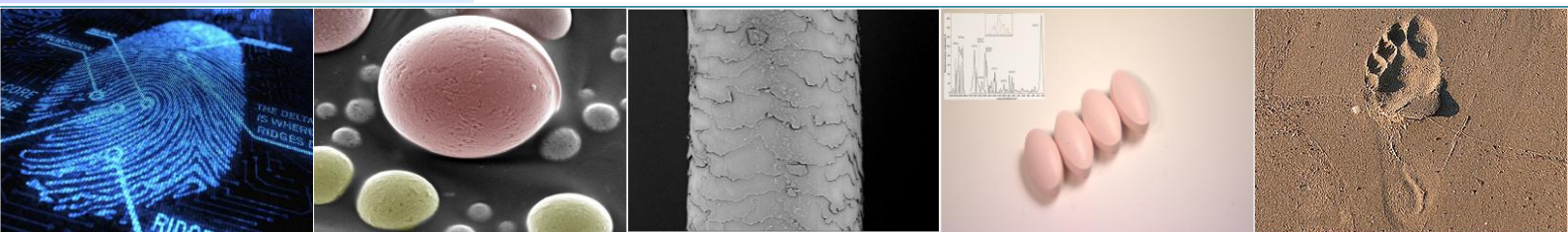


Ćwiczenie 5

Analiza materiałów kryjących metodą spektrofotometrii UV/Vis pod kątem kryminalistycznych badań dokumentów



I. Cel ćwiczenia

Celem ćwiczenia jest analiza atramentu użytego do napisania konkretnego dokumentu metodą spektrofotometrii UV/Vis.

Pytanie organu procesowego: Czy w skład dostarczonych materiałów dowodowych mogą wchodzić te same barwniki?

II. Wstęp teoretyczny

Przez materiały kryjące rozumiemy żele, atramenty, pasty długopisowe, tusze do drukarek czy pieczętek. Atrament to roztwór barwnika w wodzie lub alkoholu, zawierający substancje zagęszczające, chroniące przed wysychaniem oraz środki konserwujące. Jest dosyć transparentny, czym różni się od tuszu wykonywanego głównie z pigmentów a stosowanego również w materiałach pisarskich i drukarkach.

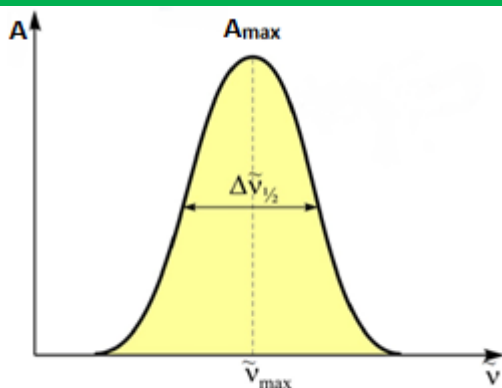
Producenci wytwarzają atramenty w skład których wchodzi jeden barwnik lub kombinacja kilku.¹ Po odpowiedniej ekstrakcji takiego materiału, w laboratoriach kryminalistycznych do jego analizy wykorzystuje się chromatografię cienkowarstwową, gazową, promieniowanie rentgenowskie, spektrometrię w podczerwieni czy też spektrofotometrię w zakresie widzialnym i UV.

Dzięki pomiarom spektroskopowym (spektroskopia - nauka o powstawaniu i interpretacji widm powstających w wyniku oddziaływań wszelkich rodzajów promieniowania z materiałem) jesteśmy w stanie uzyskać widma absorpcji danego barwnika i dokonać ich analizy.

Każda cząsteczka, również barwnika użytego do produkcji danego atramentu ma charakterystyczny dla siebie układ poziomów energetycznych: elektronowych, oscylacyjnych i rotacyjnych. Padające promieniowanie na np.: badany roztwór barwnika może zostać przez niego zaabsorbowane (pochłonięte). W wyniku absorpcji promieniowania ultrafioletowego lub widzialnego cząsteczka przechodzi do jednego z stanów wzbudzonych. Wykres zależności absorpcji padającego promieniowania od długości fali λ (lub częstotliwości) określa się mianem krzywej lub widmem absorpcji.

