



Kapillaarielektroforeesi rikostekniikassa

Eemeli Seppänen
Kandidaatintutkielma
Kemian tutkinto-ohjelma
Oulun yliopisto
2021

TIIVISTELMÄ

Kapillaarielektroforeesi on erotusmenetelmä, jonka avulla voidaan erottaa hiukkaset toisistaan. Erotus perustuu hiukkasten erilaisiin liikkuvuuksiin nesteessä, mihin on luotu sähkökenttä. Laitteen selkeimpiä etuja on sen monipuolisuus sekä erittäin hyvä selektiivisyys. Rikosteknisissä tutkimuksissa laite onkin antanut uusia mahdollisuuksia esimerkiksi enantiomeerien selvittämiseksi.

Rikostekniset tutkimukset ovat haastavia, sillä monet muuttujat vaikuttavat mittaustuloksiin. Näytteet koostuvat usean komponentin yhdistelmistä ja erilaiset kontaminaatiot näytteenotossa tuovat lisähaastetta analyysiin. Tämän vuoksi näytteen analysoitavat spesiekit tulee erottaa toisistaan, jonka jälkeen saadaan virhemarginaalien sisällä olevia mittaustuloksia. Kapillaarielektroforeesia voidaan hyödyntää, kun analysoidaan esimerkiksi musteiden koostumuksia, dna-näytteitä ja huumausaineiden enantiomeerejä.

Musteanalyysit kapillaarielektroforeesilla ovat osoittautuneet hyödylliseksi väärennöstudiuksissa. Musteista on saatu analysoitua pääkomponentit ja tämän jälkeen on voitu karakterisoida eri valmistajien musteet. Karakterisoinnin avulla voidaan kertoa virallisista dokumenteista mitkä ovat väärennettyjä ja mitkä alkuperäisiä.

Tulevaisuudessa kapillaarielektroforeesia tullaan kehittämään ja hyödyntämään rikostekniikassa. Laite on monipuolinen, jonka vuoksi sitä voidaan soveltaa yhä useampaan tutkimuksen kohteeseen. Laitteen mahdollisuudet ovat tämän takia suuret, jonka vuoksi uusia ja erilaisia tutkimuksia voidaan olettaa erilaisilta aloilta.

Sisällysluettelo

Tiivistelmä	2
1. Johdanto	4
2. Kapillaarielektroforeesi	5
2.1 Laitteisto	5
2.2 Elektro-osmoottinen voima.....	6
2.3 Näytteen analysointi	9
2.3.1 Injektointi	9
2.3.2 Detektointi.....	10
3. Rikostekniikka	12
3.1 Rikostekninen tutkimus.....	12
3.2 Rikostekninen analyysi	14
4. Kapillaarielektroforeesi rikosteknisissä analyyseissa	16
4.1 Musteanalyysit	16
4.2 Lääke- ja huumeaineiden analyysit	19
5. Yhteenveto	21
6. Kirjallisuusviitteet	23

1. JOHDANTO

Rikostekniikka ja rikostekninen tutkimus koostuvat useasta erilaisesta osa-alueista, joiden avulla saadaan kattavat todistusaineistot oikeuteen. Kemiallisella ja biologisilla analyyseillä voidaan karakterisoida rikospaikan kemialliset näytteet, joiden avulla voidaan kertoa mistä komponenteista räjähdde on koostunut. Useimmat näytteet koostuvat monen komponentin yhdistelmästä, joten ennen erilaisia analyysejä tulee pääkomponentit erottaa toisistaan. Kapillaarielektroforeesi onkin erotusmenetelmänä erittäin hyvä rikosteknisissä tutkimuksissa sen monipuolisuuden vuoksi. Kapillaarielektroforeesia hyödynnetään musteiden ja maalien tunnistuksessa, huumeanalytiikassa ja toksikologisissa tutkimuksissa.¹

Kapillaarielektroforeesi on erittäin pienille ja kompleksoituneille näytteille suunnattu erotustekniikka. Kapillaarielektroforeesin suurimpia etuja on sen korkea erotustehokkuus, lyhyet analyysiajat ja näytteen sekä liuosten pienet kulutukset. Vähäinen näytteen kulutus on erittäin tärkeä ominaisuus rikostekniikassa, jolloin arvokasta todistusaineista ei tarvitse kokonaan kuluttaa analyysissä. Kapillaarielektroforeesin erotusmekanismi perustuu varattujen hiukkasten erilaiseen liikkuvuuteen sähkökentässä. Tämän avulla näytteestä voidaan selektiivisesti erottaa eri kokoiset ja eri varaukselliset ionit.^{2, 3, 4}

Tässä tutkielmassa perehdytään kapillaarielektroforeesiin ja kuinka sitä voidaan hyödyntää rikostekniikassa. Kapillaarielektroforeesista oleellisimpia tarkastelu kohteita on laite ja teoria, miten erotusmenetelmä käytännössä toimii. Rikosteknisissä tutkimuksissa tulee huomioida, mikä todistusaineisto on relevanttia sekä mitkä tekijät tulee huomioida tarkasti, että analyysi tehdään oikealla tavalla. Tutkielman lopussa perehdytään tarkemmin, kuinka kapillaarielektroforeesia hyödynnetään rikosteknisessä tutkimisessa tarkastelemalla musteanalyysiä ja huumeaineanalyysiä.

2. KAPILLAARIELEKTROFOREESI

Kapillaarielektroforeesi on prosessi, missä erotetaan varattuja hiukkasia perustuen niiden erilaiseen nopeuteen nesteessä, kun systeemiin luodaan sähkökenttä. Hiukkasilla on eri suuruiset liikkuvuudet, jolloin ne saadaan erotettua keskenään. Molekyylit liikkuvat kantajaelektrolyytin mukana, jonka vuoksi systeemi tarvitsee puskuriliuokset. Puskuriliuokset sisältävät erilaisia hiukkasia, jotka voivat liikkua nesteessä, kun sähkökenttä luodaan systeemiin.⁵

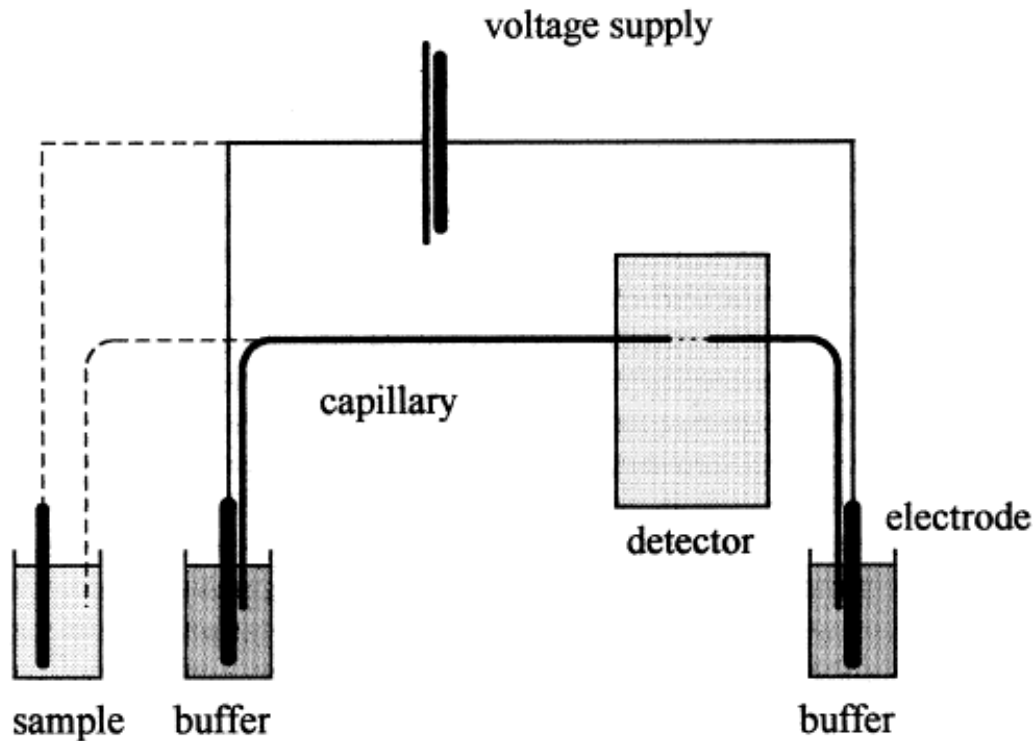
Kapillaarielektroforeesin suurimpia etuja erotustekniikkana on sen yksinkertaisuus ja muut erotussovellukset erilaisille yhdisteille. Yksinkertaisuus tulee siitä, kun samalla laitteella ja kolonnilla voidaan analysoida muun muassa epäorgaanisia ioneja, orgaanisia molekyylejä ja suuria biomolekyylejä. Riittää vain, kun erilaisille näytteille vaihdetaan puskuriliuos, jonka vuoksi kapillaarielektroforeesilla on todella suuri erotuskyky.⁶

