

AN EVALUATION OF THE APPLICATION OF CAPILLARY ELECTROPHORESIS TO FORENSIC EXAMINATIONS OF INKS

Joanna MANIA¹, Joanna BIS¹, Paweł KOŚCIELNIAK^{1,2}

¹ Faculty of Chemistry, Jagiellonian University, Cracow

² Institute of Forensic Research, Cracow

ABSTRACT: An analytical procedure for examination of fountain pen and ball-point pen inks was developed, using the PrinCe 550 capillary electrophoresis system with spectrophotometric detection. Samples were taken from ink lines in the form of paper microdots of 0.8 mm diameter. The ink sample was extracted from paper with pyridine-water solution (1:1). The detection was performed at wavelengths of 215, 375, 570 and 620 nm. Based on analysis of both the standard dye mixtures and real samples, it was revealed that under optimised conditions a reliable differentiation of inks can be carried out. The results presented show that forensic examination of documents with the CE method has good potential.

KEY WORDS: Ink analysis; Capillary electrophoresis; Forensic examinations of documents.

Z Zagadnień Nauk Sądowych, z. LI, 2002, 71–86

Received 6 November 2002; accepted 30 December 2002

INTRODUCTION

Chemical analysis of inks is a comparatively small, but very important sub-branch of forensic questioned document examinations. The aim of an investigation is most often to authenticate a document, or to determine its age or origin.

The specific nature of investigations in a criminalistic laboratory, where the studied object is evidence material in a forensic case, requires that non-destructive analytical methods be applied first: mostly microscopic, optical and spectrometric ones. However, they are often insufficient for differentiation of inks used in the preparation of a document. In such cases, it is necessary to use chemical methods that cause partial destruction of the examined material. One such method is capillary electrophoresis (CE). Because of its advantages and broad analytic applicability, it is of increasing interest to forensic experts.

Research into utilisation of the CE method for identification and comparison of inks for forensic purposes is only being performed in a few chemical laboratories, amongst others, at the Netherlands Forensic Institute (NFI) in Rijswijk, the Netherlands [4] and at Leipzig University, Germany [2, 3]. Recently, this area of research was also initiated at the Forensic Chemistry of the Faculty of Chemistry at the Jagiellonian University, Cracow [1]. The main reasons for taking this step were the following positive features of the CE method, which distinguish it from other analytical methods used in the same field: the small quantity of sample required, the high separation of components of a sample, the low consumption of reagents and the comparatively low cost of exploitation of the apparatus. On the other hand, it was known that results attained with this method depend to a large extent on the chemical conditions under which the sample was prepared for analysis, as well as on the kind of equipment used. Thus we undertook to investigate whether it was possible to develop a full procedure for analysis of inks by the CE method under local laboratory and instrumentation conditions. The obtained results are presented in the current work.

MATERIALS AND METHODS

The examinations were performed using PrinCE 550 apparatus (Prince Technologies, Emmen, the Netherlands) thermostated with air and equipped with a UV-VIS Lambda 1010 Spectrophotometer (Bischoff, Leonberg, Germany). In the examinations, the technique of micellar electrokinetic capillary chromatography (MEKC) was used. The separation buffer solution contained 30% (v/v) acetonitrile, $42 \cdot 10^{-3}$ M SDS, $10.5 \cdot 10^{-3}$ M 3-aminopropanol, $5.25 \cdot 10^{-3}$ M HCl and $0.35 \cdot 10^{-3}$ M Brij-35. The separation buffer was prepared three days before beginning measurements, i.e. after achieving a micellar equilibrium. All solutions were prepared with the use of reagents produced by Sigma-Aldrich (Germany).

Samples of synthetic dyes and inks were analysed. The following dyes were used: Methyl Violet, Fast Blue MBSN, Patent Blue VF, Victoria Blue B, Victoria Blue R, Sudan Black B, Orange II, Rhodamine B, Tartrazine Yellow (all produced by Merck), Methyl Violet and Crystal Violet (by Sigma-Aldrich) and Reactive Black 31, Solvent Black 27, Solvent Black 3 (from NFI). Absorption spectra of standard dyes were measured within the UV/VIS range of radiation using a Helios -spectrophotometer (Unicam, Great Britain) with Aurora Scan 1.1 software.

