a parametry pro dané měření. Teplota se nastavila na 25 °C (detekce krevních vzorků při pokojové teplotě) a na 35 °C (vyšší teplota okolí). Byly označeny jamky, které byly předmětem dané detekce. Zadal se integrační čas.

Za těchto podmínek byla nejprve použita, pro detekci krevních vzorků, čerstvě připravená směs Luminolu I a poté čerstvě připravená směs Luminolu II.

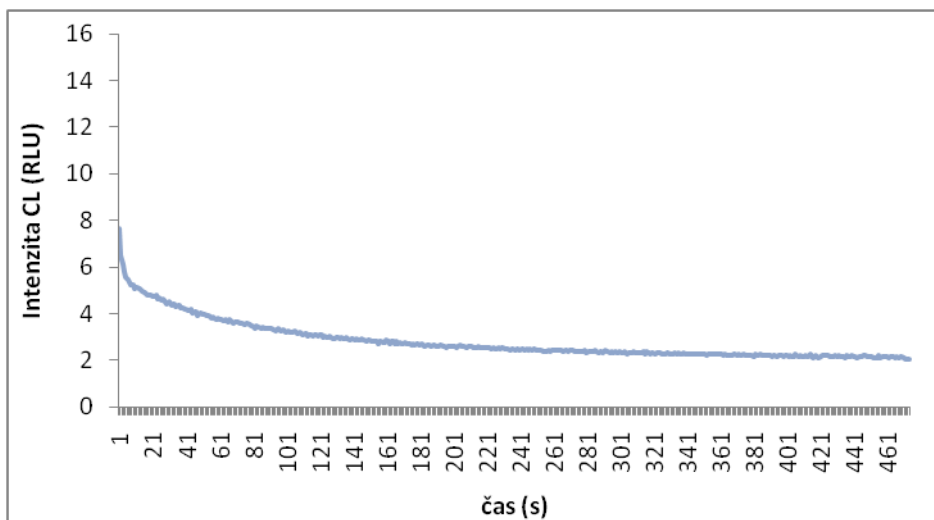
Další měření se uskutečnila se směsmi Luminolu I a Luminolu II za podmínek, kdy byly skladovány po dobu 24 hodin v ledničce (do 4 °C), 7 dnů v ledničce, po dobu 4 týdnů v ledničce a mrazáku (- 18 °C). Skladováním těchto směsí se sledovala jejich stabilita. Zda byla ovlivněna jejich schopnost detekovat krevní vzorky.

Ze získaných hodnot z měření se pomocí sloupcových grafů, znázorňující na souřadnicích x hodnoty zředění krve. Na souřadnicích y je znázorněna intenzita CL (RLU) a hloubková osa znázorňuje časový průběh detekce v sekundách. Vyhodnocovalo se, jaké je minimální detekovatelné množství zředěné krve. Při které hodnotě zředění krve ještě CL směsi detekují přítomnost krve. Dále se vyhodnocovala stabilita směsí v závislosti na době, po kterou byly CL směsi luminolu uskladněny.

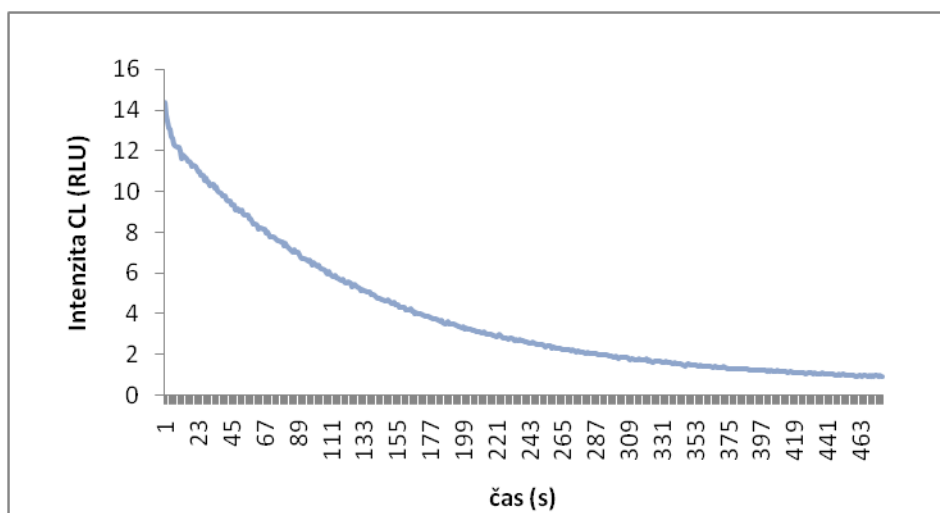
4. Výsledky a diskuze

Po změření intenzity CL při detekci krevních vzorků se porovnávala citlivost těchto směsí (Luminolu I a luminolu II) a jaké maximální zředění krve jsou schopny detekovat.

Grafy zobrazují závislost CL intenzity v jednotkách RLU (relative light units) na zředění krve 100x, 500x, 1 000x, 5 000x, 10 000x, 50 000x, 100 000x, 500 000x. K posouzení citlivost CL směsí luminolu v těch nejvyšších uvedených hodnotách zředění krevních vzorků byla provedena detekce destilované vody (detekce pozadí) Luminolem I (graf 1) a Luminolem II (graf 2).



Graf 1. Graf znázorňuje detekci destilované vody (bez přítomnosti katalyzátoru pomocí Luminolu I. Hodnoty pozadí (při 25 °C).



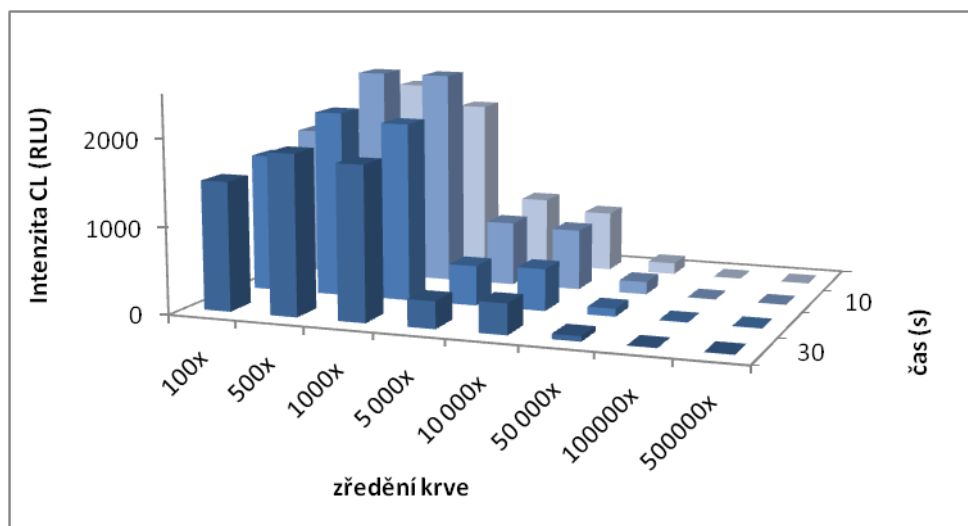
Graf 2. Graf znázorňuje detekci destilované vody (bez přítomnosti katalyzátoru pomocí Luminolu II. Hodnoty pozadí (při 25 °C).

4.1. Detekce krevních stop pomocí čerstvě připravených směsí Luminolu I a Luminolu II

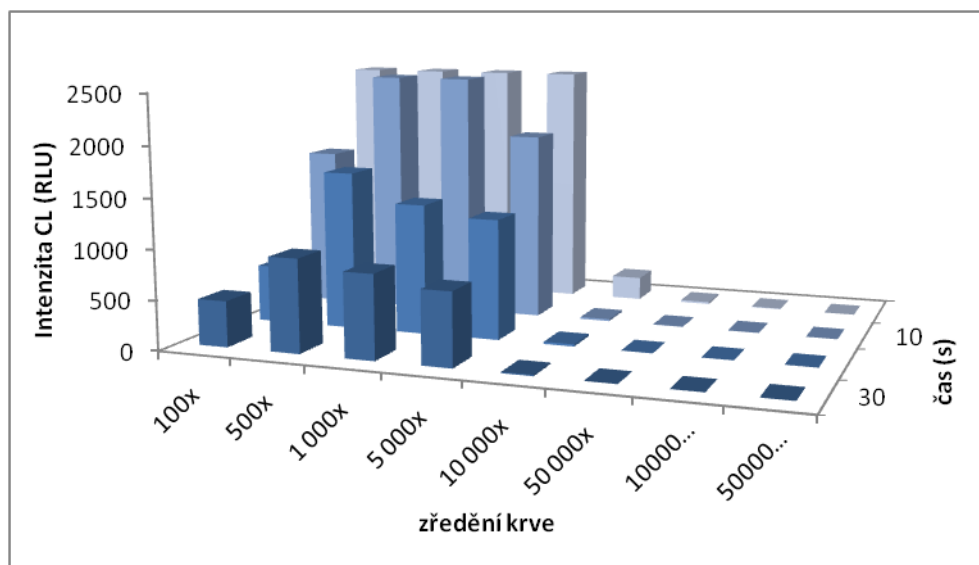
Detekce pomocí čerstvých CL směsí luminolu měly vysokou intenzitu hlavně při hodnotách ředění krve v poměrech 500x, 1 000x, 5 000x (graf 3-6). Při zředění krevního vzorku 100x intenzita obou CL směsí luminolu buď přesáhla hraniční hodnoty pro měření intenzity CL, nebo kvůli vysokému obsahu krve v krevním vzorku měla reakce CL luminolu katalyzovaná Fe^{2+} rychlý průběh. Tento rychlý průběh reakce se poté neprojevil, jako zářivá chemiluminiscence. Tím pádem je na grafu (graf 5-6) intenzita CL v oblasti pozadí.

