



Przygotowanie próbek śladów biologicznych pochodzenia tkankowego (włosów ludzkich) do oznaczania metali techniką atomowej spektrometrii absorpcyjnej

Najbogatszym źródłem wiedzy o popełnionym przestępstwie i jego sprawcy jest miejsce zdarzenia, gdzie zabezpieczone zostają różnego rodzaju materiały dowodowe. W kryminalistyce materiał dowodowy pochodzenia ludzkiego, zwierzęcego lub roślinnego nazywany jest śladem biologicznym. Wyróżniamy ślady biologiczne pochodzenia tkankowego (krew, osocze, paznokcie, włosy, zęby, kości, fragmenty roślin), wydzieliny (ślina, nasienie, wydzielina łojowa, pot) oraz wydaliny (kał, mocz, smółka płodowa). Ślady biologiczne, zebrane na miejscu zdarzenia, mogą nieść ze sobą niezwykle istotne informacje na temat ofiary, sprawcy, a także samego zdarzenia. Należy się jednak liczyć z tym, iż ślady te nie są trwałe i łatwo mogą ulec zniszczeniu. Z punktu widzenia trwałości, włosy są śladem szczególnym, gdyż w przeciwieństwie do pozostałych rodzajów materiału biologicznego czynniki atmosferyczne i środowiskowe, grzyby i bakterie nie wywierają większego wpływu na strukturę włosa, a zatem również na jego trwałość. Wysoka odporność włosów na wymienione czynniki czyni je ważnym obiektem badań kryminalistycznych [1].

Poddając analizie materiał dowodowy jakim są włosy, należy pamiętać, że włosy mogą być nośnikiem innych śladów (takich jak: krew, ślina, nasienie, naskórek, kurz, pył, zarodniki roślin, szczątki zwierząt, drobiny szkła), które także dostarczają dodatkowych informacji mających znaczenie w procesie wykrywczym. Aby móc skorzystać z wszelkich informacji, jakie niosą ze sobą zabezpieczone na miejscu zdarzenia włosy, niezbędne jest oznaczenie ich cech morfologicznych takich jak długość, barwa, stopień połysku, kształt, rozciągliwość, odporność na rozerwanie, sprężystość oraz zanieczyszczenia i zabrudzenia mogące się znajdować na powierzchni włosa. Przydatna jest również wiedza na temat ich składu chemicznego [1,2].

Badania większości śladów biologicznych z uwagi na ich ograniczoną trwałość oraz zmienność składu płynów ustrojowych takich jak krew, ślina czy mocz są trudne. Eliminacja składników z organizmu człowieka (alkohol, narkotyki, leki, środki psychotropowe, trucizny), w kierunku których prowadzi się badania, z krwi czy moczu jest stosunkowo szybka co po pewnym czasie uniemożliwia stwierdzenie ich obecności w płynach ustrojowym człowieka. Alternatywną metodą, pozwalającą na stwierdzenie obecności pewnych związków w organizmie badanej osoby nawet po zaprzestaniu ich przyjmowania, jest analiza włosów. Na całej długości włosa gromadzą się bowiem minerały i substancje aktywne obecne w organizmie. Za pośrednictwem plazmy, limfy i płynów, stanowiących środowisko metaboliczne, wszystkie elementy nierozpuszczalne takie jak: leki, środki odurzające, metale, mikroelementy, docierają do cebulki i można je wykryć podczas analizy. Materiał biologiczny jakim są włosy może być wykorzystany do badań w czasie życia jak i po śmierci badanego.

Od zewnątrz włos otoczony jest powłóczką, na którą składa się pojedyncza warstwa komórek płaskich – łusek kutikuli, których kształt, wielkość i ułożenie jest cechą charakterystyczną każdego człowieka. Białko zawarte we włosach to głównie α -keratyna (85-93%), której skład aminokwasowy charakteryzuje się dużą zawartością cysteiny (11%) oraz lecytyny (15,5%), kwasu





glutaminowego (12%) oraz argininy (10,2%) [2]. Składniki mineralne stanowią 0,25 – 0,95% masy włosa. Podczas wzrostu włosa pierwiastki śladowe pochodzenia endogennego (dostarczane na drodze doustnej lub wziewnej przez płuca) dzięki obecności grup tiolowych (-SH) w cysteinie wbudowywane są równomiernie do wnętrza włosa, przy czym stężenie pierwiastków ulega zmianie wzdłuż oraz w poprzek włosa. Jony metali pochodzenia egzogenego (pochodzące np. z otoczenia, kosmetyków) mogą wiązać obecne na powierzchni włosa inne peptydy oraz błony komórkowe poprzez mechanizm jonowymienny. Zawartość pierwiastków na powierzchni włosów zmienia się pod wpływem stosowania szamponów leczniczych zawierających w swoim składzie sód, selen, cynk i tytan oraz malowania włosów środkami koloryzującymi często zawierającymi bar, wapń, miedź, magnez, sód oraz stront. Włosy mogą ulec zanieczyszczeniu w sposób naturalny wydzieliną z gruczołów potowych oraz łojowych. W pocie ludzkim występują głównie sole potasu, sodu, wapnia oraz cynku. Zróżnicowana zawartość pierwiastków wraz ze zmianą odległości od korzenia włosa oraz możliwość zanieczyszczenia powierzchni włosów stwarza potrzebę opracowania i stosowania odpowiednich procedur przygotowywania włosów przed analizą pierwiastków techniką atomowej spektrometrii absorpcyjnej [2].