¹ *Barwniki przepuszczają częściowo światło, a wiele barwników występuje w naturze np.: hemoglobina czy chlorofil. Pigment natomiast to zazwyczaj drobno zmielone minerały mające zadanie barwiące, kryjące, zazwyczaj nierozpuszczalne i najczęściej nietransparentne.

Zarejestrowane widmo absorpcyjne molekuł w roztworach posiada pasma o różnej intensywności i szerokości. Jest to związane między innymi z różną szerokością stanów energetycznych i z niedoskonałością aparatury. W celu opisania otrzymanych wyników stosuje się parametry pasma spektralnego m.in.:



- częstość ν [s⁻¹], [Hz]
- liczba falowa $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹]
- długość fali λ

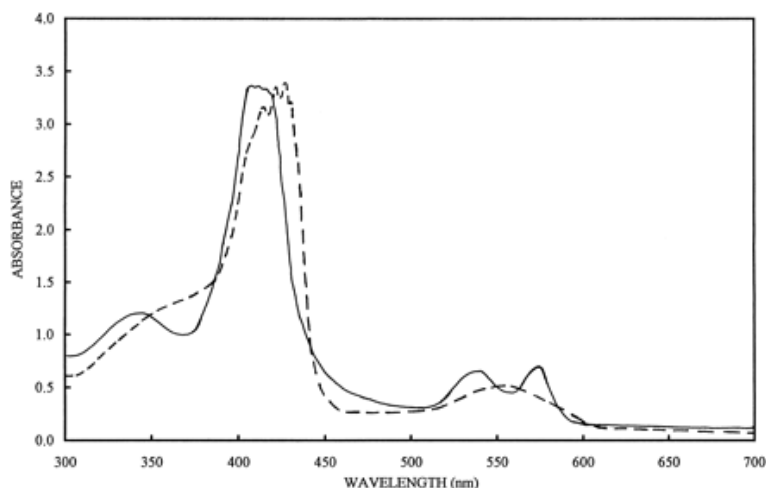
Foton, kwant energii promieniowania:

$$E = h\nu = h \frac{c}{\lambda} = hc\tilde{\nu}$$

$$h = 6,62 \times 10^{-34} \text{ [J s]}$$

- 1) intensywność w maksimum A_{\max} – wysokość konturu mierzona od poziomu tła
- 2) intensywność integralna A_{∞} - powierzchnia ograniczona konturem pasma oraz tłem,
- 3) szerokość połówkowa $\Delta\tilde{\nu}_{1/2}$ - szerokość konturu pasma wyznaczona w połowie wysokości.

Spektrofotometria może być pomocna w kryminalistyce nie tylko do wstępnej analizy atramentów, ale np.: do wykrywania krwi. Hemoglobina zawarta we krwi posiada charakterystyczne max. w paśmie absorpcji dla 400 nm.



Źródło: P. L. Reddy, L. J. Bowie, S. Callistein, 1997, *Clinical Chemistry*, "Binding of nitric oxide to thiols and hemes in hemoglobin H: implications for α -thalassemia and hypertension", "Figure shows the absorption spectra of purified oxygenated (solid line) and deoxygenated (dashed line) Hb A."

Wiązka promieniowania monochromatycznego po przejściu przez jednorodny ośrodek absorbujący o grubości d ulega osłabieniu zgodnie z równaniem (prawo Lamberta):

$$I = I_0 e^{-kd}$$

gdzie: I_0 - natężenie wiązki promieniowania monochromatycznego padającego na ośrodek absorbujący o grubości d , I - natężenie promieniowania po przejściu przez ośrodek, k - współczynnik absorpcji, e - podstawa logarytmu naturalnego.