Směs Luminolu I ani Luminolu II v rozmezí 50 000x - 500 000x zředěnou krví měly intenzitu CL v nízkých hodnotách. Tedy pro tyto hodnoty zředění krve již směsi neprokázaly přítomnost krve. Citlivost CL směsí při těchto detekcích byly prokázány do hodnoty 10 000x zředěné krve. Čerstvě připravené CL směsi luminolu, které byly použity pro detekci při pokojové teplotě 25 °C (graf 3-4) jsou citlivější na přítomnost krve ve vzorku než detekce při 35 °C. (graf 5-6).

Detekce při 25 °C

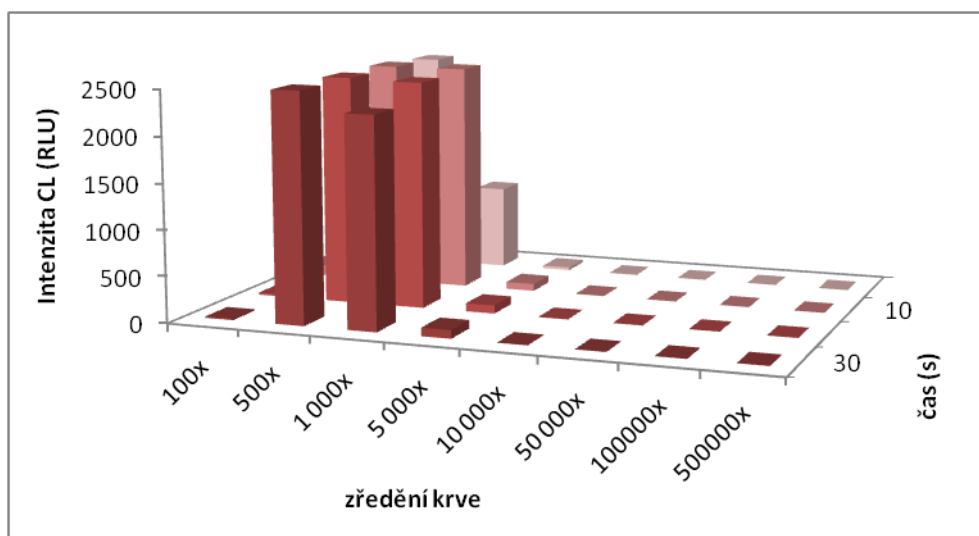


Graf 3. Detekce krevních vzorků CL směsí luminolu navrženou podle Grodského (Luminol I). Měření probíhalo s čerstvě připravenou směsí při teplotě 25°C. Osa x znázorňuje zředění krve. Osa y je znázorněním intenzity CL (RLU). Hloubková osa znázorňuje časový průběh detekce v sekundách.

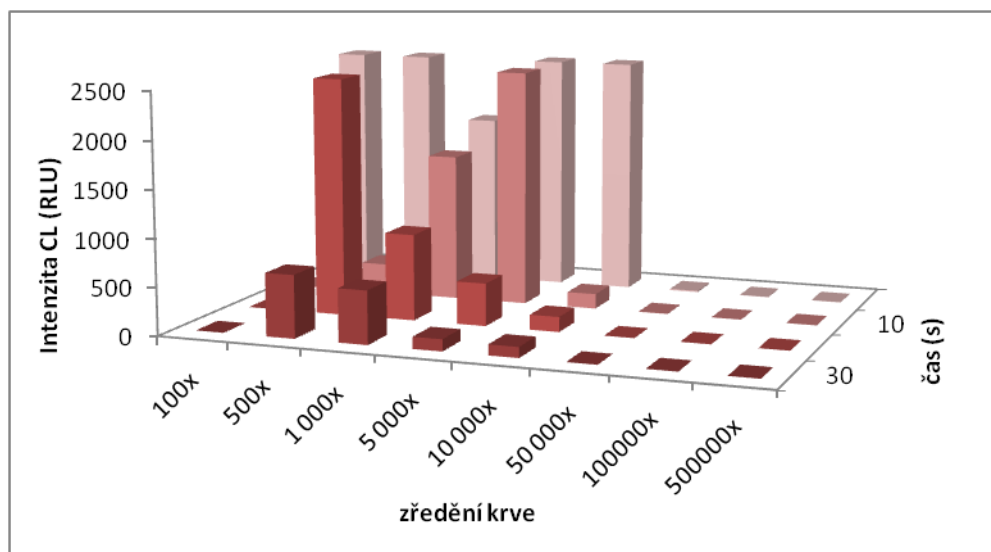


Graf 4. Detekce krevních vzorků CL směsi luminolu navrženou podle Webera (Luminol II). Měření probíhalo s čerstvě připravenou směsí při teplotě 25°C. Osa x znázorňuje zředění krve. Osa y je znázorněním intenzity CL (RLU). Hloubková osa znázorňuje časový průběh detekce v sekundách.

Detekce při 35 °C



Graf 5. Detekce krevních vzorků CL směsi luminolu navrženou podle Grodského (Luminol I). Měření probíhalo s čerstvě připravenou směsí při teplotě 35°C. Osa x znázorňuje zředění krve. Osa y je znázorněním intenzity CL (RLU). Hloubková osa znázorňuje časový průběh detekce v sekundách.



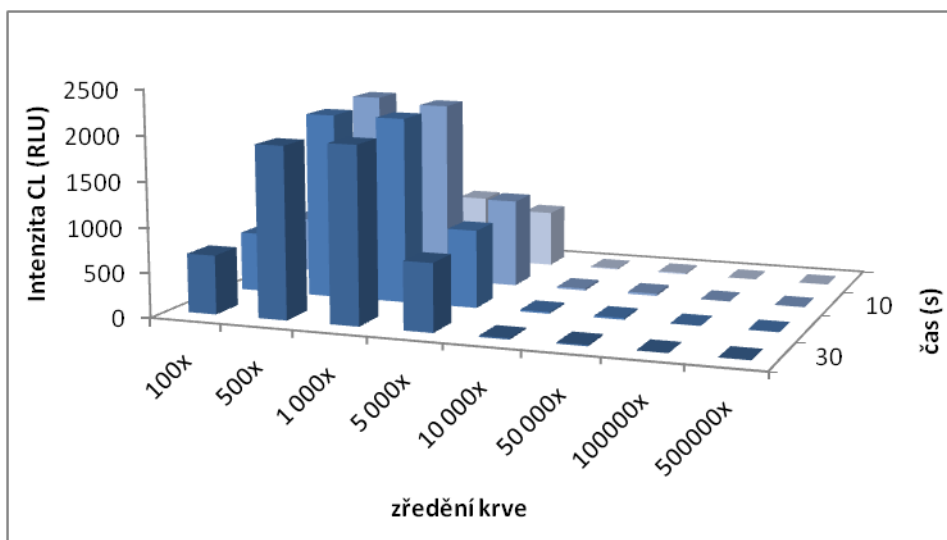
Graf 6. Detekce krevních vzorků CL směsi luminolu navrženou podle Webera (Luminol II). Měření probíhalo s čerstvě připravenou směsí při teplotě 35°C. Osa x znázorňuje zředění krve. Osa y je znázorněním intenzity CL (RLU). Hloubková osa znázorňuje časový průběh detekce v sekundách.

4.2. Detekce krevních stop Luminolem I a Luminolem II po 24 hodinách uskladnění CL směsí luminolu v ledničce (4 °C)

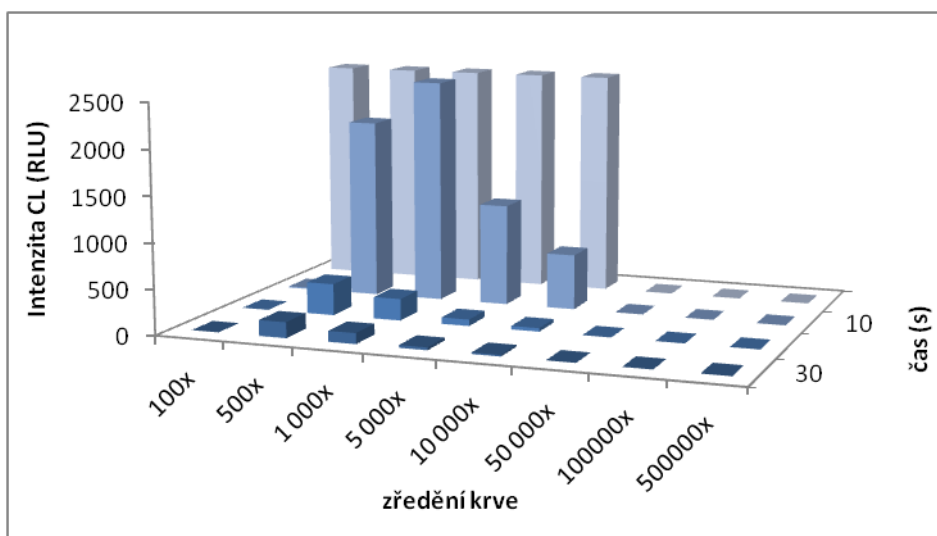
Po 24 hodinách uskladnění CL směsí luminolu v ledničce značně poklesla citlivost Luminolu I (graf 7) s porovnáním s čerstvě připravenou směsí Luminolu I (graf 3). Poklesla citlivost CL směsí luminolu, ale intenzita CL byla se stále pohybovala v oblasti 2 500 RLU.