The separating buffer and samples were introduced onto the apparatus from glass vials of 250 μ l capacity. Solutions were introduced in a hydrodynamic manner under 100 mBar pressure for 6 s. The separation of compo-

nents was carried out at 30 kV using capillaries (SpectroLab, Poland) of internal diameter 50 μm and overall length 75 cm (the distance to the detector was 57 cm). Electropherograms were registered by means of an IBM PC with Dax software (PP van Mierlo, the Netherlands).

Deionised water was used for the preparation of solutions.

RESULTS AND DISCUSSION

Optimisation research

The sensitivity of the capillary electrophoresis apparatus with UV-VIS spectrophotometric detection is comparatively low – this is due to the very short path of the beam of light passing through the examined solution, being equal to the internal diameter of the capillary (50 μm). For this reason, development of a suitable method of collection and preparation of the sample for analysis is especially important, as is establishing suitable conditions for electrophoretic measurements.

In order to establish conditions ensuring maximum sensitivity of measurements, experiments were performed with the use of 14 different dyes that make up inks. Standard methanol solutions of dyes of basic concentration 1 mg/ml were prepared in vials of 4 ml capacity. From each of these, a 36 μl portion was collected and diluted with methanol (1.5 ml) and a mixture of solutions of $2 \cdot 10^{-3}$ M Brij-35, $1 \cdot 10^{-2}$ M HCOOH and $5 \cdot 10^{-3}$ M NaOH of 3.5 ml volume and pH = 3.5. Samples prepared in such a manner were examined by the spectrophotometric technique in the wavelength range of 200 to 800 nm, using a solution of separation buffer as the reference. The obtained spectra are presented in Figure 1.

On the basis of the obtained results, it can be ascertained that in the case of blue and black dyes, maximum absorbance takes place in the wavelength range of 575–680 nm. Violet dyes and red Rhodamine B most strongly absorb at a wavelength of about 570 nm, whereas Tartrazin Yellow 23 and Orange II at 420 and 480 nm respectively. Taking into account the fact that the majority of the examined blue and black ballpoint pen inks contain three dyes: Methyl Violet, Solvent Black 3 and Fast Blue, the following analytical wavelengths were chosen: 215, 375, 570 and 620 nm.

At the next stage, different reagents suitable for the extraction of inks from paper were examined. The aim was to select a reagent that would enable extraction of different kinds of inks with high efficiency, thus making it possible to determine analytes in small amounts of samples.

41 different inks of various colours were selected for study. The following extraction solvents were chosen: methanol, acetonitrile, methoxyethoxy-

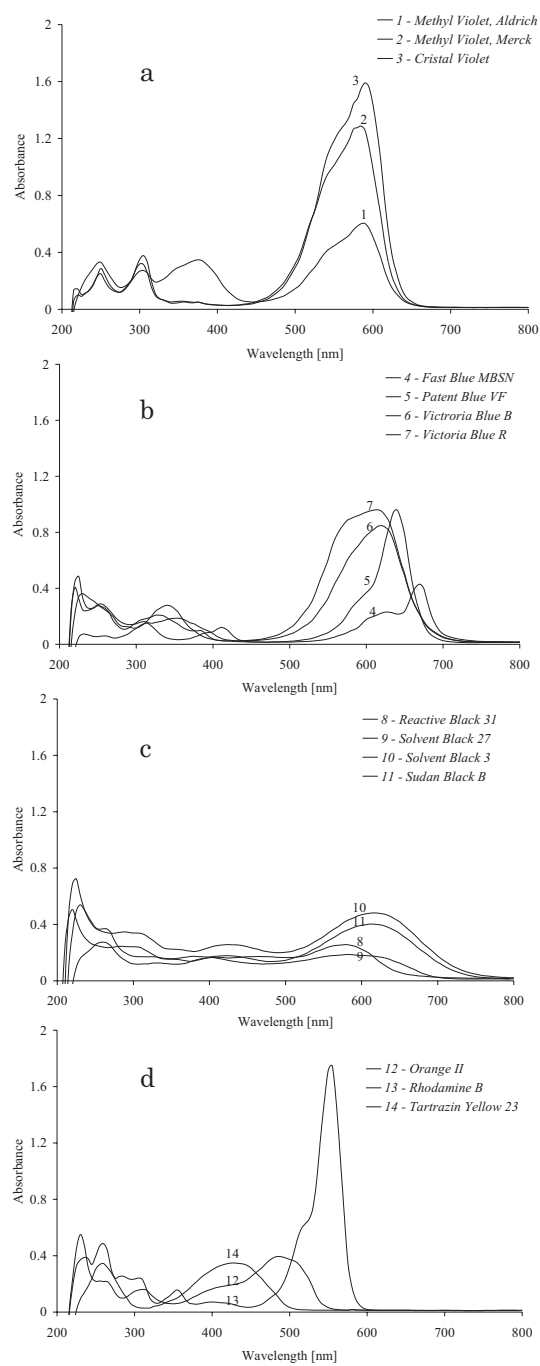


Fig. 1. Absorption spectra of violet (a), blue (b), black (c), and other (d) dyes in relation to the separation buffer as the reference.