W przypadku roztworów, jeżeli współczynnik absorpcji rozpuszczalnika jest równy zero, to absorbancja wiązki promieniowania monochromatycznego przechodzącej przez jednorodny roztwór jest wprost proporcjonalna do stężenia roztworu c i do grubości warstwy absorbującej d (prawo Beera - Lamberta) co możemy ostatecznie zapisać:

$$A_\lambda = \epsilon_\lambda \cdot c \cdot d$$

Stężenie substancji c wyraża się w [mol/l], ϵ - nosi nazwę molowego współczynnika absorpcji, jest charakterystyczny dla danego związku i jest wyrażony w [l/(mol·cm)], d - grubość warstwy absorbującej w [cm], zaś A to absorbancja.

Absorbancja jest wielkością addytywną tzn. absorbancja mieszaniny składników jest równa sumie absorbancji poszczególnych składników.

$$A = A_1 + A_2 + A_3 + \dots + A_n$$

III. Literatura

- 1.Z. Kęcki – „Podstawy spektroskopii molekularnej”, PWN, Warszawa 1982.
2. K.Pigoń, Z.Ruziewicz, „Chemia fizyczna”, PWN, Warszawa 1986r.
- 3.J. Grzywacz – „Spektroskopia absorpcyjna drobin z zastosowaniem do badań luminescencyjnych”, skrypt uczelniany UG, Gdańsk 1984.
4. J.R. Lakowicz, – “Principles of fluorescence spectroscopy”, Springer 2007.
5. Praca zbiorowa pod redakcją W. Zielińskiego i A. Rajcy – „Metody spektroskopowe i ich zastosowanie do identyfikacji związków organicznych” PWN, 2007.
6. J. Zięba-Palus (red.) „Mikroślady i ich znaczenie”, Wydawnictwo Instytutu Ekspertyz sądowych, Kraków 2015.
- 7.J. Wójcikiewicz (red.) Ekspertyza Sądowa. Zagadnienia Wybrane; Wolters Kluwer, Warszawa 2007.
- 8.L. Sobczyk, A. Kiswa i K. Gatner, – „Eksperymentalna chemia fizyczna”, PWN 1982.
- 9.I. Sołtyszewski, P. Polak – „Badania kryminalistyczne”, Wyd. UMW. Olsztyn, 2007.
10. Aldona Krężel – „Atramentowe Czary”, SSCH, Kraków, 2016.
- 11.A. Kawski, – „Fotoluminescencja roztworów”, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 1992.
- 12.B.Valeur- “Molecular Fluorescence. Principles and Applications”, 2001 Wiley-VCH.

IV. Zagadnienia do opracowania

- 1.Promieniowanie elektromagnetyczne: natura, cechy.
- 2.Energia wewnętrzna molekuł.
- 3.Spektroskopia i jej podział.
- 4.Budowa i zasada działania spektrofotometru.
5. Parametry widma spektralnego.
6. Zjawisko absorpcji światła w roztworach. Prawa absorpcji światła.

V. Zestaw przyrządów.



1. Zestaw komputerowy.
2. Spektrofotometr Shimadzu UVmini-1240.

VI. Wykonanie doświadczenia i opracowanie wyników

1. Zapoznaj się z instrukcją działania spektrofotometru dostępną w *Dodatku*.
2. Zmierz baseline dla kuwety wypełnionej metanolem w zakresie od 350 do 780 nm.
3. Zmierz widma absorpcji przygotowanych próbek w zakresie od 350 do 780 nm.
Badaniom zostanie poddanych 5 wypełnień do piór i długopisów. Zostały one wcześniej wyekstrahowane z papieru przy użyciu metanolu. (Do tego celu używa się również innych rozpuszczalników: acetonitrylu, pirydyny, DMF, ponieważ różnorodność materiałów kryjących na rynku uniemożliwia stosowanie tylko jednego ekstrahenta.) Należy pamiętać, że nie możemy używać tej metody w przypadku, gdy materiał dowodowy musi zostać nienaruszony.
4. Jedną wybraną próbkę rozcieńcz w metanolu w stosunku 1:1 i ponownie zmierz widmo absorpcji.
5. Nanieś wszystkie otrzymane widma absorpcji na jeden wykres.
6. Unormuj otrzymane widma do 1.
7. Przeanalizuj otrzymane wyniki. Można w tym celu posłużyć się tabelką zawierającą położenia maksimów pasm absorpcji lub zaprojektować własną tabelę.