Nykyään kapillaarielektroforeesista on useita erilaisia sovelluksia, jotka perustuvat erilaisiin erotusmenetelmiin, kuten muun muassa tavallinen kapillaarielektroforeesi, geelipohjainen kapillaarielektroforeesi ja kapillaarielektrokromatografia. Erilaisten sovellusten seurauksena kapillaarielektroforeesista on tullut erittäin monipuolinen analyttinen mittaustekniikka, jolla voidaan tutkia erilaisten molekyyliden ja ionien erotuskykyä. Monipuolisuutensa vuoksi kapillaarielektroforeesia käytetään erityisen paljon rikostekniikassa, lääketieteessä ja molekyylibiologiassa.⁶

2.1 Laitteisto

Laitteena kapillaarielektroforeesi koostuu injektointilaitteesta, erotuskapillaarista, virtalähteestä, elektrodeista, puskuriliuoksista ja detektoreista. Kuvasta (1) nähdään tärkeimmät laitteen pääkomponentit. Jokaisella osalla on omat erilaiset tehtävät ja osia kalibroimalla saadaan tarkempia ja luotettavampia mittauksia erilaisissa mittaussympäristöissä. Erotuskapillaarilla saadaan nesteet liikkumaan systeemissä, jolloin hiukkasten erotus ja signaalien detektointi saadaan aikaan. Erotuskapillaari sisäpinta voi olla päällystetty, päällystämätön tai se sisältää geeliä eli polyimidiä. Polyimidi parantaa kapillaarin kestävyyttä, mittausten joustavuutta ja vakautta. Kapillaarilla yhdistetään negatiivinen ja positiivinen puoli

systemissä, jolloin voidaan luoda suljettu virtapiiri. Virtalähteellä luodaan sähköinen kenttä systeemiin, jolloin saadaan molekyylit liikkumaan nesteessä. Kokonaisuudessaan, toisessa päässä laitetta tapahtuu näytteenotto ja toisessa päässä signaalin detektointi. Laitetta voidaan muokata eri sovellusten mukaisesti, mutta edellä mainitut pääkomponentit ovat yleisimmät.^{4, 7, 8}



Kuva 1. Kapillaarielektroforeesi esitettynä kaaviokuvana. Osat suomennettuna Sample = näyte, buffer = puskuri, capillary = kapillaari, detector = detektori, electrode = elektrodi ja voltage supply = virtalähde (Julkaistu Elsevierin luvalla).⁷

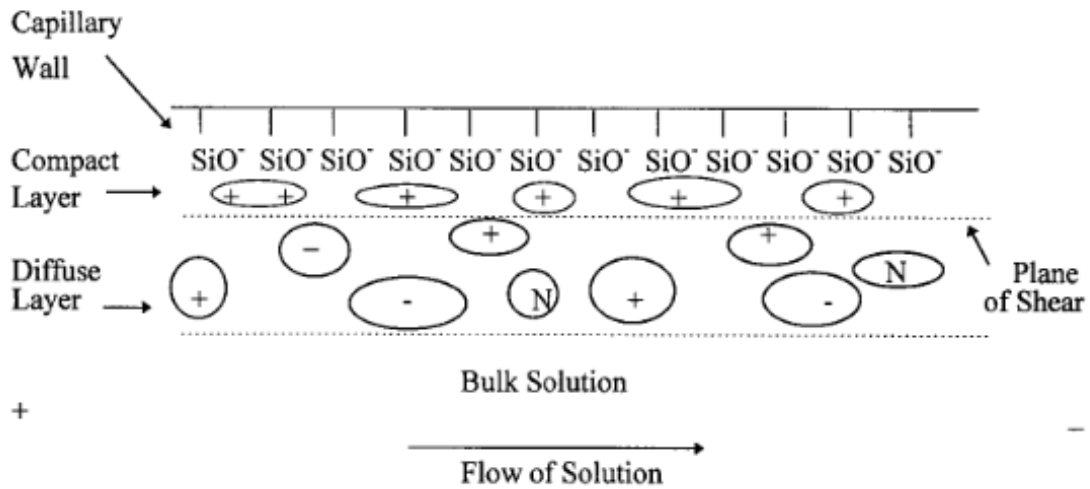
2.2 Elektro-osmoottinen voima

Yksi keskeisempiä voimia kapillaarielektroforeesissa on *elektro-osmoottinen voima*. Kun korkea jännite lisätään läpi koko puskuriliuosta sisältävään geelipohjaiseen kapillaariin, syntyy elektro-osmoottinen virta, joka työntää näytettä eteenpäin kohti katodia. Elektro-osmoottisen virran aiheuttaja on sähköinen kaksikerroksinen kerros, joka muodostuu, kun silikageeli

vuorovaikuttaa puskuriliuoksen kanssa. Kapillaarin varautunutta sisäpintaa kutsutaan zeta-potentiaaliksi.^{4, 5}

Muuttamalla pH:ta voidaan vaikuttaa elektro-osmoottisen virran nopeuteen ja suuntaan. Kun pH on suurempi kuin 3, kapillaarin sisäpinta on negatiivisesti varautunut. Tämä johtuu siitä, että emäs ionisoi pinnan vapaat silanoli ryhmät (Si-OH). Negatiivisesti varautunut seinä hylkii anioneja ja vetää puoleensa kationeja. Anioninen varaus kapillaarin pinnalla aiheuttaa kaksoissähkökerroksen muodostumisen, jolloin puskurikationit menevät sähköiseltä kaksoiskerrokselta viereiselle silikakapillaarin negatiiviselle pinnalle. Kuvasta (2) nähdään, kuinka anioniset silanoli ryhmät vetävät puoleensa positiiviset kationit kapillaarissa. Tällöin saadaan aikaiseksi jakaantuminen absorboituun, kompaktiin ja diffuntoituneeseen kerrokseen. Ionit absorboituneessa kerroksessa ovat todella tiukasti kiinni, jolloin ne ovat liikkumattomia, vaikka sähkökenttä luodaan ympäristöön.^{4, 5}