Obě směsi (Luminol I a Luminolu II) však stále prokázaly přítomnost krve v krevních vzorcích zředěných 100x, 500x, 1 000x, 5 000x (graf 7-10). Účinnost Luminolu II (graf 8, graf 9) byla vyšší než Luminolu I.

Detekce při 25 °C

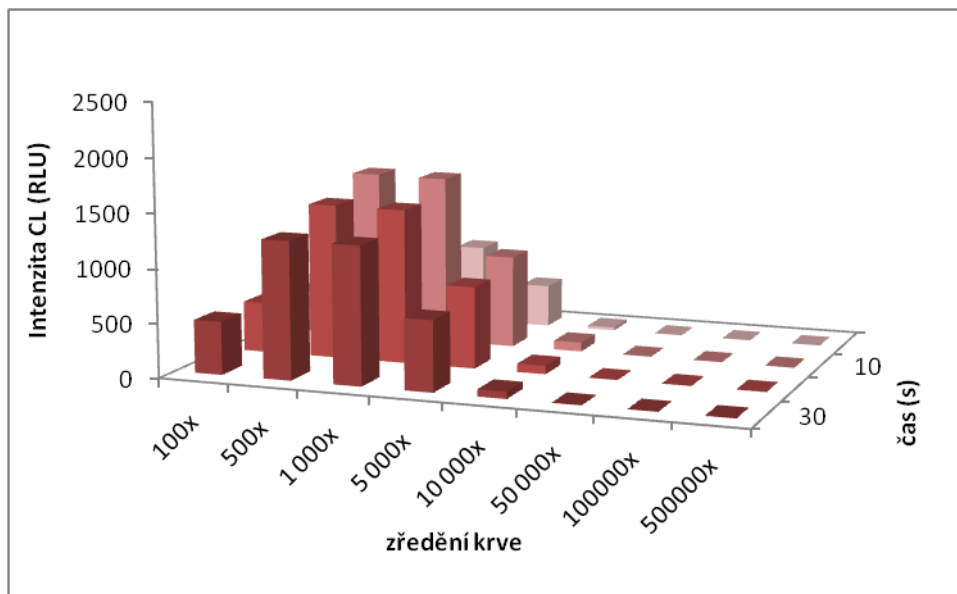


Graf 7. Detekce krevních vzorků CL směsi luminolu navrženou podle Grodského (Luminol I). Měření probíhalo s 24 hodin skladovanou směsí v ledničce (4 °C). Detekce probíhala při teplotě 25°C. Osa x znázorňuje zředění krve. Osa y je znázorněním intenzity CL (RLU). Hloubková osa znázorňuje časový průběh detekce v sekundách.

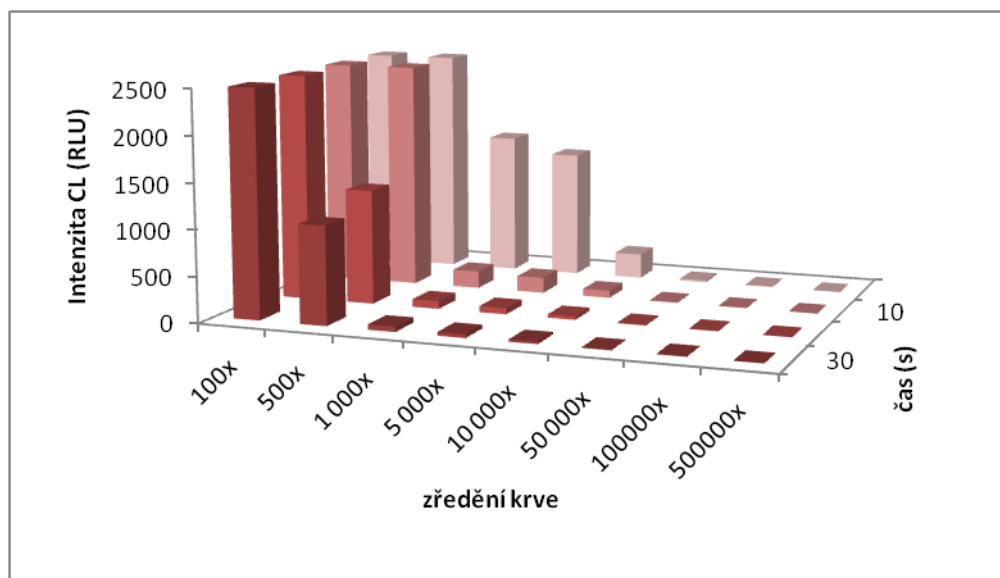


Graf 8. Detekce krevních vzorků CL směsi luminolu navrženou podle Webera (Luminol II). Měření probíhalo s 24 hodin skladovanou směsí v ledničce (4 °C). Detekce probíhala při teplotě 25°C. Osa x znázorňuje zředění krve. Osa y je znázorněním intenzity CL (RLU). Hloubková osa znázorňuje časový průběh detekce v sekundách.

Detekce při 35 °C



Graf 9. Detekce krevních vzorků CL směsi luminolu navrženou podle Grodského (Luminol I). Měření probíhalo s 24 hodin skladovanou směsí v ledničce (4 °C). Detekce probíhala při teplotě 35°C. Osa x znázorňuje zředění krve. Osa y je znázorněním intenzity CL (RLU). Hloubková osa znázorňuje časový průběh detekce v sekundách.



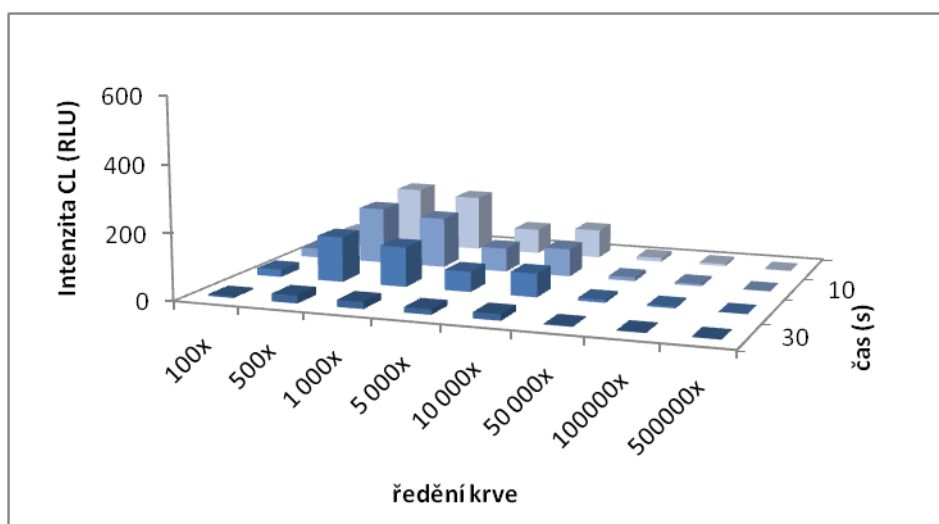
Graf 10. Detekce krevních vzorků CL směsi luminolu navrženou podle Webera (Luminol II). Měření probíhalo s 24 hodin skladovanou směsí v ledničce (4 °C). Detekce probíhala při teplotě 35°C. Osa x znázorňuje zředění krve. Osa y je znázorněním intenzity CL (RLU). Hloubková osa znázorňuje časový průběh detekce v sekundách.