Nr próbki	1	2	3	4	5
Max. absorpcji [nm]					

Postaraj się odpowiedzieć na pytania: czy widma absorpcji dla 5 próbek są podobne? W jakim zakresie absorbuje przygotowany do analizy materiał, jakie są szerokości połówkowe głównych pasm w widmie absorpcji, dla jakiej długości fali przypadają maksima głównego pasma absorpcji. Czy po rozcieńczeniu wybranej próbki i znormalizowaniu widma do 1 otrzymaliśmy to samo?

8. Spróbuj zidentyfikować chociaż jeden barwnik użyty do otrzymania jednego z badanych wypełnień. Wyszukaj jakie barwniki stosuje się do produkcji atramentów oraz ich widma absorpcji, dokonaj porównania z wynikami które otrzymałeś? Pamiętaj, że kształt i położenie widma absorpcji mogą się zmieniać i weź to pod uwagę porównując znalezione przez siebie widma z otrzymanymi w trakcie wykonywania ćwiczenia.

9. Sprawozdanie ma mieć charakter przykładowej opinii biegłego tzn.: zawierać takie elementy jak:

- imię, nazwisko, stopień i tytuł naukowy, specjalność i stanowisko zawodowe biegłego;
- imiona i nazwiska oraz pozostałe dane innych osób, które uczestniczyły w przeprowadzeniu ekspertyzy, ze wskazaniem czynności dokonanych przez każdą z nich, w przypadku opinii instytucji - także pełną nazwę i siedzibę instytucji;
- czas przeprowadzonych badań oraz datę wydania opinii;
- szczegółowy opis nadesłanego materiału dowodowego, porównawczego (sposób zabezpieczenia podczas transportu, opis opakowania, jego cechy ogólne i indywidualne) i cytowane pytania organu procesowego;
- informację o zastosowanych technikach i metodach;
- sprawozdanie z przeprowadzonych badań i obserwacji;
- interpretację wyników i wnioski;
- podpisy wszystkich biegłych, którzy uczestniczyli w wydaniu opinii.

Opinia powinna być napisana zrozumiałym językiem, a wnioski powinny być bardzo czytelne, zwłaszcza dla organów procesowych (dla prokuratury i sędziego).

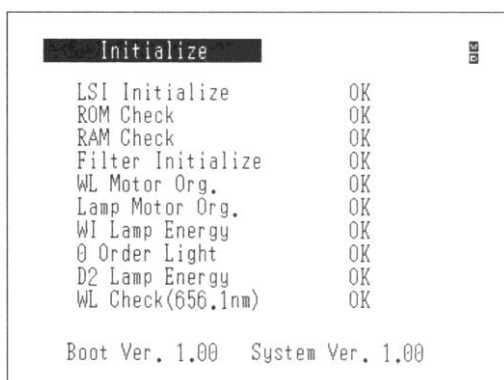
Dodatek

Instrukcja obsługi stanowiska do pomiaru widm absorpcji

I. Włączanie spektrofotometru.

1. Włączyć komputer i monitor.
2. Włączyć spektrofotometr (wyłącznikiem na tylnej ścianie spektrofotometru). Włączenie zasilania zapoczątkuje proces inicjalizacji spektrofotometru, podczas którego jest testowana praca jego poszczególnych podzespołów.

Po ukończeniu inicjalizacji ekran spektrofotometru powinien przedstawiać się jak na *Rysunku 2*.



Rysunek 2. Ekran spektrofotometru po prawidłowo zakończonej inicjalizacji.