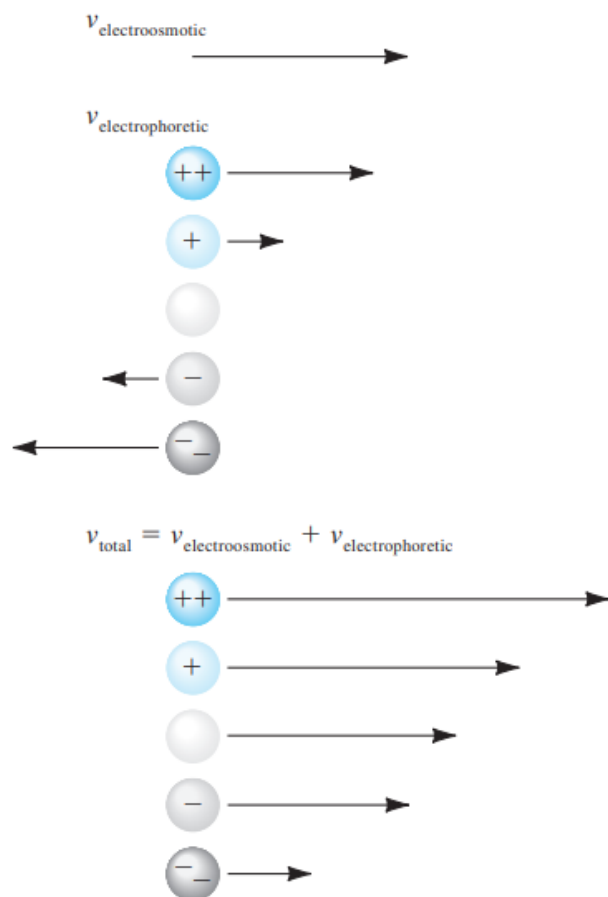
Kun sähkökenttä luodaan ympäristöön, diffuntoituneet kaksoiskerroksella olevat kationit ovat nyt puoleensavetäviä kohti katodia tai negatiivista elektroodia. Koska kationit ovat solvatoituneet veden kanssa, ne vetävät nyt mukanaan suurempia molekyyliä mukanaan. Näin elektro-osmoottisella virtauksella spesiekt saadaan liikkumaan kapillaarissa. Elektro-osmoottisessa virtauksessa on etuna se, että liikkuva neste on tasapaksuinen ympäri putkea. Tällöin mitattavat piikit eivät levene merkittävästi. On myös mahdollista kääntää elektro-osmoottisen virtauksen suunta, lisäämällä puskuriliuokseksi kationisia ioneja sisältävää liuosta. Tällöin kapillaarin pintaan absorboituu kationit ja muodostuu positiivisesti varautunut seinä. Anionit liikkuvat kohti positiivista elektroodia ja saadaan erotettua nopeammin anioniset näytteet.^{4, 5}



Kuva 2. Elektro-osmoottinen virtaus kapillaarissa. Käsitteet suomennettuna Capillary wall = kapillaarin seinä, Compact layer = kompakti kerros, Diffuse layer = diffuntoitunut kerros, Plane of Shear = leikkaustaso, Bulk solution = Näyteliuos, Flow of solution = liuoksen virtaussuunta (Julkaistu Elsevierin luvalla).⁹

Elektro-osmoottinen virtaus mahdollistaa erotuksen kationeille, anioneille ja neutraaleille hiukkasille yhdellä ajolla. Verrattuna elektroforeesiseen liikkumiseen elektro-osmoottinen virtaus vaikuttaa neutraaleihin hiukkasiin toisin kuin elektroforeesi. Kumpikaan voimista ei nimittäin voi erottaa neutraaleja molekyylejä toisistaan. Kuvasta (3) nähdään kuinka molemmat voimat vaikuttavat erilaisiin hiukkasiin ja mikä on voimien yhteisvaikutus koko prosessissa. Oikealla puolella kuvassa on negatiivinen elektrodi ja vasemmalla on positiivinen elektrodi. Elektro-osmoottinen voima vie kaikki spesiekt kohti samaa kapillaarin päätä, jolloin voidaan detektoida piste, jolloin kukin spesies ylittää mittauspisteen. Tällöin saadaan *elektroforeesigrammi*, josta nähdään piikkien avulla, milloin spesiekt ovat ylittäneet mittausrajan.^{4, 5}

Eluotumisnopeus määräytyy varauksen ja koon mukaan. Ensin detektori havaitsee nopeimman kationin, jonka jälkeen havaitaan neutraalit ionit ja lopuksi anionit. Mitä suurempi positiivinen varaus, sitä suurempi on elektroforeesinen voima.⁴



Kuva 3. Elektro-osmoottisen ja elektroforeesisen voiman vaikutus hiukkasiin. Cengage Learning Inc. Uudelleenkäytetty luvalla. www.cengage.com/permissions⁴

2.3 Näytteen analysointi

Kaikilla kapillaarierotustekniikoilla on tiettyjä rajoituksia, esimerkiksi siinä kuinka paljon näytettä voidaan injektoida kapillaariin ja kuinka hyvän vasteen detektori antaa. Kapillaarielektroforeesissa injektointi on suunniteltu niin, että kapillaariin saadaan tarpeeksi näytettä ja samalla minimoidaan kapillaarin ulkopuolinen varianssi prosessista. Detektoinnissa käytetään monenlaisia eri tekniikoita riippuen näytetyypistä. Näytetyypit voivat vaatia erittäin herkän detektorin hyvän vasteen saamiseksi, minkä vuoksi eri detektointimenetelmillä on omat etunsa.⁵

2.3.1 Injektointi

Näytteen injektointi kapillaariin voidaan tehdä kahdella eri tavalla; sähkökineettisesti tai hydrodynaamisesti. Hydrodynaamisessa injektoinnissa käytetään hyväksi painetta tai vakuumia silloin, kun injektointipää on näytteessä. Menetelmä ei ole selektiivinen, sillä se mikä

injektoidaan edustaa koostumukseltaan koko näytettä. Injektointi ei siis ole riippuvainen ionien koosta, varauksesta tai konsentraatiosta näytteessä, joten näytteessä voi olla ei haluttuja ioneja. Sen sijaan, sähkökineettinen injektointi on selektiivinen, sillä injektoitu näyte riippuu näytteen ionien varauksista ja liikkuvuudesta. Sähkökineettisessä injektoinnissa näyte saadaan kapillaariin sähkövirralla. Kapillaari laitetaan näytteeseen ja sähkövirta saa aikaan molekyylien liikkumisen kapillaariin. Yleensä jännite on pienempi kuin erotusvaiheessa. Kun käytetään 50 cm pituista kapillaaria, voidaan näytettä injektoida vain 1 μ l, jotta erotustehokkuus pysyy korkeana. Injektointitulavuus ei saisi muuttua yli 1-2 % kokonaistilavuudesta, jotta erotustehokkuus pysyisi luotettavana.^{5, 7, 8}

