

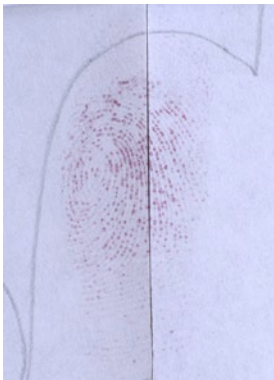
**BVDA INTERNATIONAL**

POSTBUS 2323 2002 CH HAARLEM HOLLAND
TEL +31 (23) 5424708 FAX +31 (23) 5322358
EMAIL INFO@BVDA.NL WWW.BVDA.COM

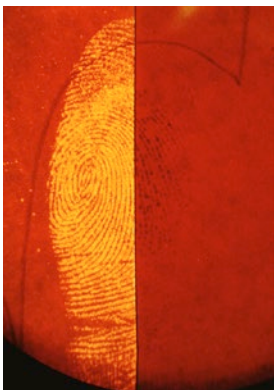
Inleiding

5-MTN is de afkorting van een chemische verbinding met de naam 5-(methylthio)ninhydrine. Net als ninhydrine ontwikkelt het bij gebruik op papier paarse vingerafdrukken. De kleur van de vingerafdrukken die met 5-MTN zichtbaar worden gemaakt is wat intenser dan de kleur die met gewone ninhydrine verkregen wordt. De concentratie van 5-MTN in een gebruiksooplossing kan daarom lager zijn dan in een standaard ninhydrine gebruiksooplossing (3 gram i.p.v. 5 gram per liter) om toch dezelfde kleur te verkrijgen.

Vergelijking van 5-MTN met ninhydrine



5-MTN (links, 3 g/l) versus ninhydrine (5 g/l) in daglicht



Fluorescentie van 5-MTN na behandeling met zinkchloride (groen licht/donker-oranje filter)

Waarom 5-MTN in plaats van ninhydrine

Waarom 5-MTN gebruiken i.p.v. ninhydrine? Vingerafdrukken die zichtbaar worden gemaakt met 5-MTN krijgen een sterke fluorescentie na behandeling met een zinkchloride oplossing.

De sterk paars gekleurde verbinding die ontstaat wanneer ninhydrine reageert met aminozuren of eiwitten (Ruhemann's paars can complex kan complexeren met een groot aantal verschillende metaalionen, zoals die van nikkel, koper, cadmium of zink. Dit gaat gewoonlijk met een kleurverandering gepaard. Met "gewone" ninhydrine verkleurt de zichtbaar gemaakte vingerafdruk, na behandeling met zink, van paars naar oranje.

Bij vingerafdrukken die met 5-MTN zichtbaar zijn gemaakt wordt, na behandeling met zink, een rood-paarse kleur verkregen. Dit complex fluoresceert sterk onder groen licht. De verkregen fluorescentie is vergelijkbaar en in vele gevallen zelfs beter dan de fluorescentie die wordt verkregen met DFO.

5-MTN combineert de eigenschappen goede zichtbaarheid en fluorescentie, waardoor zwakkere vingerafdrukken nog goed geïdentificeerd kunnen worden. Op de foto rechts, is een vingerafdruk te zien, waarvan de linkerhelft met 5-MTN is behandeld en de rechter met gewone ninhydrine. De afdruk is tamelijk zwak en hoe de papillairlijnen lopen is niet goed te zien (bovenste foto). Echter na behandeling met zink is de met 5-MTN behandelde (en nu fluorescerende) helft van de vingerafdruk perfect identificeerbaar.

Fluorescentie van vingerafdrukken, zichtbaar gemaakt met ninhydrine

Een vingerafdruk zichtbaar gemaakt met gewone ninhydrine kan na behandeling met een cadmium- (zeer giftig) of zinkzout in principe fluoresceren. In de praktijk is echter gebleken dat deze procedure onbetrouwbaar is. De fluorescentie blijkt sterk afhankelijk te zijn van de voorbehandeling en andere, onbekende factoren. Ook is de fluorescentie bij kamertemperatuur zwak. Het papier moet in vloeibare stikstof, met een temperatuur van $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$, worden afgekoeld om een behoorlijke fluorescentie te verkrijgen. Zie voor meer informatie en literatuurverwijzingen het artikel van Wainwright et al. [1].