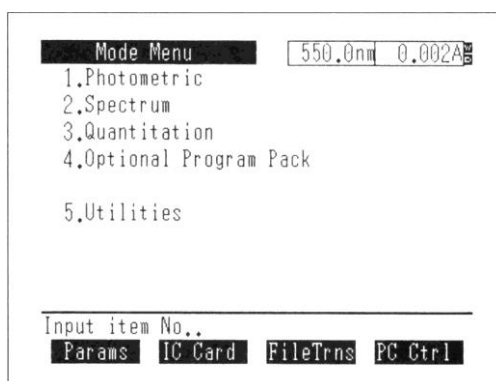


Wskazówka

Dla uzyskania optymalnych warunków pracy, należy odczekać co najmniej 10 minut po zakończeniu inicjalizacji spektrofotometru.

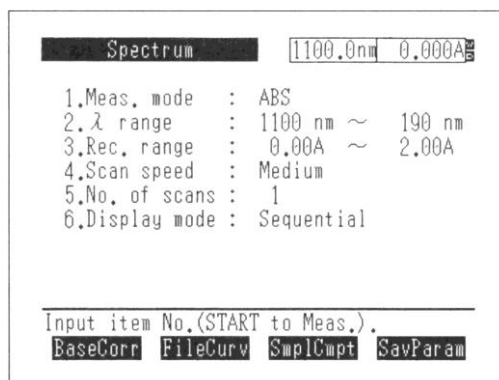
II. Ustawianie parametrów pomiarowych.

W trybie pracy spektrofotometru umożliwiającym wybór rodzaju pomiaru (*Rysunek 3*) należy wybrać opcję 2 . Spectrum.



Rysunek 3. Ekran spektrofotometru gotowego do pracy.

Ekran spektrofotometru będzie wyglądał jak na Rysunku 4.



Rysunek 4. Ekran trybu wyboru parametrów pomiarowych dla pomiarów widm

Posługując się klawiaturą spektrofotometru należy wprowadzić następujące parametry:

1.Meas. mode	:	ABS
2.λ range	:	350 nm ~ 550 nm
3.Rec. range	:	0.00A ~ 2.00A
4.Scan speed	:	very slow
5.No. of scans	:	1
6.Display mode	:	Sequential

III. Pomiar linii bazowej.

Pomiaru linii bazowej należy dokonać ze względu na konieczność uwzględnienia właściwości spektralnych zarówno samej kuwety (musi być identyczna jak kuweta pomiarowa, w której wykonywane będą pomiary widm przygotowanych roztworów), jak i rozpuszczalnika, w którym rozpuszczono badaną substancję. W tym celu należy wsunąć kuwetę z czystym rozpuszczalnikiem w uchwyt na kuwety, pokazany na Zdjęciu 5.



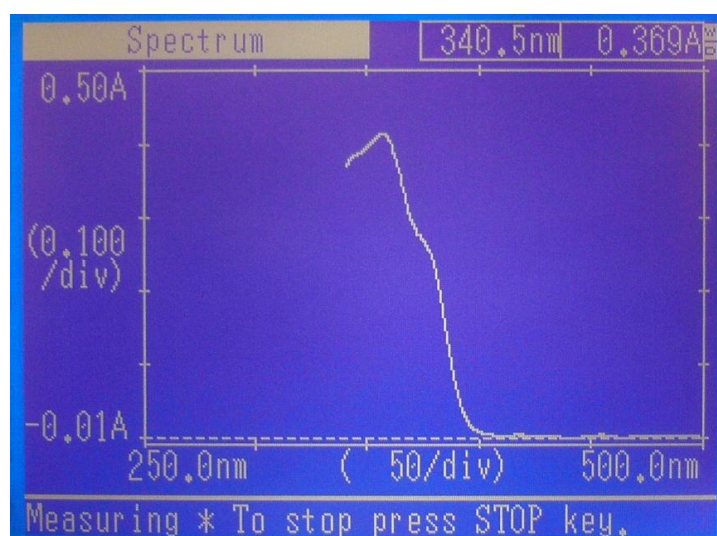
Zdjęcie 5. Widok otwartej komory na próbki spektrofotometru: 1 – uchwyt na kuwety.

Po umieszczeniu kuwety w uchwycie i zamknięciu komory spektrofotometru, należy uruchomić pomiar linii bazowej naciskając klawisz F1 (BaseCorr). Podczas pomiaru spektrofotometr kilkakrotnie dokona pomiarów dla zadanego zakresu. Odczekać chwilę na automatyczne zakończenie pomiaru, oznajmione krótkim sygnałem dźwiękowym spektrofotometru.