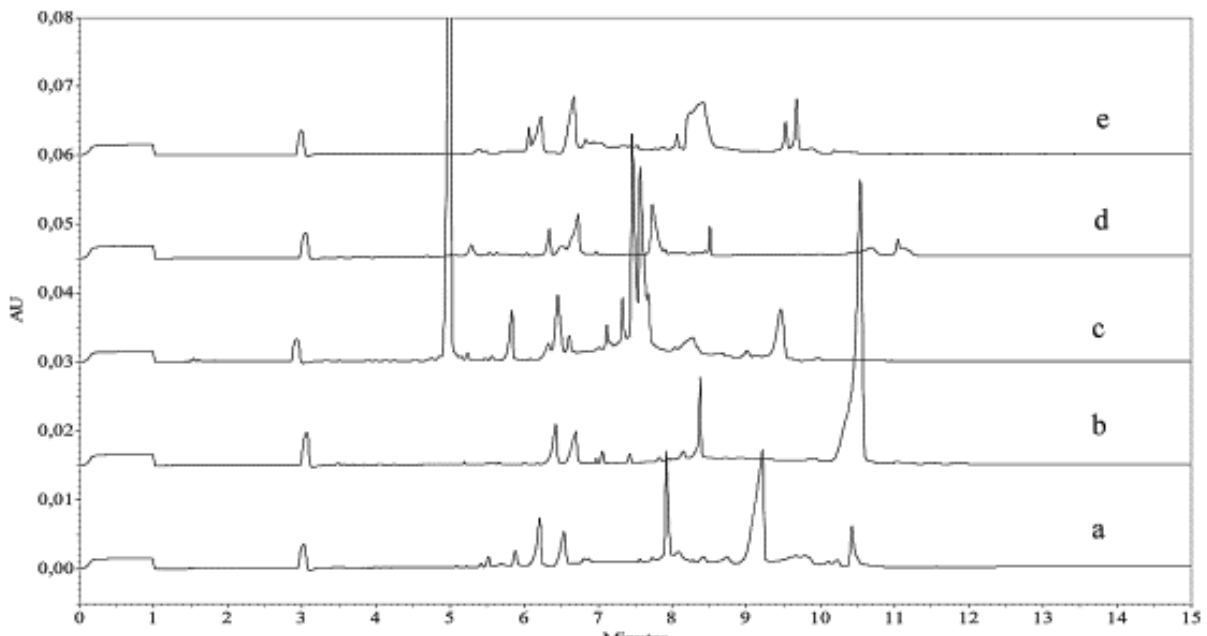
2.3.2 Detektointi

Yleisimmin kapillaarielektroforeesissa kapillaarin sisällä kulkevan näytteen detektointi tapahtuu kapillaarin ulkopuolelta *on-capillary detection*. Koska näytteen määrät kapillaarissa ovat tilavuuksiltaan todella pieniä, on detektointi tavalla kaksi selkeää etua: 1) Kapillaari on jatkuvasyötteisessä virrassa elektrodien välissä, jolloin systeemissä ei ole vuotovirtaa. 2) Lisäksi, liikkumisnopeus ioneilla on riippuvainen sen elektroforeesista liikkuvuudesta, jolloin hitaasti liikkuvat ionit ovat detektorin läheisyydessä pitemmän aikaa verrattuna nopeisiin ioneihin. Tämän seurauksesta selektiivisyys paranee.^{5, 8}

Kapillaarielektroforeesissa näytteen detektointi tapoja on useita, joten signaali voidaan saada hyvin erilaisista näytteistä. Esimerkkejä detektoreista on absorbanssi, fluoresenssi ja sähkökemiallinen detektori. Yleisesti detektorit luokitellaan kahteen eri osaan *massaominaisuus* tai *liuosominaisuus detektoreihin*. Massadetektorit mittaavat näytteen yleisominaisuuksia, kuten esimerkiksi johtavuutta. Massadetektorit eivät ole selektiivisiä, jonka vuoksi ne eivät ole yhtä tarkkoja kuin liuosdetektorit. Liuosdetektorit mittaavat näytteen fysikaalisia ominaisuuksia, jotka ovat tyypillisiä tietyille näytteelle. Kun näyte detektoidaan kapillaarin ulkopuolelta, kapillaariin on tehty ikkuna, josta nähdään näytteen kulkema matka sekä samalla detektoidaan itse näyte. Ikkuna kapillaariin saadaan, kun polyimidi kerrosta on poltettu tai raaputettu pois. Absorptiomenetelmät ovat yleisimpiä tekniikoita detektoida vaste kapillaarielektroforeesilla. Absorptiotekniikoihin kuuluvat esimerkiksi ultravioletti ja näkyvän absorption detektointi.^{5, 8}

Kun detektointi tapahtuu kapillaarin pinnalta, voidaan kuvaaja tehdä elektroforeettisen liikkuvuuden ja elektro-osmoottisen voiman avulla, joista saadaan selville liikkumisnopeus. Kuvaajasta nähdään, että hitaasti liikkuvat komponentit ovat pidemmän ajan detektorin läheisyydellä verrattuna niiden vastinmuotoihin, jotka liikkuvat nopeasti. Lopuksi saadaan kaksi elektrogrammia, *spatiaalinen* ja *hetkellinen*. Spatiaalinen elektrogrammi viittaa koko signaalin leveyteen ja hetkellinen viittaa siihen, mitä detektori havaitsee. Kuvassa (4) nähdään musteen elektrogrammeja.⁵

Erilaisia ongelmia syntyy silloin, kun kapillaariin laitetaan todella pieniä määriä näytettä, jolloin mittauksissa tarvitaan todella korkea herkkyys. Ongelmaksi detektoinnissa muodostuu useasti erilaiset matriisiefektit, joita syntyy muun muassa, kun näytteitä joudutaan laimentamaan. Myös laitteen optiset ongelmat haittaavat mittauksia, joita syntyy esimerkiksi liian lyhyestä optisesta matkasta kapillaarissa ja huonosta optisesta pinnasta sylinterikapillaarissa. Detektoinnissa vasteen mittaamisessa rajoituksia aiheuttavat konsentraatio ja massa. Konsentraatorajoitus tarkoittaa näytteen maksimikonsentraatiota ja massarajoitus tarkoittaa massa, jonka laite voi luotettavasti mitata.⁵



Kuva 4. Elektrogrammi musteanalyysistä. (Julkaistu Elsevierin luvalla)³

3. RIKOSTEKNIikka

Rikostekniikkaan eli *forensic science* on käsitteenä suuri, sillä se kattaa erittäin suuret osa-alueet rikosteknisestä tutkinnasta oikeuslääketieteeseen. Tutkimuksissa on erilaisia osa-alueita, kuten DNA, räjähteet ja musteet. Rikostekniikan keskeisempänä käsitteenä on rikostekninen tutkinta, joka käsittelee analysoidun tiedon ja siitä saatavat lausunnot, joita voidaan siten käyttää esimerkiksi oikeudessa pätevinä dokumentteina. Rikosteknisellä tutkimuksella yleisemmin tarkoitetaan kaikkia tutkimuksia, jotka on suoritettu tapahtumapaikalla ja tutkimus antaa lisätietoa siitä, mitä tapahtumapaikalla on tapahtunut. Esimerkiksi rikospaikalla suoritetaan näytteenotto kuiduista ja tämän jälkeen näyte analysoidaan rikosteknisessä laboratoriossa, jonka jälkeen näytteestä voidaan antaa lausunto.¹⁰