5-MTN heeft deze nadelen niet:

- De fluorescentie is heel betrouwbaar, ook als het papier droog verwarmd wordt om de vingerafdrukken zichtbaar te maken.
Uiteraard is dit een niet aan te raden procedure, de vingerafdrukken blijven in dit geval zwakker dan bij ontwikkeling onder de ideale omstandigheden, bij kamertemperatuur en een hoge luchtvochtigheid (ca. 80%).
- De fluorescentie bij kamertemperatuur is uitstekend.



Localiseren van biologische sporen voor DNA-analyse

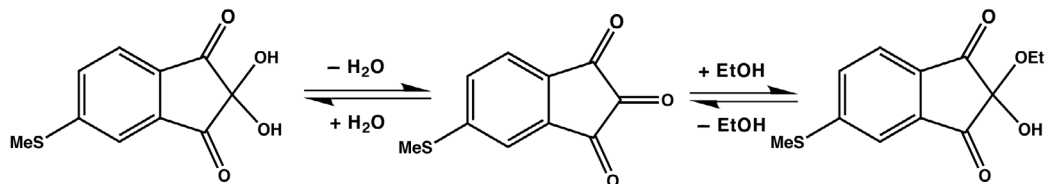
5-MTN/ $ZnCl_2$ kan gebruikt worden voor de detectie van biologische sporen op bijvoorbeeld kleding en papier (Schulze et al., 2011 [10]). Op donkere absorberende en niet-absorberende oppervlakken werden sporen eerst gefixeerd voordat een behandeling met 5-MTN werd gedaan. Delen met biologische sporen (zoals speeksel) fluoresceerden onder groen licht (460 nm). Visueel waren deze delen niet herkenbaar. Er werd geen negatief effect op de DNA-analyse door de behandeling met 5-MTN/ $ZnCl_2$ geconstateerd.

Werkoplossingen

Hoewel 5-MTN minder goed in apolaire oplosmiddelen oplost dan ninhydrine, is de oplosbaarheid toch belangrijk beter dan die van DFO. 5-MTN in zijn ninhydrinevorm (hydraat) lost tamelijk langzaam op bij het maken van de geconcentreerde oplossing zoals hieronder beschreven.

Wij hebben ervaren dat het hemiketaal van 5-MTN met ethanol veel sneller oplost dan 5-MTN (ninhydrine oftewel hydraatvorm) zelf.

Daarom leveren we 5-MTN als hemiketaal met ethanol. Voor een verhandeling over hemiketalen van ninhydrine zie het proefschrift van dr. Olga Petrovskaja (die werkzaam was in de groep van Prof. Joullié) en de daarin genoemde referenties [2].



5-MTN hydraat van triketon
Algemene vorm van ninhydrines

Triketon, de reactieve tussenstap
die reageert met aminozuren

5-MTN hemiketaal met ethanol
Betere oplosbaarheid dan het
hydraat (N.B. EtOH is ethanol)

Het hemiketaal zal, wanneer het op papier aangebracht wordt snel reageren tot het hydraat (de gebruikelijke vorm van "ninhydrine") onder invloed van het water aanwezig in het papier en in de omgevingsatmosfeer. De reactie tussen aminozuren in de vingerafdrukken wordt daarom niet nadelig beïnvloed door het gebruik van het hemiketaal in plaats van de ninhydrinevorm.

De 5-MTN gebruiksooplossing die we op dit moment aanbevelen heeft de volgende samenstelling:

3,4 g	5-MTN hemiketaal (equivalent met 3 gram 5-MTN [ninhydrinevorm])
10 ml	azijnzuur (99-100%)
25 ml	isopropanol
145 ml	ethylacetaat
100 ml	MTBE (methyl-tert-butylether)
720 ml	petroleumether (40-60° or 60-80°)

1000 ml werkoplossing

Deze werkoplossing, door BVDA leverbaar in 100, 250 en 500 ml verpakking, is langdurig stabiel bij kamertemperatuur. Bij afkoelen (bijvoorbeeld tijdens verzending in de winter) kan een deel van de 5-MTN in de oplossing uitkristalliseren. Na opwarmen tot kamertemperatuur en roeren/schudden gaat de 5-MTN geleidelijk weer in oplossing.

Bij het maken van een gebruiksooplossing vanuit 5-MTN hemiketaal kristallen dienen deze eerst opgelost te worden in het mengsel van azijnzuur, isopropanol en ethylacetaat (10-15 minuten bij roeren) tot een geconcentreerde oplossing is verkregen. Nadat alle kristallen zijn opgelost wordt de werkoplossing gemaakt door achtereenvolgens methyl-tert-butylether (MTBE) en petroleumether toe te voegen.