Po wykonaniu pomiaru linii bazowej, wyjąć kuwety z czystym rozpuszczalnikiem z uchwytu na kuwety.

IV. Pomiar widm absorpcji.

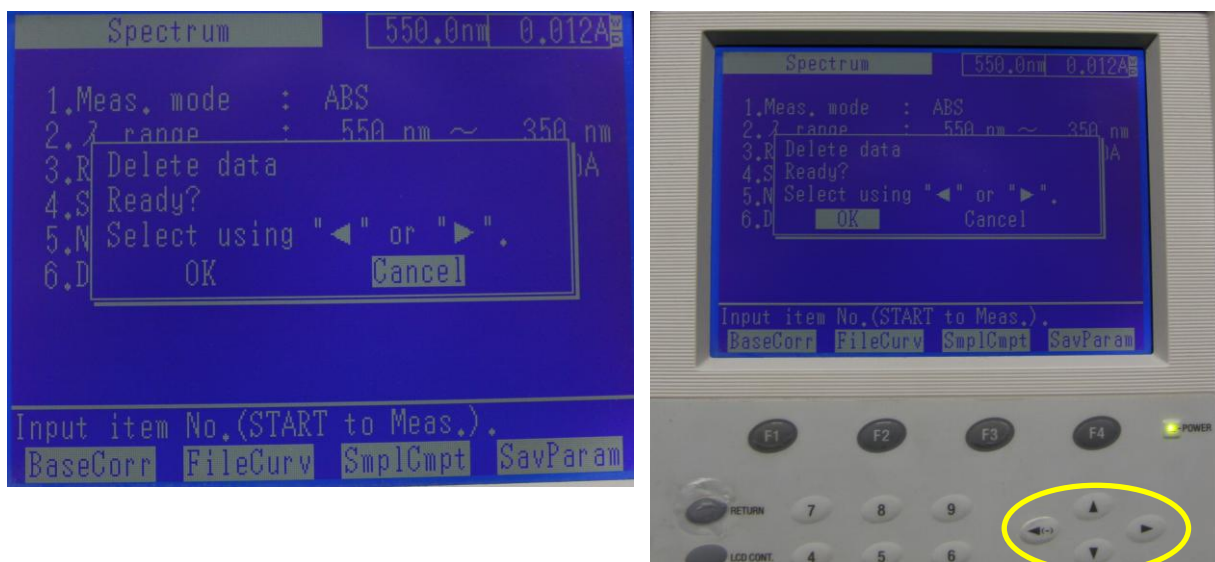
Umieścić kuwety z badanym roztworem w uchwycie wewnątrz komory na próbki spektrofotometru (Zdjęcie 5). Po zamknięciu komory spektrofotometru, uruchomić pomiar widma absorpcji wciskając klawisz START/STOP. Widok ekranu w trakcie pomiaru widma absorpcji jest przedstawiony na Zdjęciu 6.



Zdjęcie 6. Ekran spektrofotometru podczas pomiaru widma absorpcji.