3.1 Rikostekninen tutkimus

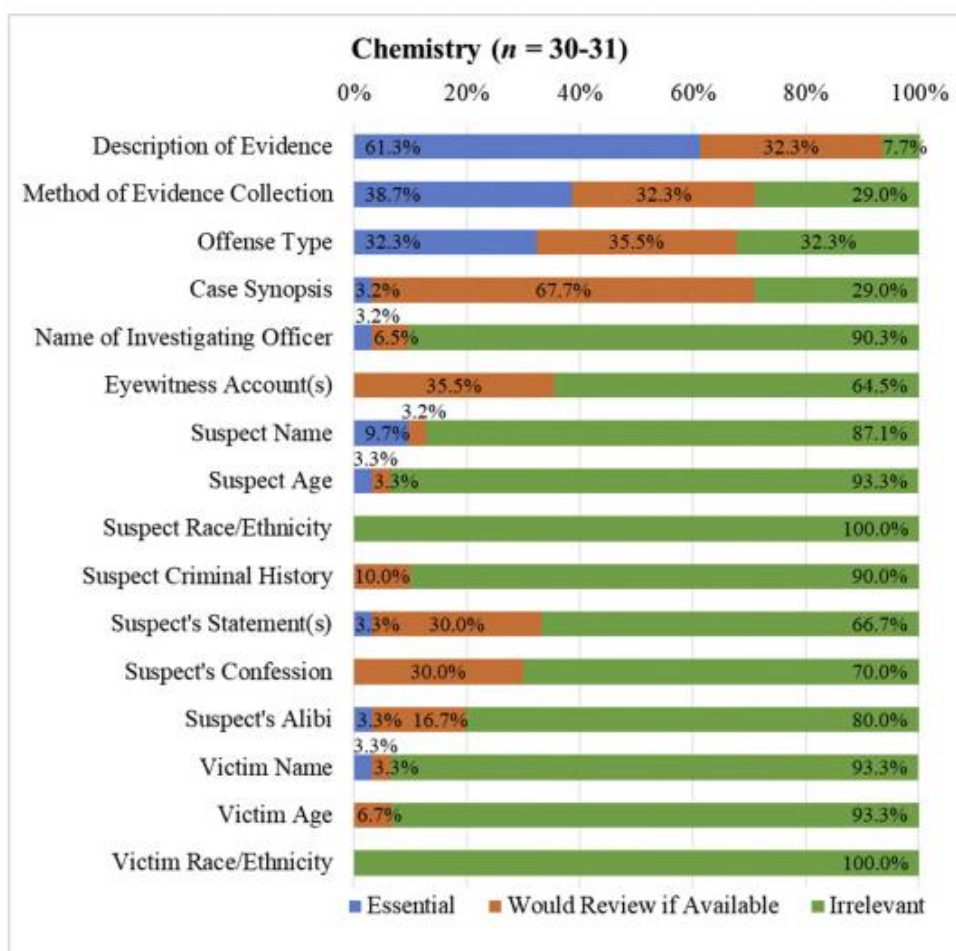
Rikostekniset tutkimukset ovat menetelmäriippuvaisia, joten täysin tarkkaa tulosta analyysistä koskaan ei saada. Suuri haaste tutkimuksissa on myös tiedonlähde ja tiedonpuute, sillä tutkimuksissa tulee aina selvittää mikä tieto on relevanttia ja mikä ei. Mittausmenetelmistä johtuvien virheiden takia tutkimukset voidaan yleisesti jakaa kahteen kategoriaan *eksakteihin* tutkimuksiin ja *aprosimatiivisiin* tutkimuksiin.^{10, 11}

Eksaktit tutkimukset perustuvat analyttisiin, kemiallisiin ja fysikaalisiin tutkimusmenetelmiin. Mittausmenetelmä on tällöin joka kerta sama ja saatu tulos antaa joko myönteisen tai kielteisen tuloksen. Mittaustuloksesta voidaan myös vaihtoehtoisesti nähdä kvalitatiivisesti tai kvantitatiivisesti haluttu arvo. Esimerkiksi huumausainanalyysissä nähdään, onko näytteessä kyseistä huumetta tai sitten voidaan määrällisesti ja laadullisesti selvittää mikä huume on kyseessä. Tulosten täytyy kuitenkin olla määritysrajojen sisällä, jotta ne ovat luotettavia. Tutkittavaa näytteitä tulee olla tarpeeksi, näyte ei ole saanut kontaminoitua, ja eri näytteet eivät ole saaneet sekoittua analyysin aikana. Laitteesta ja mittaajasta johtuvat mittausvirheet ovat pienet, silloin kun mittauksessa on käytetty samaa menetelmää kuin aikaisemmissa mittauksissa. Tulosten luotettavuus on tämän vuoksi hyvä.¹⁰

Aprosimatiivisissa tutkimuksissa vertaillaan vertailututkimuksia ja annetaan arvio tulosarvoista. Arvion perusteella voidaan siten antaa virallinen lausunto. Johtopäätöksen tekoon

vaikuttaa muun muassa tutkijan kokemus, saadut tutkimustulokset esimerkiksi yhteys ja luokittelu. Näin lausuntoon siten vaikuttaa johtopäätöksen varmuusaste eli vertaillaan tutkimusnäytteen ja vertailunäytteen luotettavuutta.¹⁰

Tutkimuksen tulkinta on myös tärkeä osa rikostutkimusta. Yhteisymmärryksen puute siitä, mikä tieto on oleellista voi mahdollisesti jättää tietoa tulkinnan varaan, jolloin päätöksenteko lausunnosta on paljon haastavampaa. Useamman rikosteknisen analyytikon tuli tutkia tuloksia useasta eri näkökulmasta, sillä jokaisella analyytikolla on erilaiset tietopohjat ja näkemykset tuloksista. Esimerkiksi kuvasta (5) nähdään, mitkä kemialliset tekijät vaikuttavat erityisesti tutkijan päätöksen tekoon. Oleellisimpina tekijöinä kemian kannalta ovat todisteiden kuvaukset, rikoksen tyyppi ja tavat, joilla todisteita on kerätty.¹¹



Kuva 5. Relevantit tarkastelukohteet kemiallisissa analyysissä. (Julkaistu Elsevierin luvalla)¹¹

3.2 Rikostekninen analyysi

Rikosteknisessä tutkimuksessa ja näytteen analysoinnissa tavoitteena on saada konkreettinen, mielekäs ja tarpeeksi luotettava tulos siitä, mitä on tapahtunut. Tutkimusmenetelmien luotettavuuden määrittäminen ja kehittäminen on merkittävässä osassa koko rikostekniikkaa. Tulokset täytyy saada tietyllä ja samalla menetelmällä, joka voidaan toistaa samalla tavalla eri laboratoriossa. Tulosten oikeellisuus on tällöin osoitettava, toisin sanoen menetelmä ja mittaustulokset tulee validoida. Tulosten tarkkuuksien tulee huomioida erilaiset matriisivirheet. Vertailunäytteillä saadaan mitatun tuloksen ja oikean tuloksen välille yhteys, jolloin analyytikko voi päätellä, mikä näytteessä aiheuttaa virhettä. Tulosten tulee myös olla toistettavissa ja uusittavissa. Rinnakkaisnäytteillä voidaan eliminoida erilaiset kontaminaatiot sekä mittausvirheet. Lopuksi mittausmenetelmän tulee olla määritysrajojen sisällä, tällöin saadaan tieto mikä on pienin mahdollinen tulos, joka menetelmällä voidaan mitata. Yhdysvalloissa käytetään mittaustulosten oikeellisuuden ja validoinnin tutkimisessa *Daubertin kriteerejä*. Kriteerit koostuvat neljästä ideasta:^{10, 12}

- Teoria tai menetelmän ja sen luotettavuus on pystyttävä testaamaan.
- Kun menetelmä tai teoria on julkaistu, tulee se vertaisarvioida.
- Erilaiset virheet teoriassa tai menetelmässä tulee pystyä arvioimaan.
- Tieteellinen yhteisö on hyväksynyt yleisesti menetelmän.