4.3. Detekce krevních stop Luminolem I a Luminolem II po 7 dnech uskladnění CL směsí luminolu v ledničce (4 °C)

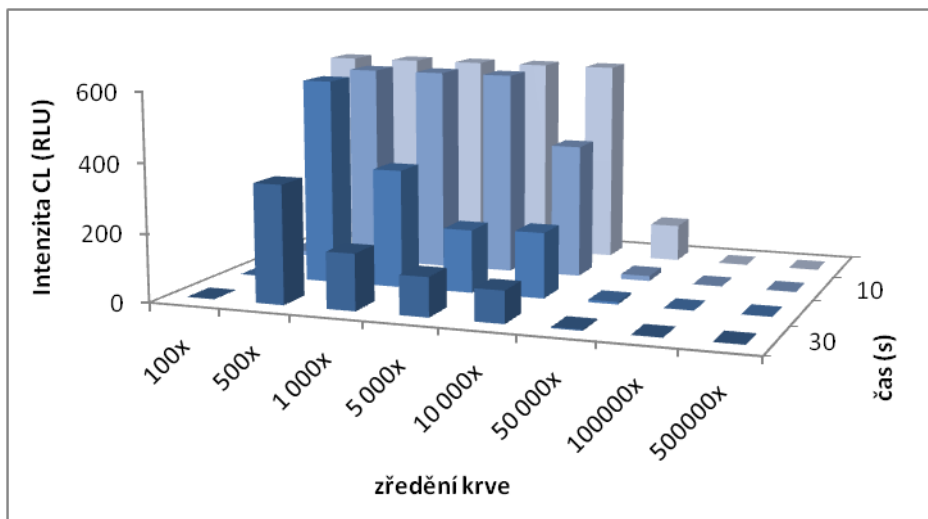
Po týdnu uskladnění Luminolu I v ledničce se jeho účinnost detekovat krevní vzorky výrazně snížila (graf 11, graf 13). Intenzita CL nepřesáhla hodnotu 600 RLU a to při 25 °C i 35 °C.

Luminol II i přes uskladnění v ledničce (4 °C) měl při detekci krevních vzorků vysokou citlivost (graf 12, graf 14). Účinnost Luminolu II byla jednoznačně vyšší než Luminolu I.

Detekce při 25 °C

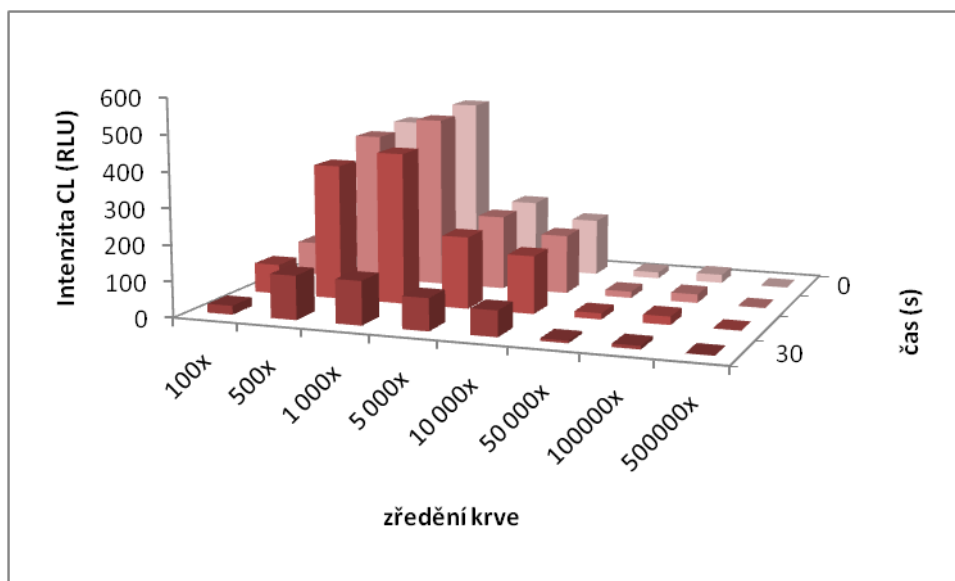


Graf 11. Detekce krevních vzorků CL směsí luminolu navrženou podle Grodského (Luminol I). Měření probíhalo se 7 dny skladovanou směsí v ledničce (4 °C). Detekce probíhala při teplotě 25°C. Osa x znázorňuje zředění krve. Osa y je znázorněním intenzity CL (RLU). Hloubková osa znázorňuje časový průběh detekce v sekundách.

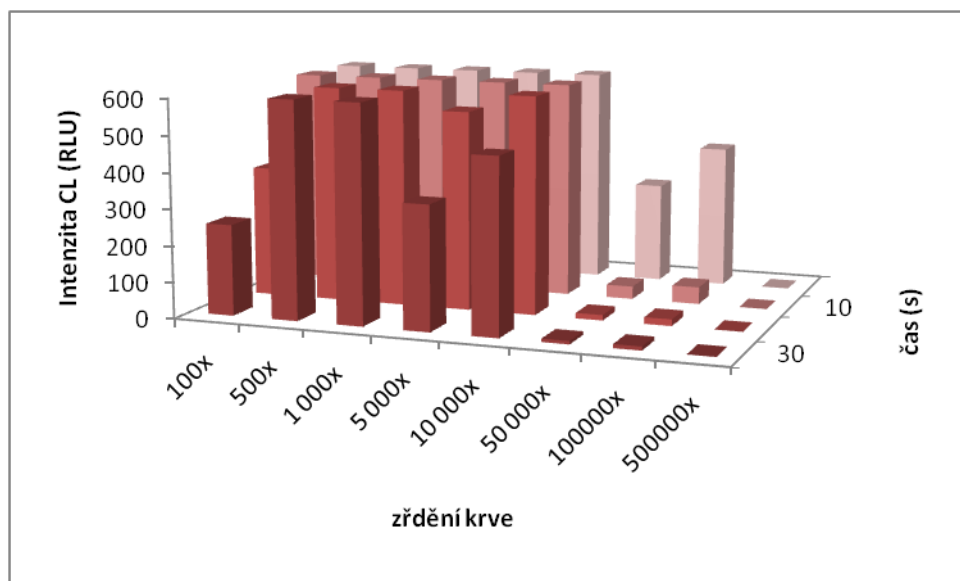


Graf 12. Detekce krevních vzorků CL směsi luminolu navrženou podle Webera (Luminol II). Měření probíhalo se 7 dny skladovanou směsí v ledničce (4 °C). Detekce probíhala při teplotě 25°C. Osa x znázorňuje zředění krve. Osa y je znázorněním intenzity CL (RLU). Hloubková osa znázorňuje časový průběh detekce v sekundách.

Detekce při 35 °C



Graf 13. Detekce krevních vzorků CL směsi luminolu navrženou podle Grodského (Luminol I). Měření probíhalo se 7 dny skladovanou směsí v ledničce (4 °C). Detekce probíhala při teplotě 35°C. Osa x znázorňuje zředění krve. Osa y je znázorněním intenzity CL (RLU). Hloubková osa znázorňuje časový průběh detekce v sekundách.



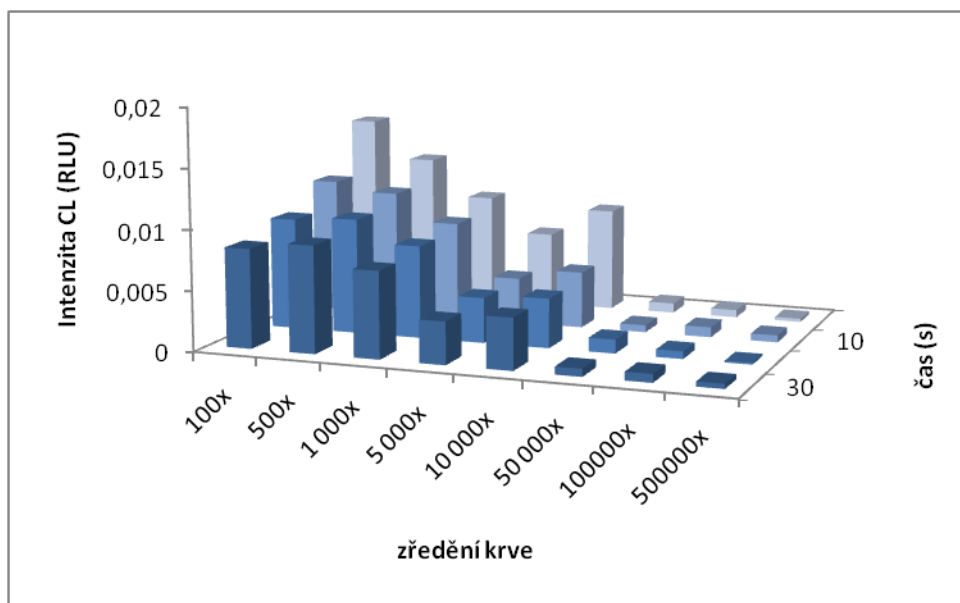
Graf 14. Detekce krevních vzorků CL směsi luminolu navrženou podle Webera (Luminol II). Měření probíhalo se 7 dny skladovanou směsí v ledničce (4 °C). Detekce probíhala při teplotě 35°C. Osa x znázorňuje zředění krve. Osa y je znázorněním intenzity CL (RLU). Hloubková osa znázorňuje časový průběh detekce v sekundách.