V. Zapis zmierzonych danych na dysku komputera.

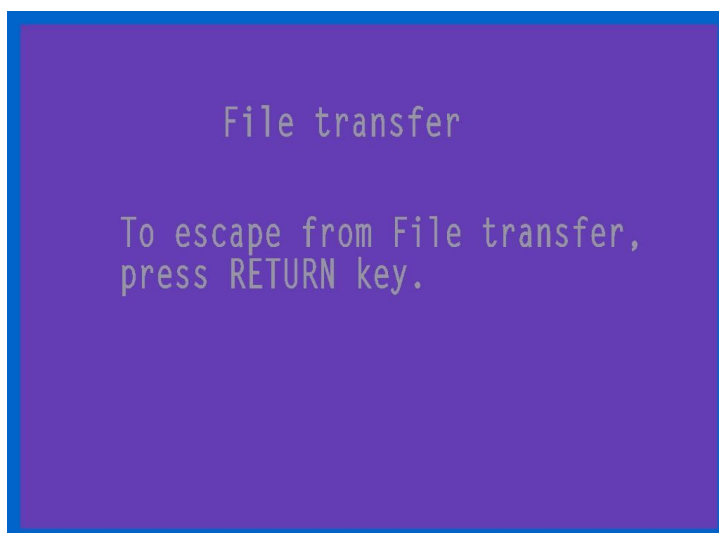
Po zakończonym pomiarze, należy przesłać dane do komputera. W tym celu spektrofotometr należy ustawić w trybie transferu plików. Wymaga to przejścia do trybu wyboru rodzaju pracy spektrofotometru (poprzez dwukrotne naciśnięcie klawisza RETURN). Na ekranie pojawi się okno:



Zdjęcie 7. Ekran spektrofotometru.

Klawiszami ze strzałkami wybierz OK, potwierdź wybór przyciskiem ENTER.

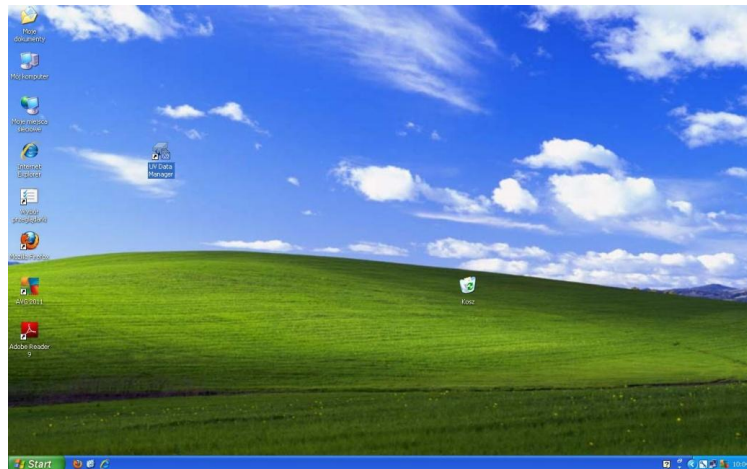
Ekran powinien wówczas wyglądać jak na *Rysunku 3*. W tym trybie, klawiszem F3 (FileTrans) ustawić spektrofotometr w gotowości do transmisji plików. Wówczas ekran spektrofotometru przedstawia się następująco (*Zdjęcie 8*):



Zdjęcie 8. Ekran spektrofotometru w trybie przesyłania plików.

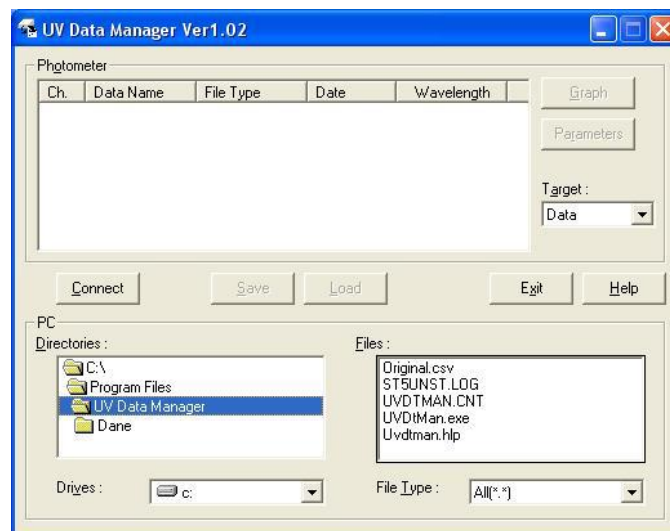
Aby wyjść z trybu transmisji plików, po zakończonej transmisji, należy nacisnąć klawisz RETURN.

Uruchomić program UV Data Manager na komputerze klikając dwukrotnie wskaźnikiem myszki na ikonę programu (Zdjęcie 9).