Do najważniejszych problemów, które należy rozwiązać przygotowując włosy do badań należą:

- różne stężenie pierwiastków w poszczególnych segmentach wzrostowych włosów, co wymaga homogenizacji. Do analizy powinny być stosowane odcinki włosów o długości od 5 mm do 40 mm. Rozdrobnienia dokonuje się nożycami ze stali nierdzewnej;
- wpływ sposobu mycia włosów na zawartość pierwiastków we włosach, wymaga opracowania odpowiednich procedur mycia włosów umożliwiających rozróżnienie pomiędzy egzogenną a endogenną zawartością pierwiastków we włosach;
- konieczność mineralizacji próbki przed oznaczaniem pierwiastków techniką FAAS, co wymaga zastosowania odpowiednich warunków pozwalających na rozłożenie matrycy organicznej bez strat pierwiastków lotnych (Hg, Sb, Pb) [2].

Uwaga!! Włosy jako materiał biologiczny pochodzący od ludzi może być materiałem potencjalnie zakaźnym. Dlatego wszystkie czynności należy bezwzględnie wykonywać w jednorazowych rękawiczkach lateksowych oraz odzieży ochronnej. W przypadku skaleczenia skóry (np. zranienie szkłem, ukłucie igłą, zadrapanie nożycami), wycisnąć krew z miejsca zranienia i zdezynfekować. Następnie przemyć ranę pod dużą ilością bieżącej wody (3-15 minut), a następnie z użyciem mydła i ponownie zdezynfekować oraz założyć jałowy opatrunek [3].

Cel ćwiczenia

Celem ćwiczenia jest przygotowanie próbek włosów do oznaczania metali techniką atomowej spektrometrii absorpcyjnej.





Odczynniki i próbki

- aceton
- 65% HNO₃
- 30% H₂O₂
- woda destylowana
- 14 próbek włosów o masie ok 1 g

Sprzęt i szkło laboratoryjne

- mikroskop optyczny, cieplarka, lupa
- płytką grzejną, waga analityczna,
- zlewki na 100 mL, tygle kwarcowe,
- kolby miarowe na 25 mL, pipety pastera,
- cylinder miarowy na 50 mL H₂O, flamaster,
- łyżeczki, bibuła filtracyjna, saczki,
- czarna kartka, biała kartka,
- rękawiczki jednorazowe, nożyczki,

1. Oznaczenie cech morfologicznych włosów

W celu określenia barwy, długości, stopnia połysku, kształtu, rozciągliwości, sprężystości oraz zanieczyszczeń i zabrudzeń mogących się znajdować na powierzchni włosów z próbki X należy przeprowadzić:

- **badania makroskopowe włosów z próbki X** polegające na ustaleniu długości, stopnia połysku, barwy, kształtu, rozciągliwości, sprężystości. Wykorzystujemy do tego celu linijkę, lupę oraz kartki koloru czarnego i białego (siwe i blond badamy na kartce czarnej, a rude, kasztanowe, szatyn, brunatne, czarne - na kartce białej);
- **badania mikroskopowe włosów z próbki X** – mające na celu identyfikację zanieczyszczeń i zabrudzeń mogących się znajdować na powierzchni włosa wykonujemy wykorzystując mikroskop optyczny.

Porównując cechy morfologiczne włosów z próbki X z cechami próbek przedstawionymi w poniższej tabeli wybrać 3 najbardziej podobne próbki do dalszych badań.