4.4. Detekce krevních stop Luminolem I a Luminolem II po 4 týdnech uskladnění CL směsí luminolu v ledničce (4 °C)

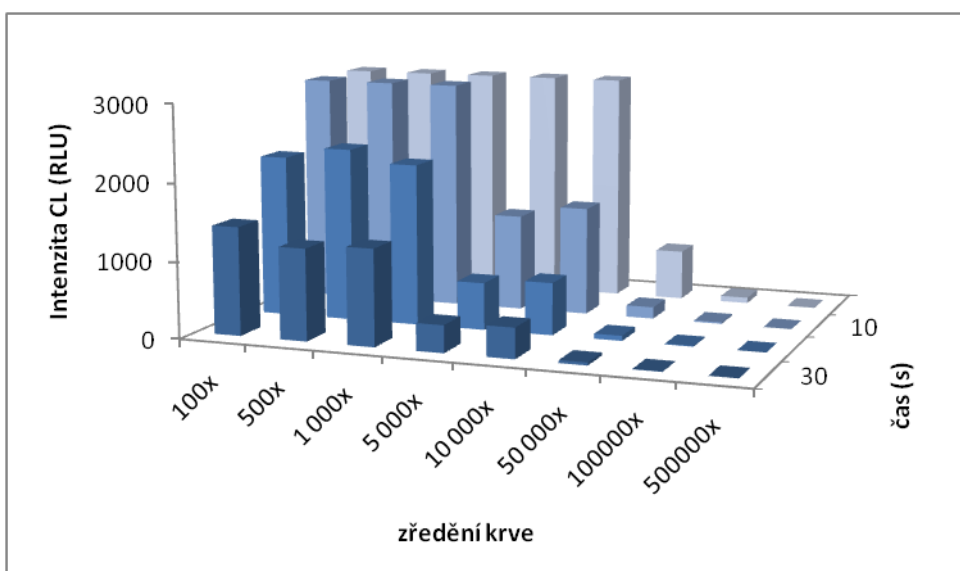
Po jednom měsíci uskladnění Luminolu I v ledničce (graf 15, graf 17) nebylo možné již pomocí této CL směsi luminolu prokázat přítomnost krve. Intenzity CL (při 25 °C i při 35 °C) jsou na hodnotách detekce pozadí.

Naproti tomu Luminol II prokázal stále vysokou účinnost (graf 16, graf 18). V tomto měření nebyly výrazné rozdíly mezi detekcí při pokojové teplotě 25 °C a při 35 °C.

Detekce při 25 °C

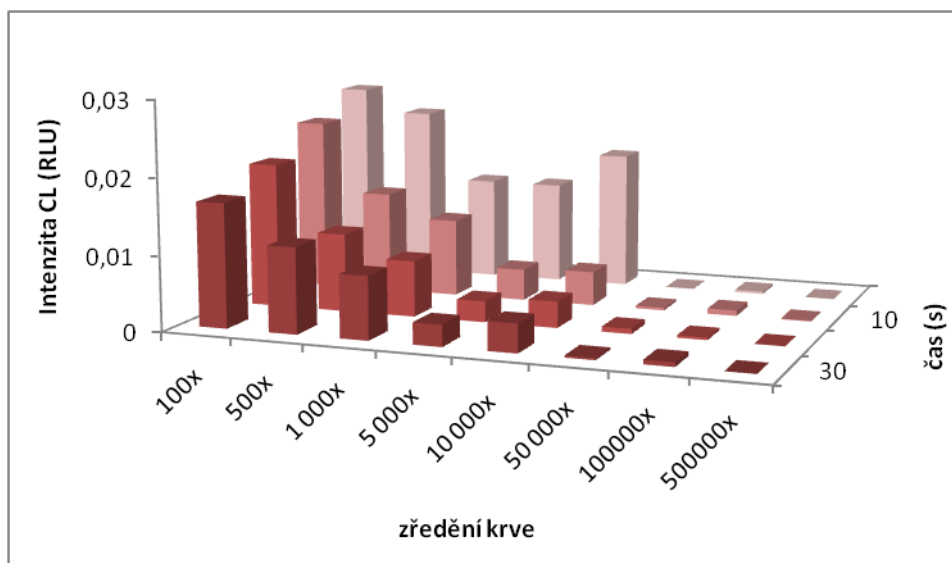


Graf 15. Detekce krevních vzorků CL směsi luminolu navrženou podle Grodského (Luminol I). Měření probíhalo s 4 týdny skladovanou směsí v ledničce (4 °C). Detekce probíhala při teplotě 25°C. Osa x znázorňuje zředění krve. Osa y je znázorněním intenzity CL (RLU). Hloubková osa znázorňuje časový průběh detekce v sekundách.

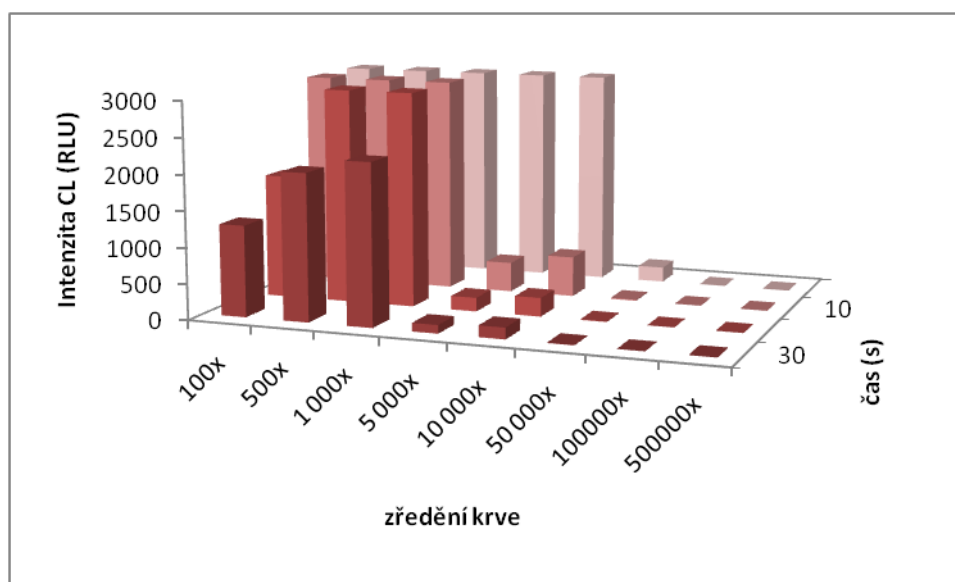


Graf 16. Detekce krevních vzorků CL směsi luminolu navrženou podle Webera (Luminol I). Měření probíhalo s 4 týdny skladovanou směsí v ledničce (4 °C). Detekce probíhala při teplotě 25°C. Osa x znázorňuje zředění krve. Osa y je znázorněním intenzity CL (RLU). Hloubková osa znázorňuje časový průběh detekce v sekundách.

Detekce při 35 °C



Graf 17. Detekce krevních vzorků CL směsi luminolu navrženou podle Grodského (Luminol I). Měření probíhalo s 4 týdny skladovanou směsí v ledničce (4 °C). Detekce probíhala při teplotě 35°C. Osa x znázorňuje zředění krve. Osa y je znázorněním intenzity CL (RLU). Hloubková osa znázorňuje časový průběh detekce v sekundách.

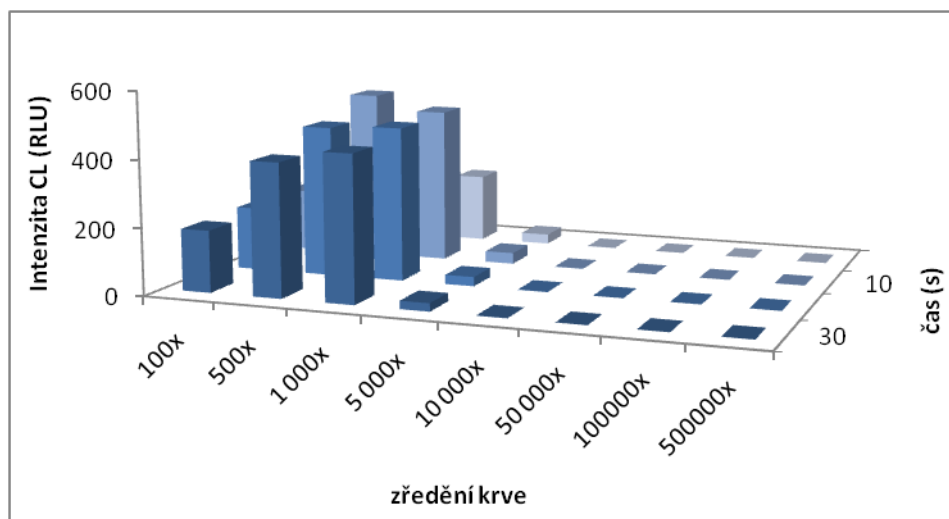


Graf 18. Detekce krevních vzorků CL směsi luminolu navrženou podle Webera (Luminol II). Měření probíhalo s 4 týdny skladovanou směsí v ledničce (4 °C). Detekce probíhala při teplotě 35°C. Osa x znázorňuje zředění krve. Osa y je znázorněním intenzity CL (RLU). Hloubková osa znázorňuje časový průběh detekce v sekundách.