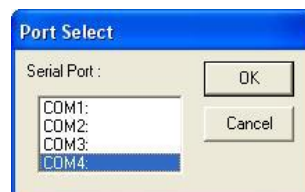
Zdjęcie 9. Widok ekranu monitora.

Po uruchomieniu programu otrzymuje się następujący widok ekranu (Zdjęcie 10):



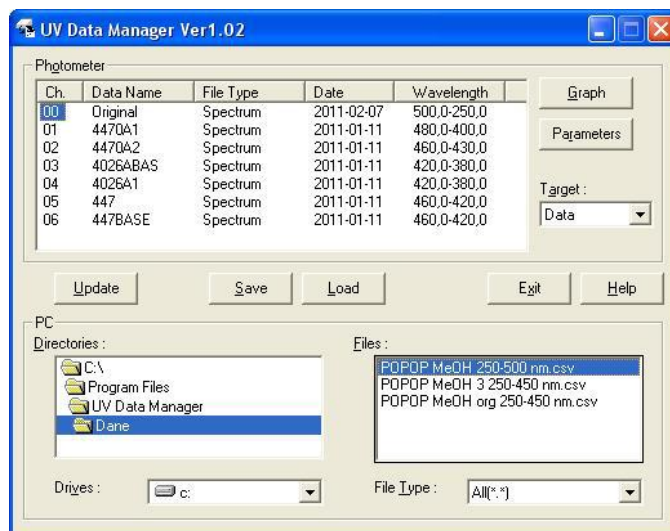
Zdjęcie 10. Okno programu UV Data Manager.

Należy połączyć komputer ze spektrofotometrem klikając raz na przycisk Connect. Na ekranie komputera pojawi się wtedy okienko z pytaniem o wybór portu komputera (Zdjęcie 11), przez który ma nastąpić transmisja danych.



Zdjęcie 11. Okienko wyboru portu do transmisji danych.

Po wyborze portu COM4 (poprzez naciśnięcie OK) nastąpi przekazanie danych ze spektrofotometru do pamięci komputera a okno programu będzie wyglądać jak na *Zdjęciu 12*.



Zdjęcie 12. Okno UV Data Manager po wykonanej transmisji danych ze spektrofotometru.

Zmierzone dane (krzywa absorpcji w postaci tabeli z długościami fal i wartościami fotometrycznymi oraz z parametrami pomiaru) są zawsze umieszczone w pliku „Original” (widoczny w oknie „Photometer”) stąd do zapisu danych na dysku komputera należy zaznaczyć kanał **Ch**, tak jak na *Zdjęciu 12*. Jako aktywny MUSI BYĆ zaznaczony podkatalog „Dane” w okienku „Directories”. Rozwijalne okno „Target” musi mieć wartość „Data”. Po naciśnięciu wskaźnikiem myszki przycisku „Save” otworzą się typowe okna dialogowe umożliwiające zapis na dysku pliku użytkownika. W rozwijalnej liście „File Type” należy wybrać „Text (*.csv)” i w odpowiednim oknie wpisać nazwę pliku.

Ze względu na sposób zapisywania danych w spektrofotometrze i format transmisji danych pomiędzy spektrofotometrem i komputerem, każdy pomiar musi być przekazywany do komputera i na nim zapisywany zgodnie z powyższą instrukcją.

Aktualnie **nie jest możliwe** dokonywanie wielokrotnych pomiarów w spektrofotometrze z późniejszym ich przekazaniem do komputera.

Każdy kolejny pomiar widma absorpcji, po jego wykonaniu w spektrofotometrze, należy przekazać do komputera (po uprzednim ustawieniu spektrofotometru w trybie transmisji danych opisanym wyżej) klikając przycisk „Update” w oknie programu UV Data Manager (*Zdjęcie 12*).



UWAGA!

Podczas importu danych do programu Origin uwzględnić format CSV zapisywanych plików.

Dane zapisywane w plikach CSV mają następujący format:

500,0, 0,0022
499,5, 0,0017
499,0, 0,0026
498,5, 0,0026
498,0, 0,0026
497,5, 0,0027
497,0, 0,0027 itd.