Daubertin-kriteereillä saadaan arvioitua yleisiä virheitä, jolloin tutkijalla on tiedossa, millaisia tuloksia voidaan odottaa ja mitkä ovat virhemarginaalit.^{10, 12}

Instrumenttilaitteet ja erilaiset menetelmät tulee validoida tulosten oikeudellisuuden ja luotettavuuden takaamiseksi. Validoinnilla tarkoitetaan tiettyjä mittaussarjoja, joiden avulla tulokset voidaan todeta luotettaviksi. Validoinnissa määritetään muun muassa tulosten tarkkuus, tulosten täsmällisyys ja menetelmien määritysrajat. Tulosten tarkkuusmittauksessa tutkitaan määritetyn arvon ja todellisen arvon yhteys. Mittauksessa saadaan tällöin tieto, kuinka paljon mitattu tulos poikkeaa oikeasta tuloksesta. Vertailu- eli *referenssimateriaalilla* saadaan arvioitua suhdetta. Tulosten täsmällisyyttä tutkitaan mittausten toistettavuudella ja uusittavuudella. Samasta näytteestä tehdään useita rinnakkaisnäytteitä ja mittausten poikkeamaan verrataan

sitten keskenään. Lopuksi tutkitaan menetelmän määrittäjäraja eli mikä on pienin mahdollinen pitoisuus tai massa, jonka instrumentti voi luotettavasti mitata.¹⁰

4. KAPILLAARIELEKTROFOREESI RIKOSTEKNISISSÄ ANALYYSEISSA

Kapillaarielektroforeesin monipuolisuuden ansiosta voidaan näytteestä analysoida monia eri komponentteja, esimerkiksi epäorgaanisia ioneja, orgaanisia molekyylejä ja suuria biomolekyylejä. Tämän ansiosta kapillaarielektroforeesia voidaan hyödyntää useaan erilaiseen tarkoitukseen rikostekniikassa kuten toksikologisiin tutkimuksiin, laittomien huumausaineiden tutkimuksiin, räjähteiden komponentteihin, aseiden laukausten jäännöksiin ja moneen muuhun analyysiin. Esimerkiksi aseiden laukausten jäännöksistä voidaan analysoida nikkeli-, sinkki- ja kupariyhdisteitä.¹

4.1 Musteanalyysit

Yksi tärkeä sovellus kapillaarielektroforeesille rikostekniikassa on musteiden analysointi dokumenteista. Tulostimien nopea kehitys on tuonut lisää erilaisia analyttisiä ongelmia musteiden analysointiin, esimerkiksi musteet ovat voineet kemiallisesti ikääntyä, jolloin analyysin vaikuttaa yhä useampi tekijä. Tulostimien tulosteet koostuvat kolmesta puhtaasta musteesta: keltaisesta, magentasta ja syaanista. Yhä useampi dokumentti on nykyään väärennös, jolloin virallisten ja arvokkaiden asiakirjojen aitoudet tulee tarkistaa.^{3, 13}

Kapillaarielektroforeesi on musteiden analysointiin erittäin hyvä analyysilaitte sen hyvien ominaisuuksien takia. Näytettä tarvitaan analyysiä varten vain pieni määrä, laitteella on hyvä resoluutio, pieni reagenssien kulutus ja yksi tärkeimmistä ominaisuuksista on, että kapillaarielektroforeesilla voidaan mitata todella paljon erilaisia näytteitä erilaisissa olosuhteissa. Musteet eroavat toisistaan niiden kemiallisten ja fysikaalisten ominaisuuksien perusteella. Musteet sisältävät eri määrät väriaineita, syntesoituja happoja ja orgaanisia sekä epäorgaanisia väripigmenttejä. Analyysissa jokainen muste antaa omanlaisen elektrogrammin näkyvän valon aallonpituudella ja elektrografeja voidaan verrata valmistajien lähettämiin elektrografeihin. Elektrografeihin pystytään vaikuttamaan muuttamalla pH:ta tai näkyvän valon aallonpituutta.^{3, 13}

Yksinkertaisella ja helpoimmalla kapillaarielektroforeesi menetelmällä voidaan erottaa varatut sekä varauksettomat spesiekit toisistaan. Näin saadaan aikaan hyviä tuloksia, mutta yleensä halutaan erottaa kemiallisesti samanlaisia yhdisteitä, jolloin käytetään modifioitua menetelmää

kapillaarielektroforeesista eli *misellaarista kromatografista kapillaarielektroforeesia (MECC)*. Menetelmä pystyy jatkuvasti erottamaan kemiallisesti erilaiset yhdisteet niiden koon, varauksen ja jopa hydrofobisen tai hydrofiilisen osan perusteella. MECC tekniikan on arvioitu olevan todella käytännöllinen, sillä erilaiset tulostimien musteet sisältävät useita kemiallisia komponentteja, joiden kemiallinen käyttäytyminen on erilainen, jolloin useampi ajo ja erotus on suoritettava. Tällöin esimerkiksi yksinkertaisella kapillaarielektroforeesilla ongelmana on saada kaikki näytteestä erotetut komponentit tunnistettua yhdellä ajolla.³

Rikosteknisessä tutkimuksessa kapillaarielektroforeesi kohtaa myös omat ongelmansa. Kapillaarielektroforeesin havaitsemisraja on huono, joka johtuu lyhyestä optisen valon matkasta kapillaarissa. Ongelma voidaan kuitenkin kiertää käyttämällä *sample stackingiä* eli näytteiden pinoamista. Näytteiden pinoaminen perustuu hydrodynaamiseen injektioimiseen, jossa näyte laimennetaan veden ja taustaelektrolyytin kanssa. Prosessissa analyytit, jotka esiintyvät matalassa näytekonsentraatiossa, väkevöidään erillisiksi kokonaisuuksiksi. Tämän jälkeen pinotut analyytit voidaan detektoida erillisillä erotusalueilla, jolloin saadaan parempi erotustehokkuus ja detektointiherkkyys.³

Luotettavien mittaustulosten saavuttamiseksi täytyy tehdä optimointia, kuten muun muassa taustaelektrolyytin ja laitteen optimoinnit, puskuriliuoksen ja näytteen pH:n muutoksia sekä tutkia mittaustulosten toistettavuutta. Musteen eri komponentit ovat varautuneet happamissa ja emäksissä olosuhteissa, jolloin musteet liikkuvat nesteessä eri tavalla, kun sähkökenttä luodaan mittaussysteemiin. Taustaelektrolyytissä optimointiin vaikutti pH ja se minkälaisia elektroforeesisiä profiileja saadaan. Elektroforeesiseen profiiliin vaikutti piikkien määrät, intensiteetit ja resoluutio. Paras taustaelektrolyytti saatiin, kun pH oli 9,5–10,5 välillä ja sopivilla suhteilla tehtiin liuos natriumboraatti puskurista, asetonitriilistä ja natriumlauryylisulfaatista. Myös mittaustilanteen muutos oli merkittävässä osassa. Kun lämpötila nostettiin 15 asteesta 25 asteeseen, analyysiaika laski ja samalla toistettavuus parani. Näytteen injektointi aiheutti myös erilaisia hankaluuksia optimoinnissa. Pienin mahdollinen määrä analysoitavaa näytettä oli 10 µl, sillä tätä pienemmät määrät haihtuivat nopeasti, että näyte haihtui injektointiputken seinämiin, jolloin orgaanisen liuottimen ja veden suhteet muuttuivat merkittävästi. Analyysitulokset vääristyivät huomattavasti.³

Happamissa olosuhteissa ei saatu hyvää resoluutiota musteen komponenteille, sillä eri komponentit eivät erottuneet vaan pysyivät kiinni toisissaan. Emäksissä olosuhteissa saatiin hyvä resoluutio. Emäksiset olosuhteet luotiin 20 mM boraatilla ja pH:ksi asetettiin 8,5. Eri komponentit ionisoituivat hyvin ja määrittämyksensä pystyttiin myös vaikuttamaan, sillä sähköosmoottinen virta on riippuvainen puskuriliuoksen ionivahvuudesta.¹³

Zhao et al.¹³ tutkimuksessa uutettiin 100 näytteestä musteet, jotka sitten erotettiin kapillaarielektroforeesilla optimi olosuhteissa. Keskiavertoajo kesti noin 20 minuuttia, jonka jälkeen saatiin tarpeeksi eroavaisuuksia elektrografeihin, jotta eri musteet voitiin kvalitatiivisesti erottaa toisistaan. Musteiden pääkomponentit havaittiin aallonpituuksilla 200 nm, 460 nm ja 595 nm. Aallonpituuksilla pystyttiin tunnistamaan eri merkkiset musteet vertailemalla elektrografeja keskenään. Musteiden pääkomponenteilla oli hieman eroavaisuuksia niiden ainesosissa ja lisäaineisessa, jolloin jokaiselle musteelle saatiin luotua oma profiili. Mittausten toistettavuus testattiin kolmella peräkkäisellä ajolla rinnakkaisnäytteistä. Näytteiden liikkumisnopeudet olivat riittävän lähellä toisistaan. Määritykset poikkesivat toisistaan vain 4 %.¹³