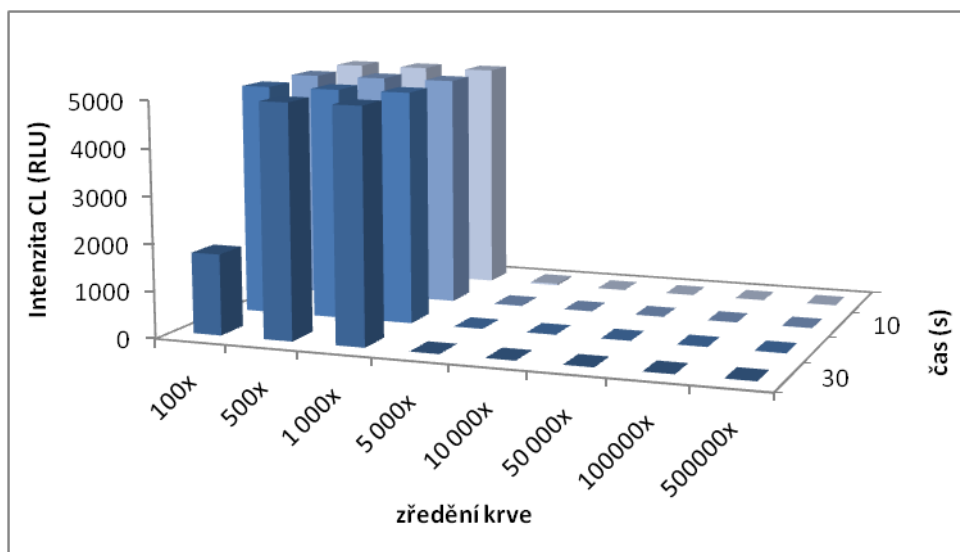
4.5. Detekce krevních stop Luminolem I a Luminolem II po 4 týdnech uskladnění CL směsí luminolu v mrazáku (-18 °C)

Zmrazením CL směsí luminolu si tyto směsi zachovaly svou stabilitu. Detekce pomocí Luminolu I (graf 19, graf 21) a Luminolu II (graf 20, graf 22) měla vyšší citlivost než detekce provedeny s těmito směsi za podmínky jejich skladování v ledničce (4 °C). Citlivost Luminolu II byla obdobná, jako měla detekce krevních vzorků pomocí čerstvě připravené směs Luminolu II (graf 4, 6).

Detekce při 25 °C

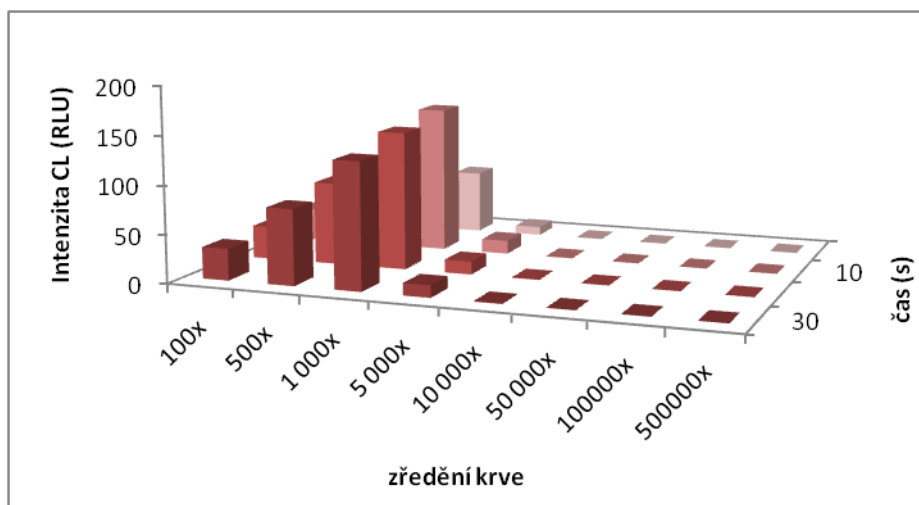


Graf 19. Detekce krevních vzorků CL směsí luminolu navrženou podle Grodského (Luminol I). Měření probíhalo s 4 týdny skladovanou směsí v mrazáku (-18 °C). Detekce probíhala při teplotě 25°C. Osa x znázorňuje zředění krve. Osa y je znázorněním intenzity CL (RLU). Hloubková osa znázorňuje časový průběh detekce v sekundách.

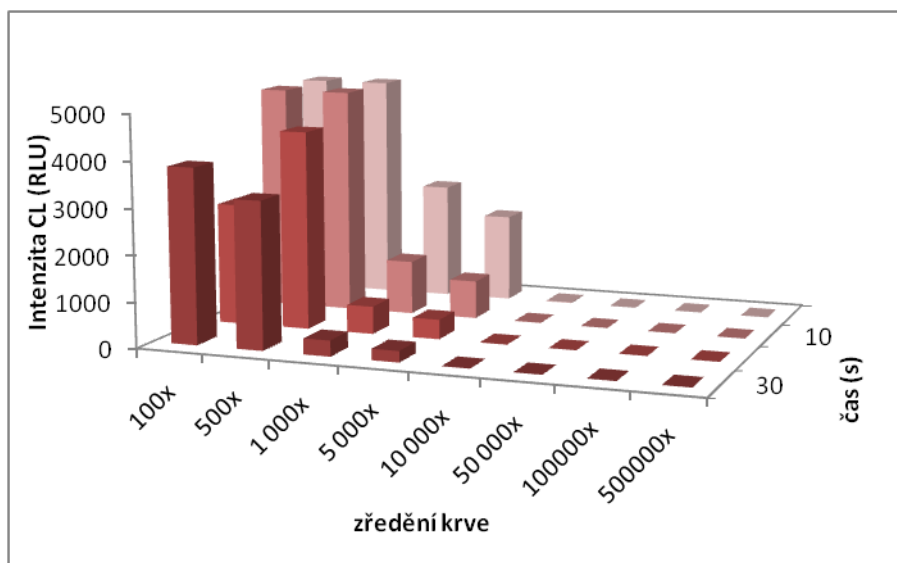


Graf 20. Detekce krevních vzorků CL směsi luminolu navrženou podle Grodského (Luminol I). Měření probíhalo s 4 týdny skladovanou směsí v mrazáku (-18 °C). Detekce probíhala při teplotě 25°C. Osa x znázorňuje zředění krve. Osa y je znázorněním intenzity CL (RLU). Hloubková osa znázorňuje časový průběh detekce v sekundách.

Detekce při 35 °C



Graf 21. Detekce krevních vzorků CL směsi luminolu navrženou podle Grodského (Luminol I). Měření probíhalo s 4 týdny skladovanou směsí v mrazáku (-18 °C). Detekce probíhala při teplotě 35°C. Osa x znázorňuje zředění krve. Osa y je znázorněním intenzity CL (RLU). Hloubková osa znázorňuje časový průběh detekce v sekundách.



Graf 22. Detekce krevních vzorků CL směsi luminolu navrženou podle Grodského (Luminol I). Měření probíhalo s 4 týdny skladovanou směsí v mrazáku (-18 °C). Detekce probíhala při teplotě 35°C. Osa x znázorňuje zředění krve. Osa y je znázorněním intenzity CL (RLU). Hloubková osa znázorňuje časový průběh detekce v sekundách.

4.6. Náklady na chemikálie pro detekce pomocí Luminolu I a Luminolu II

4.6.1. Náklady na pořízení chemikálií

V nákladech jsou zahrnuty chemikálie, které byly použity k přípravě CL směsi luminolu navrženou podle Grodského (Luminol I) a Webera (Luminol II). Seznam použitých chemikálií je shrnut v tabulce 3 v experimentální části.

V tabulce 4 jsou uvedeny ceny^{13, 14, 15} chemikálií pro přípravu Luminolu I a v tabulce 5 jsou uvedeny ceny^{13, 14, 15} chemikálií pro přípravu Luminolu II. Ceny jsou v českých korunách včetně DPH podle aktuálního ceníku společností, u kterých byly chemikálie zakoupeny.

Tabulka 4. Ceny chemikálií pro přípravu Luminolu I

Název produktu	Vzorec	Mr	Celkové množství	Cena (CZK)
Luminol	$C_8H_7N_3O_2$	177,16	2,5 g	1060,8
Uhličitan sodný (bezvodý)	Na_2CO_3	105,99	500 g	171
Tetrahydrát boritanu sodného	$NaBO_3 \cdot 4H_2O$	153,86	250 g	478,4
Destilovaná voda	H_2O	18,02	5 l	49
Celkem				1 759,2

Tabulka 5. Ceny chemikálií pro přípravu Luminolu II

Název produktu	Vzorec	Mr	Celkové množství	Cena (CZK)
Luminol	$C_8H_7N_3O_2$	177,16	2,5 g	1060,8
Peoxid vodíku 3%	H_2O_2	34,01	100 ml	348,4
Hydroxid sodný	$NaOH$	40	500 g	522,60
Destilovaná voda	H_2O	18,02	5 l	49
Celkem				1 980,8

Srovnání nákladů pro pořízení chemikálií:

Luminol I < Luminol II

1 759,2 Kč < 1 980,8 Kč

4.6.2. Srovnání Luminolu I, Luminolu II a Bluestar® Forensic tablets

V roce 2000 Dr. Loic Blum (z Univerzity Claude Bernard – Lyon) vymyslel nové složení luminolové směsi a pojmenoval ji Bluestar® Forensic¹⁶.

Bluestar® Forensic má jednoduchou přípravu. Může být užit i několik dní po smíchání a zachovává stejnou intenzitu luminiscence.