2. Oczyszczenie próbek włosów

Przed poddaniem włosów dalszej analizie niezbędne jest ich rozdrobnienie oraz usunięcie zanieczyszczeń z ich powierzchni. W tym celu należy zastosować procedurę rekomendowaną przez międzynarodową Agencję Energii Atomowej (IAEA) składającą się z 5 etapów mycia za pomocą acetonu i wody dejonizowanej. **Wykonanie:**

- odważyć po ok 0,25 g próbek włosów wybranych do badań,
- próbki włosów pociąć na pasma o długości 5 – 10 mm,
- umieścić rozdrobnione włosy w zlewce o objętości 100 mL,
- włosy myć na mieszadle magnetycznym przez 10 min kolejno w: 50 mL acetonu, w 50 mL wody dejonizowanej (trzykrotnie) i na zakończenie w 50 mL acetonu. Po każdorazowym myciu zdekantować ciecz i dodać świeżego rozpuszczalnika,
- włosy po ostatnim etapie mycia acetonem należy suszyć do stałej masy przez ok 120 min w zlewkach przykrytych bibułą w cieplarni (T = 60-80°C)





Nr próbki	Płeć	Wiek	Kolor włosów	Długość włosów	Połysk	Zanieczyszczenia na powierzchni włosów
1	mężczyzna	40 lat	brązowe	< 1 cm	tak	liczne skupiska kryształków
2	kobieta	40 lat	kasztanowo-brązowe	< 5 cm	tak	drobne kryształki pojedyncze
3	kobieta	30 lat	brązowe	< 15 cm	tak	brak
4	chłopiec	5 lat	blond	< 3 cm	tak	liczne skupiska kryształków
5	chłopiec	15 lat	ciemny brąz	< 1 cm	tak	liczne skupiska kryształków
6	kobieta	32 lat	blond	< 20 cm	tak	brak
7	kobieta	30 lat	popielaty blond	< 10 cm	nie	brak
8	kobieta	28 lat	kasztanowy blond	< 10 cm	nie	brak
9	mężczyzna	60 lat	siwe	< 1 cm	nie	liczne skupiska kryształków
10	kobieta	20 lat	blond	< 10 cm	nie	brak
11	kobieta	50 lat	ciemny blond	< 3 cm	nie	liczne skupiska kryształków
12	mężczyzna	50 lat	brązowo-siwe	< 1 cm	tak	liczne skupiska kryształków
13	kobieta	25 lat	blond	< 20 cm	tak	drobne kryształki pojedyncze
14	kobieta	60 lat	rude	< 1 cm	tak	liczne skupiska kryształków
X	?	?	?	?	?	?

3. Mineralizacja próbek włosów

Mineralizację włosów należy przeprowadzić w tyglach kwarcowych na gorąco stosując 4 mL stężonego kwasu HNO_3 . **Wykonanie:**

- odważyć do tygli kwarcowych po ok 0,1g oczyszczonych uprzednio, suchych włosów,
- dodać do każdego tygla 4 mL stężonego gorącego kwasu HNO_3 i pozostawić w dygestorium na ok 10-15 minut.
- ogrzewać tygłe na płycie grzejnej ostrożnie mieszając (nie dopuścić do wrzenia) aż do uzyskania klarownego roztworu (ok 60 min), następnie odstawić do ochłodzenia.
- chłodny roztwór próbki przenieść ilościowo pipetą pasteurą do kolby miarowej o objętości 25 mL, tygiel opłukać dwukrotnie 5 mL wody dejonizowanej, wodę po płukaniu dołączyć do roztworu próbki w kolbce, po czym uzupełnić kolbkę wodą do kreski.
- kolbki z roztworem próbek zostawić w lodówce do oznaczania metali techniką AAS

Mineralizację włosów należy prowadzić w dygestorium w fartuchu, rękawicach i okularach ochronnych zachowując szczególną ostrożność.





UNIWERSYTET W BIAŁYMSTOKU

15-097 Białystok, ul. M. Skłodowskiej-Curie 14
tel. +48 85 745 70 00, fax +48 85 745 70 73, e-mail: uniwersytet@uwb.edu.pl

Przykładowe zagadnienia:

1. Rodzaje śladów biologicznych i ich trwałość w czasie
2. Cechy morfologiczne włosów
3. Informacje jakie możemy pozyskać na podstawie analizy włosa
4. Budowa i skład chemiczny włosów
5. Źródła endogenne i egzogenne pierwiastków we włosach
6. Czynniki mające wpływ na zawartość pierwiastków we włosach
7. Etapy procedury przygotowywania włosów przed oznaczaniem metali (homogenizacja, mycie, mineralizacja)
8. Wpływ sposobu mycia włosów na zawartość metali we włosach (tu poczytać jakie są inne oprócz stosowanej w ćwiczeniu procedury mycia włosów)

Literatura

1. K. Świech, Hair ultrastructure tests with the SEM method <https://www.researchgate.net/publication/270880359>
2. Magnez – pierwiastek życia; rozdział Magnez we włosach, Wydawnictwo Malamut, Warszawa 2016
3. R. Włodarczyk, E. Rzeczyc, „System zarządzania jakością w laboratorium wykonującym kryminalistyczne badania włosów”; Prokuratura Okręgowa w Zielonej Górze; <http://www.zielona-gora.po.gov.pl/index.php?id=26>