ethanol (MEE), dimethylformamide (DMF), pyridine and a mixture of pyridine and water (1:1, v/v). Inks were extracted from graphic lines drawn on paper strips of length 2 cm. The strips were dipped in successive solvents in containers of 4 ml volume and extracted in an ultrasonic washer for 5 and 10 minutes. The basis for choosing the best extractive solvent was a visual evaluation of the appearance of the substrate (the paper) after 5 and 10 minutes of extraction. Results relating to evaluation of the appearance of the paper after 10 minutes of ultrasonic washing are presented in Table I.

The extraction of gel pen inks was the most difficult. Only in the case of red gel pen inks (no. 7, 8 and 9) was the paper successfully decolourised by means of dimethylformamide and pyridine. For the majority of fountain pen inks, the most efficient reagent proved to be a mixture of pyridine and water (1:1, v/v). In the case of ballpoint pen inks, extraction was most effectively performed by means of methanol and dimethylformamide, less effectively with methoxyethoxyethanol, pyridine and a mixture of pyridine with water. The least effective from among the tested solvents proved to be acetonitrile.

Thus, from the above findings, it can be concluded that none of the solvents applied can be used for the isolation of all three types of inks from paper. Since, in practice, the most frequently investigated objects are documents prepared using ballpoint pens and fountain pens, it was decided to use a mixture of pyridine and water for extraction.

It was experimentally ascertained that an additional advantage of using the mixture of pyridine with water for the extraction of inks from paper was that this enabled storage of the analyte in the form of dry remains for a long time after the end of the extraction process and the evaporation of the solvent. "Dry" samples prepared in such a way, wrapped in paraffin foil and stored in the dark, did not show changes in chemical composition even after several days. Use of other solvents for extraction did not engender such properties in the analytes.

Observing the intensity of the colour of the extract during ultrasonic washing, it was found that in most cases it increased from the moment of commencement of the process for about 5 minutes. For the next 5 minutes, no visible changes in the intensity of the colour were noticed. Moreover, further extraction lasting longer than 10 minutes by means of a mixture of pyridine with water caused a visible break-up of the paper and turbidity of the solution. A period of 5 minutes was thus ascertained as the optimum time of extraction.

The aim of further experiments was to establish such a quantity of sample collected for analysis from the writing line that would ensure achievement of an analytic signal permitting unequivocal identification of the examined ink. Samples were collected in the form of discs cut out by means of

a steel needle of 0.8 mm internal diameter. Randomly selected ballpoint pen inks (black no. 6 and blue no. 17) were examined.

The following numbers of discs were cut out: 2, 4, 6, 8 and 10, and subjected to ultrasonic extraction in the pyridine-water mixture (1:1, v/v) in the manner described previously. After 5 minutes the extract was transferred with the use of a micro-syringe to a clean vial and the solvent evaporated in a stream of argon. The remainder was dissolved in 2 μ l of MEE, and then 1 μ l of the mixture of 2 $\times 10^{-3}$ M Brij-35, 1 $\times 10^{-2}$ M HCOOH and 5 $\times 10^{-3}$ M NaOH was added. Then the sample was introduced onto the apparatus and subjected to measurement at a wavelength of 215 nm. The obtained electropherograms were compared to each other, taking into account the number and intensity of the registered peaks. The dependence of the number of peaks on the number of discs taken for analysis is shown in Figure 2. In the case of both ballpoint pen inks, the number of registered peaks decreased with a fall in the number of discs taken for analysis. For the black ballpoint pen ink, this decrease was more pronounced than in the case of the blue one. On the basis of the above results, it was ascertained that the least number of discs required to perform a successful measurement is 4 for the blue ballpoint pen ink and 2 for the black one.