Behandeling met 5-MTN

Het gebruik van 5-MTN bij het ontwikkelen van vingerafdrukken is identiek aan gewone ninhydrine. De te behandelen papieren worden door de werkoplossing gehaald en de oplosmiddelen de gelegenheid gegeven te verdampen. Dit alles dient in een zuurkast te gebeuren om inademing van oplosmiddeldampen te vermijden en om de vorming van een eventueel explosiegevaarlijk oplosmiddel/lucht mengsel in de werkruimte te voorkomen.



Dompelbad B-79500

Voor het behandelen van papier heeft BVDA een praktisch kunststof dompelbad in het pakket. Hierin kan met kleine hoeveelheden gebruiksooplossing gewerkt worden, waardoor minder ongewenste verdamping optreedt.

Nadat de gebruiksooplossing van het papier verdampt is ontwikkelen de vingerafdrukken. De snelheid van ontwikkelen is overeenkomstig met die van ninhydrine zelf. De ideale omstandigheden voor de ontwikkeling van met ninhydrine behandelde papieren kunnen worden aangehouden:

- bij kamertemperatuur
- in een donkere omgeving
- bij verhoogde luchtvochtigheid (ca. 80%) [3].

Na één tot twee dagen bij kamertemperatuur is het grootste deel van de ontwikkeling van de vingerafdrukken achter de rug. De ontwikkeling gaat na deze periode nog langzaam door (circa twee weken, zie referentie 7 en 8 voor gewone ninhydrine).

Omdat de nabehandeling van de ontwikkelde vingerafdrukken met zinkchloride oplossing elke verdere ontwikkeling stopt, moet deze vooral niet te vroeg gebeuren. Wacht hiermee zeker twee dagen na de behandeling met de aanbevolen gebruiksooplossing.

Behandeling met zinkchloride

Het behandelen van met 5-MTN ontwikkelde vingerafdrukken is eenvoudig. BVDA heeft een zinkchlorideoplossing ontwikkeld op basis van MTBE en petroleumether. Deze oplossing bevat een hoge concentratie zinkchloride (30 g/l), zodat voor de behandeling slechts een geringe hoeveelheid benodigd is.

Het is mogelijk om het papier in de zinkchlorideoplossing te dompelen. Echter de kans op doorlopen van inkten is niet denkbeeldig, bovendien is de concentratie zink in de oplossing hoger dan nodig voor dompelen.

Wij bevelen dan ook aan om een sprayer te gebruiken, in een zuurkast, voor de behandeling van papier met zinkchlorideoplossing. Sproei een kleine hoeveelheid over het papier, laat het oplosmiddel verdampen en wacht gedurende korte tijd. Voor de vorming van het fluorescerende complex is een kleine hoeveelheid water nodig, waarvan meestal genoeg in de omgevingslucht aanwezig is. De reactie zal over het algemeen binnen enkele minuten verlopen. Bevochtigen van een vingerafdruk (door erop te ademen) versnelt het proces. Opnieuw besproeien is alleen nodig wanneer de kleuromslag niet volledig is.

Door het papier met de zinkchloride oplossing te besproeien kan men eenvoudig doseren en is het doorlopen van inkten het beste te voorkomen.



Fluorescentie na zinkchloride behandeling

Vingerafdrukken die ontwikkeld zijn met gewone ninhydrine kunnen fluorescerend worden na behandeling met zinkchloride. Dit is echter een onbetrouwbaar proces gebleken dat gevoelig is voor de omstandigheden waaronder de afdrukken zijn ontwikkeld en andere onbekende factoren. 5-MTN is veel betrouwbaar in dat opzicht. Zelfs behandeling met een stoomstrijkijzer (niet aanbevolen) en vervolgens met zinkchloride zal een goed fluorescerende vingerafdruk geven (hoewel de fluorescentie minder zal zijn dan bij ontwikkeling onder meer gunstige omstandigheden).

Op sommige laagwaardige papiersoorten (zoals kranten, gerecycled papier en golfkarton) vonden wij dat 5-MTN wel goed zichtbare vingerafdrukken oplevert maar een zwakke of helemaal geen fluorescentie na behandeling met zinkchloride.