Bluestar® Forensic je schopen odhalit jak čerstvou, tak i zaschlou krev. S domácími čisticími prostředky, chlornany, barvivy může poskytnout falešně pozitivní výsledky. Falešně pozitivní výsledek však nemá tak intenzivní modré světlo a trvá poměrně kratší dobu než reakce pozitivní.

Bluestar® Forensic Tablets¹⁷ je sada (kit) obsahující dvě tuby s osmi páry tablet. Dvě tablety se pro detekci rozpouští ve 125 ml destilované vody (8 x 125 ml). Celkový objem Bluestar® Forensic Tablet je tedy jeden litr a pokrývá plochu 200 m². Cena Bluestar® Forensic Tablet¹⁸ je 3 409 Kč.***

Srovnání nákladů na Luminol I, Luminol II a Bluestar® Forensic Tablets se vztahuje na komerční použití 125 ml Bluestar® Forensic Tablets. Tabulka 6-7 shrnuje náklady na Luminol I a Luminol II pro přípravu 125 ml těchto směsí.

Z celkové ceny Bluestar® Forensic Tablets sady se náklady přepočítají pro objem 125 ml. Cena je 420 Kč na 125 ml roztoku dvou tablet Bluestar® Forensic.

K částce 420 Kč připočteme náklady na 125 ml destilované vody (125 ml = 1,22 Kč). Celkové náklady na Bluestar® Forensic Tablets tedy činí 421,22 Kč

Pro detekci krevních stop, která byla předmět bakalářské práce, byla krev zředěna vždy do tří jamek o stejné hodnotě zředění a objemu (100 µl). Proto se náklady na použité chemikálie pro přípravu CL směsí luminolu přepočítaly na 3 x 100 µl a byly porovnány se mezi sebou.

Tabulka 6. Náklady na přípravu 125 ml CL Luminolu I

Název produktu	Celkové množství	Cena (CZK)
Luminol	0,125 g	53,04
Uhličitan sodný (bezvodý)	6,25 g	2,14
Tetrahydrát boritanu sodného	0,875 g	1,67
Destilovaná voda	125 ml	1,22
Celkem		58,07**

Tabulka 7. Náklady na přípravu 125 ml Luminolu II

Název produktu	Celkové množství	Cena (CZK)
Luminol	0,085 g	36,06
Hydroxid sodný	2 g	2,09
Peroxid vodíku 3 %	25 ml	87,1
Destilovaná voda	125 ml	1,22
Celkem		126,47**

**K udaným cenám nejsou připočteny náklady na materiál a pomůcky, které jsou nezbytné k přípravě směsí.

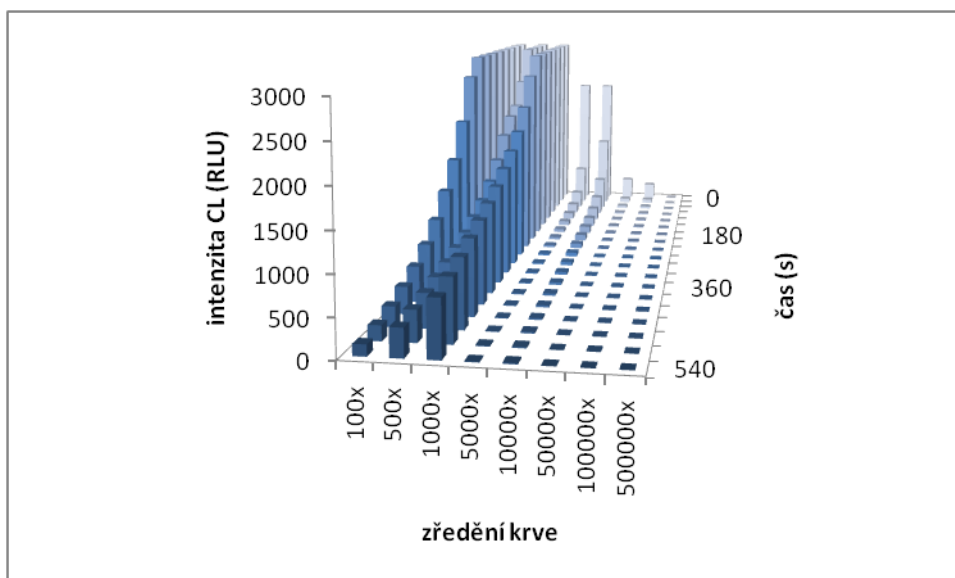
***K ceně Bluestar® Forensic Tablets jsou připočteny náklady na destilovanou vodu (5 l = 49 Kč)

Srovnání Bluestar® Forensic Tablets s Luminolem I a Luminolem II (3 x 100 µl):

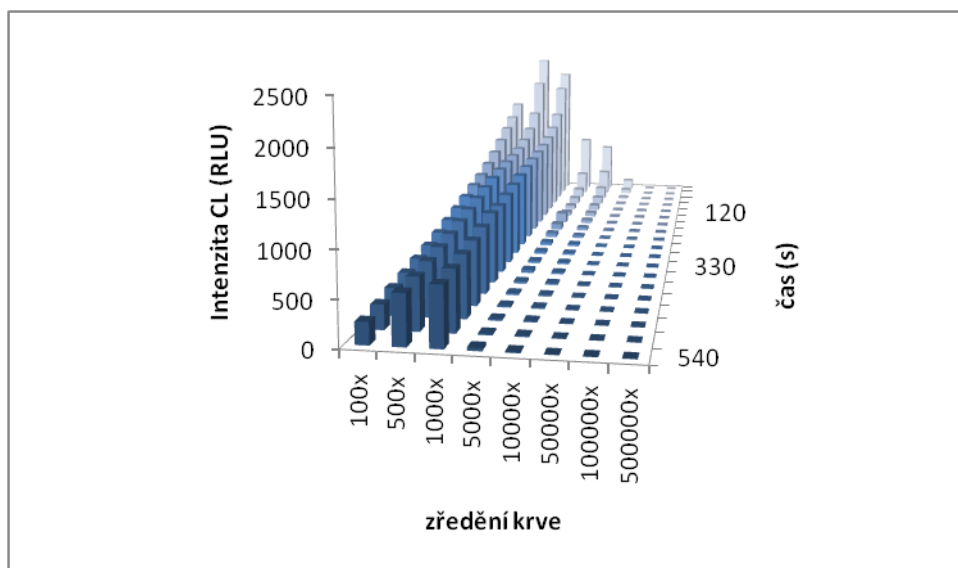
Luminol I < Luminol II < Bluestar® Forensic Tablets

0,14 Kč < 0,30 Kč < 1,01 Kč

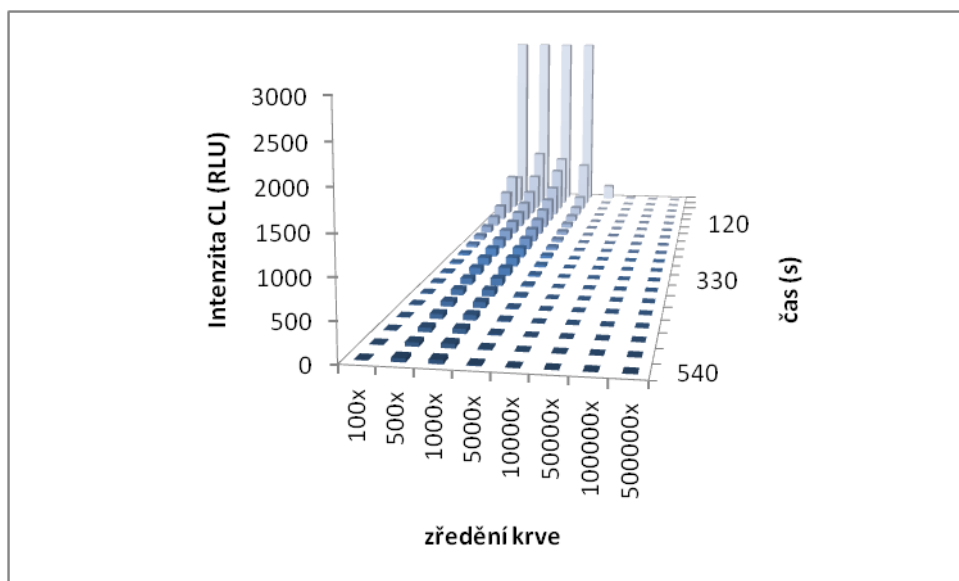
Se srovnáním nákladů na materiál byla vzata v úvahu i citlivost těchto tří CL směsí luminolu. Na sloupcových grafech (23-25), jsou na souřadnici x znázorněny hodnoty zředění krve. Na y souřadnici je intenzita CL (RLU) a hloubková osa znázorňuje časový průběh detekce v sekundách. Z celkového časového průběhu detekce (540 s) byly vybrány body měření po třiceti sekundách. Z grafů je patrné, že největší citlivost má detekce pomocí Bluestar® Forensic Tablets sady.



Graf 23. Detekce krevních vzorků pomocí Bluestar® Forensic Tablets. Detekce proběhla při pokojové teplotě (25 °C).