Komponentit erotettiin eri ajassa ja kuvaajat muistuttavat toisiaan. Pääkomponentit ovat samoissa kohdissa, mutta pienet piikit vastaavat erilaisia yhdistelmiä musteissa. Erottumisaika saattoi vaihdella hieman rinnakkaisajoissa, sillä elektro-osmoottinen virtaus muuttuu ionivahvuuden muutoksesta.¹³

Kokonaisuudessaan eri valmistajien musteet analysoitiin, siten että kaikki saatiin erotettua toisistaan. Joissakin elektrogrammeissa oli vain pieniä eroavaisuuksia, mutta paras eroavaisuus saatiin, kun yhdisteltiin elektrogrammeja ja vertailtiin niiden avulla. Pääkomponentit pystyttiin erottamaan toisistaan tunnetuilla UV-valo spektreillä. Suuri etu menetelmässä oli myös se, että näytettä kului vähän, jolloin arvokasta todistusaineistoa ei kulunut paljoa. Rikostekniikassa kapillaarielektroforeesi on hyvä menetelmä musteiden analysointiin, koska menetelmälle pystytään luomaan datakirjasto, jonka avulla musteiden elektroforeesiprofiileja voidaan vertailla keskenään ja näin on mahdollista tunnistaa tietyn valmistajan musteet.³

4.2 Lääke- ja huumeaineiden analyysit

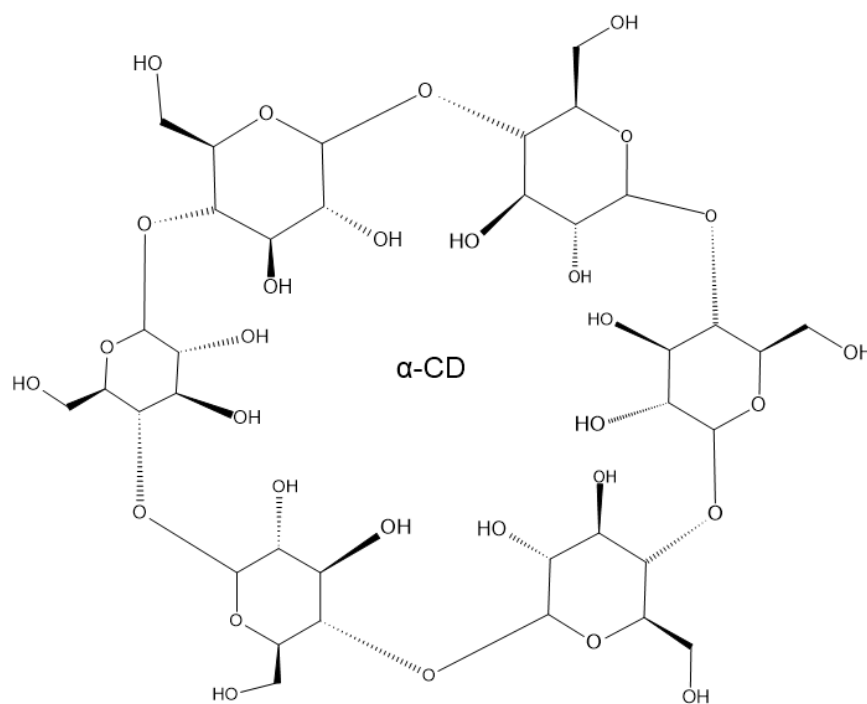
Toinen merkittävä sovellus kapillaarielektroforeesille on lääke- ja huumeaineiden analyysit ja huumeiden erilaisten enantiomeerien selvitys. Lääkkeen vaikuttava aine on haluttu ja parantava, kun taas lääkkeen enantiomeerilla ei ole vaikutusta tai se voi olla myrkyllinen. Kapillaarielektroforeesin merkittävin etu on sen lääke- ja huumeaineiden kiraaliset analyysit esimerkiksi amfetamiinille ja sen johdannaisille. Kiraalisessa analyysissä kapillaarielektroforeesi on yksi tehokkaimmista erotusmenetelmistä esimerkiksi verrattuna superkriittiseen nestekromatografiaan ja kaasukromatografiaan. Suurimpina etuina kapillaarielektroforeesissa on sen nopeus ja helppous verrattuna muihin erotusmenetelmiin. Analyysit voidaan tehdä muutamassa tunnissa, jolloin saadaan testattua useamman näytteen erilaisia muunnelmia.^{14, 15}

Rikosteknisissä analyyseissä on hyvin tunnettua, että huumeiden aktiivinen enantiomeerinen muoto on yleisesti erilainen, jolloin saatu informaatio huumeen suhteista biologisessa fluidissa on tutkinnan kannalta hyvin tärkeää. Kapillaarielektroforeesilla on kyky erottaa kiraalisesti selektiiviset kompleksit toisistaan erotuspuskuriliuoksessa. Tällöin ei tarvita kalliita erotuskolveja erottamaan kiraaliset yhdisteet, vaan erotus voidaan tehdä erotuselektrolyyteillä.^{14, 16}

Kiraalisella analyysillä voidaan todentaa tuotteen enantiomeerinen puhtaus. Tällöin saadaan tietoa muun muassa lääkkeen metabolisesta muutoksesta, joka voidaan sitten yhdistää kiraaliseen yhdisteeseen. Useimmat kiraaliset erotukset kapillaarielektroforeesilla tehdään elektrokineettisellä kromatografia menetelmällä ja lisäämällä kiraalinen selektori erotuspuskuriliuokseen. Kiraalinen selektori muodostaa molempien enantiomeerien kanssa kompleksin ja tällöin muodostuneilla komplekseilla on erilaiset elektroforeettiset liikkuvuudet tai stabiilisuusvakiot. Kiraalisessa erotuksessa enantiomeeri kompleksoituu yleensä syklodekstriinin proteiinien tai makrosyklisen antibioottien kanssa.^{14, 17}

Syklodekstriinit ovat syklisiä oligosakkarideja, jotka sisältää (α -1-4)-linkattuja α -D-glukopyranoosi osia. α - β - γ -syklodekstriinit sisältävät kuusi, seitsemän tai kahdeksan glukoosi rakenneosaa kukin eri järjestyksessä, jolloin jokainen muodostaa katkaistua kartiota muistuttavan renkaan. Kuvassa (6) on esitetty α -syklodekstriinin rakennekaava. Syklodekstriinit

muodostavat enantiomeerien kanssa komplekseja, joiden stabiilisuus riippuu molekyylin ominaisuuksista. Syklodekstriinin akseptorin ja substituenttien erilaiset koot mahdollistavat erilaisten johdannaisten enantiomeeriset erotukset. Erotusmekanismi enantiomeerisessä-erotuksessa perustuu siihen, että syklodekstriini muodostaa komplekseja, missä enantiomeerianalyytti sopii syklodekstriinin akseptoriin. Akseptorin koko, muoto ja analyytin rakenne ovat tärkeitä tekijöitä kiraalisessa tunnistamisessa. Analyytin funktionaalisten ryhmien vuorovaikutus syklodekstriinin hydroksyylisten ryhmien kanssa ovat päätekijöitä, jotka vaikuttavat kiraaliseen tunnistamiseen ja erotukseen. Hyvä liukoisuus ja matala UV absorbanssi ovat hyviä etuja, miksi syklodekstriiniä käytetään enantiomeeriseen erotukseen kapillarielektroforeesissa.¹⁷



Kuva 6. α-Syklodekstriinin rakennekaava (mukaiilen).¹⁸

5. YHTEENVETO

Rikostekniikassa kapillaarielektroforeesi on erittäin hyvä mittaussuunnitelma, sillä sen todella hyvän selektiivisyyden ja monipuolisuuden avulla voidaan analysoida useita erilaisia näytteitä erilaisissa mittaolosuhteissa. Hyvä erotustehokkuus ja selektiivisyys perustuvat ionien erilaisiin liikkuvuuksiin sähkökentässä. Elektro-osmoottinen voima ja elektroforeesin voima ovat suurimmat vaikuttavat tekijät erotuksessa. Voimiin vaikuttavat ionien koko ja varaus, joiden perusteella saadaan erilaiset vasteet eri analyysiajoissa. Kun tunnetaan, miten sähköiset voimat vaikuttavat ja miten ionit liikkuvat sähkökentässä, voidaan kapillaarielektroforeesia hyödyntää useaan käyttötarkoitukseen rikosteknisessä laboratorioissa ja kapillaarielektroforeesi voi jopa syrjäyttää tunnettuja erotusmenetelmiä rikostekniikassa.