Behandeling met zinkchloride van met 5-MTN zichtbaar gemaakte vingerafdrukken zal de kleur ervan (in eerste instantie hetzelfde als de kleur van die van "gewone" ninhydrine) slechts weinig veranderen: ze worden iets rozer. Dit in tegenstelling tot ninhydrine, waarbij ze van paars naar oranje kleuren. Deze oranje vingerafdrukken absorberen (blauwgroen) licht sterker dan onbehandelde vingerafdrukken. Aldus kan met zwakke vingerafdrukken wat meer contrast verkregen worden. Met 5-MTN hebben we geen verbetering van het contrast geconstateerd na behandeling met zinkchloride.

Vingerafdrukken ontwikkeld met 5-MTN en nabehandeld met zinkchloride fluoresceren onder groen licht (met een optimum van rond de 520 nm). De excitatie en benodigde filters komen goeddeels overeen met die voor vingerafdrukken ontwikkeld met DFO. Het bekijken en fotograferen van de fluorescentie kan het beste worden uitgevoerd met donkeroranje filters, die bij circa 570-590 nm licht beginnen door te laten.

Nota bene:

Bij het gebruik van cadmiumzouten (bijzonder giftig en milieuonvriendelijk) voor de nabehandeling van, met 5-MTN, ontwikkelde vingerafdrukken wordt een zwakkere fluorescentie verkregen dan bij het gebruik van zinkchloride. Andere metaalzouten (o.a. nikkel en koper) bleken geen fluorescerende vingerafdrukken te geven

Receptuur van een zinkchloride-oplossing

Voor de behandeling met zinkchloride hebben wij een receptuur ontwikkeld op basis van een oplosmiddel met een laag effect op de opwarming van de aarde (global warming potential) namelijk petroleumether (of iets soortgelijks als heptaan of pentaan).

Los 30 gram zinkchloride (watervrij!) op in een mengsel van 500 ml methyl-tert-butylether (MTBE) en 20 ml of watervrije ethanol (98% of hoger) in een 1 liter erlenmeyer onder magnetisch roeren (teflon gecoate roerboon). Uiteraard dient dit in een zuurkast te gebeuren. Het duurt ongeveer 30 tot 60 minuten voordat alle zinkchloride is opgelost.

Als alles opgelost is, wordt 10 ml azijnzuur (ijsazijn, 99-100%) toegevoegd en vervolgens 500 ml van een koolwaterstof oplosmiddel zoals petroleumether, pentaan, heptaan of hexaan). Bewaar de oplossing een bruine glazen fles.

De oplossing is stabiel, zelfs bij lage temperatuur en is in principe onbeperkt houdbaar. Omdat zinkchloride, ethanol en azijnzuur hygroscopisch zijn moet de fles dan wel goed afgesloten blijven.

Historie van 5-MTN

5-Methylthioninhydrine (5-MTN) is begin jaren negentig voor het eerst gesynthetiseerd door prof. Madeleine Joullié en haar medewerker dr. Robert Heffner van de Universiteit van Pennsylvania [4]. Testen van de US Secret Service (USSS) [5] en de Israelische Nationale Politie [6] toonden aan dat 5-MTN vingerafdrukken kan ontwikkelen met een kleur equivalent (of sterker) dan ninhydrine. Na



behandeling met zinkchloride bleken de ontwikkelde vingerafdrukken sterker te fluoresceren dan die ontwikkeld met DFO.

De gepubliceerde syntheses [referenties 4 en 6] konden om uiteenlopende redenen niet op grote schaal gedaan worden. Dit probleem is door BVDA opgelost.

Voor een uitvoerig overzicht van de stand der techniek betreffende ninhydrine en ninhydrineanaloga van voor 1991, zie het hoofdstuk geschreven door dr. Joseph Almog in "Advances in Fingerprint Technology" [9].

Leveringsprogramma voor 5-MTN

BVDA maakt en levert de volgende gebruiksklare 5-MTN sets, bestaande uit 5-MTN gebruiksklare oplossing en de begeleidende zinkchloride oplossing. Deze kunnen ook afzonderlijk geleverd worden.

Cat.nr. Omschrijving

B - 78215 5-MTN gebruiksklare oplossing, 100 ml

B - 78220 5-MTN gebruiksklare oplossing, 250 ml

B - 78225 5-MTN gebruiksklare oplossing, 500 ml

B - 78315 5-MTN 100 ml set, bestaande uit 5-MTN gebruiksklare oplossing (100 ml) en zinkchloride oplossing (100 ml)

B - 78320 5-MTN 250 ml set, bestaande uit 5-MTN gebruiksklare oplossing (250 ml) en zinkchloride oplossing (250 ml)

B - 78325 5-MTN 500 ml set, bestaande uit 5-MTN gebruiksklare oplossing (500 ml) en zinkchloride oplossing (500 ml)

5-MTN kan ook als een geconcentreerde oplossing geleverd worden. Een gebruiksklare oplossing wordt gemaakt door verdunnen met petroleumether 40-60° of 60-80°.