Graf 24. Detekce krevních vzorků pomocí čerstvě připravené směsi Luminolu I. Detekce proběhla při pokojové teplotě (25 °C).



Graf 25. Detekce krevních vzorků pomocí čerstvě připravené směsi Luminolu II. Detekce proběhla při pokojové teplotě (25 °C).

5. Závěr

V kriminalistice se chemiluminiscenční reakce luminolu stala jednou z nepostradatelných metod využívaných k detekci krve.

V této práci byl detekován vzorek, obsahující krevní stopy, pomocí CL směsí luminolu navržených podle Grodského (Luminol I) a podle Webera (Luminol II).

Krevní vzorek byl zředěn postupným ředěním 100x, 500x, 1 000x, 5 000x, 10 000x, 50 000x, 100 000x, 500 000x. Celé měření proběhlo pomocí přístroje Fluoroskan Ascent FL.

Při detekcích měla nejvyšší citlivost směs Luminolu II. Detekce s Luminolem II byla schopna prokázat přítomnost krevních vzorků při nižších hodnotách zředění krve než Luminol I. A to v rozmezí mezi 5 000x - 10 000x zředění krve. Dále si Luminol II zachoval svou účinnost i za podmínek, kdy byl 7 dnů uskladněn v ledničce (4 °C).

Luminol I byl účinný pouze při použití jako čerstvá směs a 24 hodin skladovaná směs v ledničce (4 °C). Pod podmínkou uskladnění směsi Luminolu I 4 týdny v ledničce (4 °C) měla tato směs hodnoty intenzity CL v oblasti pozadí. Delším skladováním směsi Luminolu I v ledničce, ztrácí tato směs svou stabilitu. Není tedy schopna detekce krevních stop.

Uskladněním Luminolu I a Luminolu II v mrazáku (-18 °C) si tyto směsi zachovaly svou stabilitu a byly stále schopny prokázat přítomnost krve.

Nejvyšší citlivost se u všech detekcí pohybovala v oblasti mezi 1 000x – 5 000x zředěnou krví. V této oblasti není ve vzorku na pohled patrné, že krev obsahuje.

Při porovnání detekcí prováděných při 25 °C (pokojové teplotě) a při 35 °C byla účinnost při 35 °C nižší. Krevní vzorek byl ovlivněn touto teplotou, která snížila katalytickou schopnost Fe^{2+} iontů (v hemoglobinu) na CL reakci luminolu. Proto intenzita CL nebyla tak vysoká jako při 25 °C, ale CL směsi luminolu byly stále schopny prokázat přítomnost krve.

Po ekonomické stránce se porovnávaly náklady na chemikálie, které byly použity pro detekce pomocí CL směsí luminolu. Nejprve se porovnal náklady na pořízení samotných chemikálií. Z toho porovnání vychází Luminol I < Luminol II (1 759,2 Kč < 1 980,8 Kč).

Pro detekci, která byla předmětem práce a jejíž objem se přepočítával na hodnotu 300 μl (potřebný objem pro detekci tří jamek obsahující krevní vzorek) byla určena cena Luminolu I, Luminolu II a Bluestar® Forensic Tablets.

Z tohoto porovnání je Luminol I nejlevnější variantou. Cena na 300 μl je rovna 0,14 Kč u Luminolu II cena činí 0,30 Kč. Jako nejdražší pro detekci vyšla sada Bluestar® Forensic

Tablets. Jeho cena je desetinásobkem nejlevnější varianty Luminolu I (Bluestar® Forensic Tablets je rovna 1,01 Kč na 300 µl).

6. Summary

Luminol chemiluminescence reaction has become one of the most common methods used to detect blood in the crime scene. The mixture of luminol was improved.

In this study, a blood sample was detected with the help of mixture of luminol. These luminol mixtures were designed by Grodsky (Luminol I) and Weber (Luminol II).

A blood sample was diluted by the gradual dilution of 100x, 500x, 1 000x, 5 000x, 10 000x, 50 000x, 100 000x, 500 000x. Measurements were performed with instruments Fluoroskan Ascent FL.

The most effective for the detection of blood samples was Luminol II. Detection with Luminol II was able to demonstrate the presence of blood samples in the higher values of dilution (in the range between 5 000x-10 000x dilution of blood).

Luminol I was effective as a fresh and stored for 24 hours compound. After four week of the storage (in the fridge), chemiluminescent intensity of the Luminol I was in the background.

The highest intensity in all areas of detection ranged between 1 000x – 5 000x diluted blood. In this area blood is no visible by naked eyes. Luminol I and Luminol II had higher efficiency yet, also when they were stored for 4 weeks in the freezer.

When comparing the detection carried out at 25 ° C (room temperature) and at 35 ° C, there were not significant differences. The efficiency at 35 °C was lower. The reason was that the blood was influenced by temperature. The catalytic ability of Fe^{2+} ions (in hemoglobin) was influenced by the temperature.

In the economic part, there was a comparison of the cost of the chemicals that were used for detection. Three mixtures of luminol were compared. Firstly, there was a the comparison of price between Luminol I and Luminol II. luminol Luminol I < Luminol II (Chemical costs 1 759,2 Kč < 1 980,8 Kč). Secondly, there was the comparison of Luminol I, Luminol II and Bluestar ® Forensic Tablets. This comparison has showed which detection for 300 µl was cheaper.

The cheapest option is Luminol I. Price is 0,14 Kč and for Luminol II is price 0,30 Kč. The most expensive option is Bluestar ® Forensic Tablets (1,01 Kč).

7. Literatura

1. I. Weaks; Chemiluminescence immunoassay, *Comprehensive Analytical Chemistry*, Elsevier, Amsterdam 1992, Vol. 29.
2. Doc.RNDR. K. Vacek, CSc.; RNDr. J. Pantoflíček, CSc.; Otakar Jelínek, prom. Fyzik, *Luminiscence II.*, Praha 1972, str. 95-120
3. C. Dodeigne; L. Thunus; R. Lejeune; Chemiluminescence as diagnostic tool. A review, Elsevier Science B.V., *Talanta* 52 (2000), p.415-439
4. A. K. Campbell; G. Sala-Newby; Bioluminescent and Chemiluminescent Indicators for Molecular Signalling and Function in Living Cells, *Fluorescent and Luminescent Probes for Biological Activity, A Practical Guide to Technology for Quantitative Real Time Analysis*, Department of Medical Biochemistry, University of Wales College of Medicine, Cardiff, UK, 1992, Chapter 5, p. 59-70
5. F. Barni; S. W. Lewis; A. Berti; G. M. Miskelly; G. Lago; Forensic application of the luminol reaction as a presumptive test for latent blood detection, *Science Direct, Talanta* 72 (2007), p. 896-913
6. S. S. Tobe, M.Sc.; N. Watson, Ph.D.; and N. Nic Dae'íd, Ph.D.; Evaluation of Six Presumptive Tests for Blood, Their Specificity, Sensitivity, and Effect on High Molecular-Weight DNA, *J Forensic Sci*, January 2007, Vol. 52, No. 1, p. 102-109
7. K. De Wael; L. Lepot; F. Gason; B. Gilbert; Identification of blood, *Sourcebook in Forensic Serology, Immunology, and Biochemistry*, National Criminal Justice Reference Service, 2008, p.75-79, 112-115
8. A. M. Gross, M-S.; K. A. Harris, B.S.; G. L. Kaldun, B.S.; The effect of Luminol on Presumptive Tests and DNA Analysis Using the Polymerase Chain Reaction, *Journal of Forensic Science*, 1997, p. 837-840

- 9.** M. Grodsky; K. Wright; and P. L. Kirk; Simplified preliminary blood testing An Improved Technique and a comparative Study of Methods, *The Journal of Criminal Law, Criminology, and Police Science* 1951, Vol. 42, No.1, p. 95-104
- 10.** S. Trojan a kolektiv; *Lékařská fyziologie*, Grada Publishing a.s. 2003, str. 121-130
- 11.** K. Virkler; I. K. Lednev; Analysis of body fluids for forensic purposes: From laboratory testing to non-destructive rapid confirmatory identification at a crime scene, *Forensic Science International* 188 (2009), p. 1-17
- 12.** Fluoroskan Ascent® FL & Fluoroskan Ascent®, User Manual, User Manual Rev. 2.4; Cat. no. 1506450 Nov. 2008
- 13.** <http://www.sigmaaldrich.com/czech-republic.html>; datum stažení: 31.3.2011
- 14.** <http://www.pentachemicals.eu>; datum stažení: 31.3.2011
- 15.** <http://www.lach-ner.com/>; datum stažení: 31.3.2011
- 16.** L. Dilbeck; Use of Bluestar Forensic in Lieu of Luminol at Crime Scenes, *Journal of Forensic Identification*, Scottsdale Police Department Scottsdale 2006, AZ , 706 / 56 (5)
- 17.** Bluestar® Forensic Latent bloodstain reagent; Bluestar® Forensic Tablets, User's Manual, 200
- 18.** <http://www.4n6shop.cz/product/krimi/uv-detekce-krve-/bluestar-forensic-luminol/6>; datum stažení: 31.3.2011

Seznam použitých zkratk

CL - chemiluminiscence

RLU - Relative Light Units