Kapillaarielektroforeesi mittaussuunnitteena koostuu kokonaisuudessaan näytteestä, injektointiosasta, erotuskapillaarista, virtalähteestä, elektrodeista, puskuriliuoksista ja detektoreista. Kalibroimalla laitetta ja mittaolosuhteita saadaan hyvä selektiivisyys erilaisille analyyseille. Puskurin ioniosuutta muuttamalla voidaan määrittää joko näytteen kationit tai anionit, jolloin tutkimukset erilaisista näytematriiseista nopeutuvat.

Kapillaarielektroforeesilla on saatu loistavia mittaustuloksia musteanalyysissä. Musteista saatiin selvästi erotettua musteiden pääkomponentit, jolloin musteet saatiin luotettavasti karakterisoitua toisistaan. Musteista pystytään elektrogrammien avulla luomaan erillinen kirjasto musteprofiileille, jolloin uusien tuntemattomien näytteiden analyysi on entistä helpompaa ja nopeampaa. Kapillaarielektroforeesi on osoittautunut päteväksi mittaussuunnitteeksi musteanalyysiin, jota varmasti tullaan käyttämään jatkossakin.

Huumausaineanalyysissä on saatu kokonaan uusi menetelmä mitata enantiomeerien puhtaus, joka on aikaisemmin ollut ongelma. Lisäksi kapillaarielektroforeesia huumausaineiden tunnistamisessa. Erittäin suuri etu analyyseissä on sen lyhyt mittausaika. Kapillaarielektroforeesilla voidaan analysoida useita huumausainenäytteitä, jolloin ei jää epäselväksi, mitä komponentteja huumausaine sisälsi.

Rikostekniset tutkimukset ovat kokonaisuudessaan haastavia ja monimutkaisia. Tähän vaikuttavat erityisesti teknologian nopea kehitys sekä erilaiset rajoitukset, mittaolosuhteet ja

komplikaatiot analyyseissä sekä mittauslaitteissa. Kapillaarielektroforeesi mittausmenetelmänä onkin tehokas, yksinkertainen ja täyttää vaadittavat kriteerit, jolloin kapillaarielektroforeesia tullaan jatkossakin hyödyntämään ja kehittämään rikostekniseen tutkimukseen.

6. KIRJALLISUUSVIITTEET

1. Cruces-Blanco C, Gámiz-Gracia L, García-Campaña AM. *Applications of capillary electrophoresis in forensic analytical chemistry*. TrAC Trends in Analytical Chemistry. **2007**,26(3),215-226. doi: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2006.12.007>.
2. Hommerson P, Khan AM, de Jong GJ, Somsen GW. Ionization techniques in capillary electrophoresis-mass spectrometry: Principles, design, and application. *Mass Spectrom Rev*. **2011**,30(6),1096-1120. doi: DOI 10.1002/mas.20313.
3. Szafarska M, Wietecha-Posłuszny R, Woźniakiewicz M, Kościelniak P. Examination of colour inkjet printing inks by capillary electrophoresis. *Talanta*. **2011**,84(5),1234-1243. [Viitattu 20.10.2020]. doi: 10.1016/j.talanta.2010.12.024.
4. Skoog DA, Holler FJ, Crouch SR. *Principles of instrumental analysis*. Seventh edition ed. Boston: Cengage Learning, **2016**,xx, s.793 - 817.
5. Weinberger R. *Practical capillary electrophoresis*. 2nd ed, ed. San Diego (Calif.): Academic Press, **2000**, xvii, 1 – 462.
6. Issaq HJ. *Thirty-five years of capillary electrophoresis: Advances and perspectives*. J Liq Chromatogr Relat Technol. **2002**,25(8),1153-1170. [Viitattu 22.9.2020]. doi: 10.1081/JLC-120004015.
7. Tagliaro F, Manetto G, Crivellente F, Smith FP. A brief introduction to capillary electrophoresis. *Forensic Sci Int*. **1998**,92(2),75-88. doi: [https://doi.org/10.1016/S0379-0738\(98\)00010-3](https://doi.org/10.1016/S0379-0738(98)00010-3)
8. Tagliaro F, Turrina S, Smith FP. Capillary electrophoresis: Principles and applications in illicit drug analysis. *Forensic Sci Int*. **1996**,77(3),211-229. doi: [https://doi.org/10.1016/0379-0738\(95\)01863-8](https://doi.org/10.1016/0379-0738(95)01863-8)
9. Weston A, Brown PR. *High performance liquid chromatography & capillary electrophoresis : Principles and practices*. San Diego: Academic Press, **1997**. s.138.

10. Himberg K. *TEKNINEN RIKOSTUTKINTA johdatus forensiseen tieteseen*. Helsinki: Edita Oyj, **2002**,1-142.
11. Gardner BO, Kelley S, Murrice DC, Dror IE. What do forensic analysts consider relevant to their decision making? *Science & Justice*. **2019**,59(5),516-523. doi: <https://doi.org/10.1016/j.scijus.2019.04.005>.
12. Zonana H. Daubert V. merrell dow pharmaceuticals: A new standard for scientific evidence in the courts? *J Am Acad Psychiatry Law*. **1994**,22(3),309-315.
13. Zhao P, Wang Y, Xu Y, Yao L. Analysis of roller pen inks by capillary zone electrophoresis. *Front Chem China*. **2007**,2(1),89-92. [Viitattu 20.10.2020.] doi: 10.1007/s11458-007-0018-4.
14. Tagliaro F, Bortolotti F, Pascali JP. Current role of capillary electrophoretic/electrokinetic techniques in forensic toxicology. *Analytical & Bioanalytical Chemistry*. **2007**,388(7),1359-1364. doi: 10.1007/s00216-007-1381-1.
15. Deng S, Pan J, Wang M, Huang Y, Xia Z. Study on improvement of chiral separation of capillary electrophoresis based on cyclodextrin by deep eutectic solvents. *Talanta*. **2020**,220,121419. doi: 10.1016/j.talanta.2020.121419.
16. Pascali JP, Bortolotti F, Tagliaro F. Recent advances in the application of CE to forensic sciences, an update over years 2009-2011, 22213526. *Electrophoresis*. **2012**,33(1),117-126. doi: 10.1002/elps.201100463.
17. Saz JM, Marina ML. Recent advances on the use of cyclodextrins in the chiral analysis of drugs by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*. **2016**,1467,79-94. doi: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.08.029>
18. Lääkealan yhtiö, Zibo Qianhui biologinen Technology Co, Ltd, <http://fi.cyclodextrinchina.org/info/the-three-main-types-of-cyclodextrins-22366367.html> (Haettu 4.2.2021)