B - 78250 5-MTN geconcentreerde oplossing, voor 500 ml gebruiksklare oplossing

B - 78255 5-MTN geconcentreerde oplossing, voor 1000 ml gebruiksklare oplossing

Zinkchloride oplossingen zijn ook los te verkrijgen:

B - 794105 Zinkchloride oplossing (100 ml)

B - 794110 Zinkchloride oplossing(250 ml)

B - 794115 Zinkchloride oplossing (500 ml)

Om zelf gebruiksklare oplossing te maken kan 5-MTN (als het hemiketaal met ethanol) als poeder geleverd worden:

B - 78200 5-MTN (ethanol hemiketaal), 1 gram

B - 78201 5-MTN (ethanol hemiketaal), 5 gram

B - 78205 5-MTN (ethanol hemiketaal), 25 gram

Referenties en voetnoten

[1] Davies, P.J.; Kobus, H.J.; Taylor, M.R.; Wainwright, K.P., "Synthesis and Structure of the Zinc(II) and Cadmium(II) Complexes Produced in the Photoluminescent Enhancement of Ninhydrin Developed Fingerprints Using Group 12 Metal Salts", *Journal of Forensic Sciences*, Vol. 40, nr. 4, juli 1995, p. 565-569. DOI: 10.1520/JFS13826j

[2] Petrovskaia, O.G., proefschrift, University of Pennsylvania, 1999.

[3] In een niet al te grote (afgesloten) ruimte kan dit gerealiseerd worden door het plaatsen van een grote schaal met verzadigde keukenzoutoplossing. Deze oplossing wordt gemaakt door zoveel mogelijk keukenzout in (kraan)water op te lossen, totdat het er niet meer in oplost. Bijvoorbeeld in een fles, die



- geschud kan worden. Om zeker te zijn dat de oplossing verzadigd is, wordt zoveel keukenzout toegevoegd dat een deel niet oplost. Het mengsel van zout en oplossing kan dan in de schaal gedaan worden.
- [4] Heffner, R.J.; Joullié, M.M., "Synthetic Routes to Ninhydrins, Preparation of Ninhydrin, 5-Methoxyninhydrin, and 5-(Methylthio)ninhydrin", *Synthetic Communications* **1991**, Vol. 21, nr. 21, p. 2231-2256. DOI: 10.1080/00397919108055457
- [5] Cantu, A.A.; Leben, D.A.; Joullié, M.M.; Heffner, R.J.; Hark, R.J., "A Comparative Examination of Several Amino Acid Reagents for Visualizing Amino Acid (Glycine) on Paper", *Journal of Forensic Identification* **1993**, Vol. 43, nr. 1, p. 44-66.
- [6] Almog, J.; Hirshfeld, A.; Frank, A.; Grant, H.; Harel, Z.; Ittah, Y., "5-Methylthio Ninhydrin and Related Compounds: A Novel Class of Fluorogenic Reagents", *Journal of Forensic Sciences* **1992**, Vol. 37, nr. 3, p. 688-694. DOI: 10.1520/JFS11982J
- [7] Hewlett, D.F.; Sears, V.G., "Replacements for CFC113 in the Ninhydrin Process, Part 1", *Journal of Forensic Identification* **1997**, Vol. 47, nr. 3, p. 287-299.
- [8] Hewlett, D.F.; Sears, V.G.; Suzuki, S., "Replacements for CFC113 in the Ninhydrin Process, Part 2", *Journal of Forensic Identification*, **1997**, Vol. 47, nr. 3, p. 300-306.
- [9] Almog, J., page 103-133 in *Advances in Fingerprint Technology*; Lee, H.C.; Gaensslen, R.E., Editors; Elsevier: New York, 1991. ISBN 0-444-01579-5.
- [10] Schulz, M.M.; Brune, V.; Maiertaler, M.; Graw, M., Visualization of latent biological traces via 5-methylthioninhydrin (5-MTN) staining for forensic DNA typing, *Progress in Forensic Genetics 14 Proceedings of the 24th International ISFG Congress*, Vol. 3, Issue 1, p. e530-e531, DOI: 10.1016/j.fsigs.2011.09.115