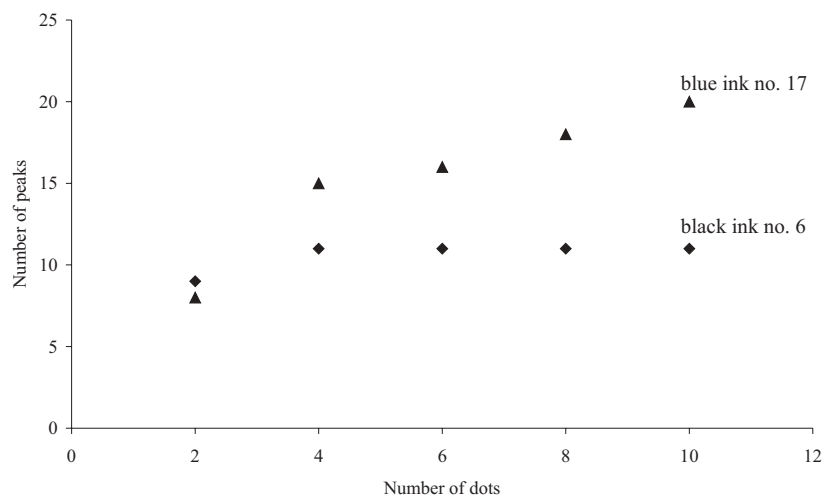


Fig. 2. The dependence of the number of characteristic peaks on the number of discs collected for the analysis of ballpoint pen inks no. 6 and no. 17.

Test research

In order to establish the possibility of differentiation of inks on the basis of their electropherograms, standard samples of dyes and inks were sub-

jected to analyses in optimised technical and chemical conditions. Standard samples were prepared by mixing solutions of suitable dyes: their ionic structure and colour were taken into account, the assumption being that these properties determine the possibility of their occurrence in natural inks. Mixtures of dyes were prepared in the following manner: equal volumes of the initial methanol solutions at a concentration of 10 g per 10 l were mixed together, and then methanol was evaporated until dry, the remains were dissolved in MEE and diluted with the mixture of $2 \cdot 10^{-3}$ M Brij-35, $1 \cdot 10^{-2}$ M HCOOH and $5 \cdot 10^{-3}$ M NaOH in a ratio of 1:2. Samples prepared in such a manner were subjected to measurements at wavelengths of 215, 375, 570, 620 and 670 nm. A typical example of electropherograms obtained for an individual mixture of dyes is presented in Figure 3.

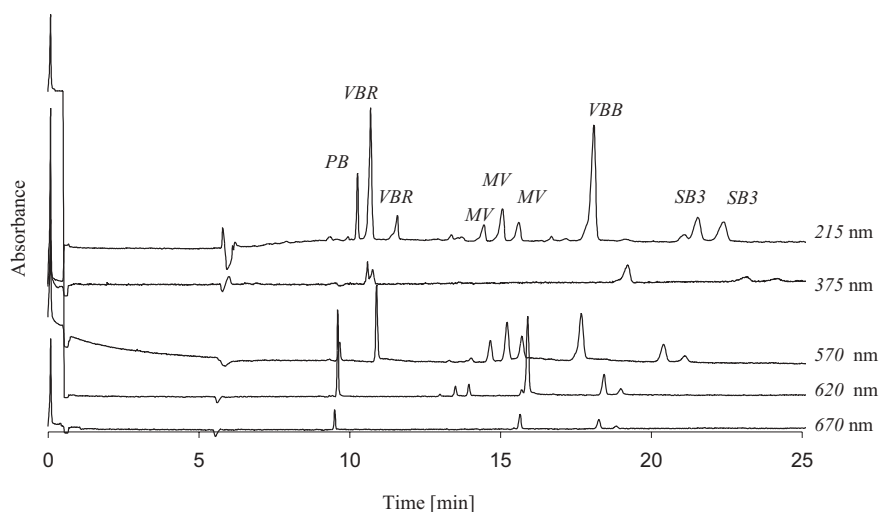


Fig. 3. Electropherograms of an example of mixtures of dyes: The Patent Blue VF (PB), Rhodamine B (RB), Methyl Violet (MV), Victoria Blue B (VBB) and Solvent Black 3 (SB3) obtained for different wavelengths.

Various natural inks were also subjected to comparative analysis. Samples were collected from a line of writing in the form of 6 discs. Chosen electropherograms obtained for three different blue ballpoint pen inks at a wavelength of 570, 620 and 670 nm are presented in Figure 4.

The above examples of obtained results, and also those obtained for other synthetic and natural samples showed that for a sample of defined reference material analysed at different wavelengths, one can expect electrophoretic images that differ significantly from each other in respect of position of peaks and their intensity. This attests to the very great information poten-

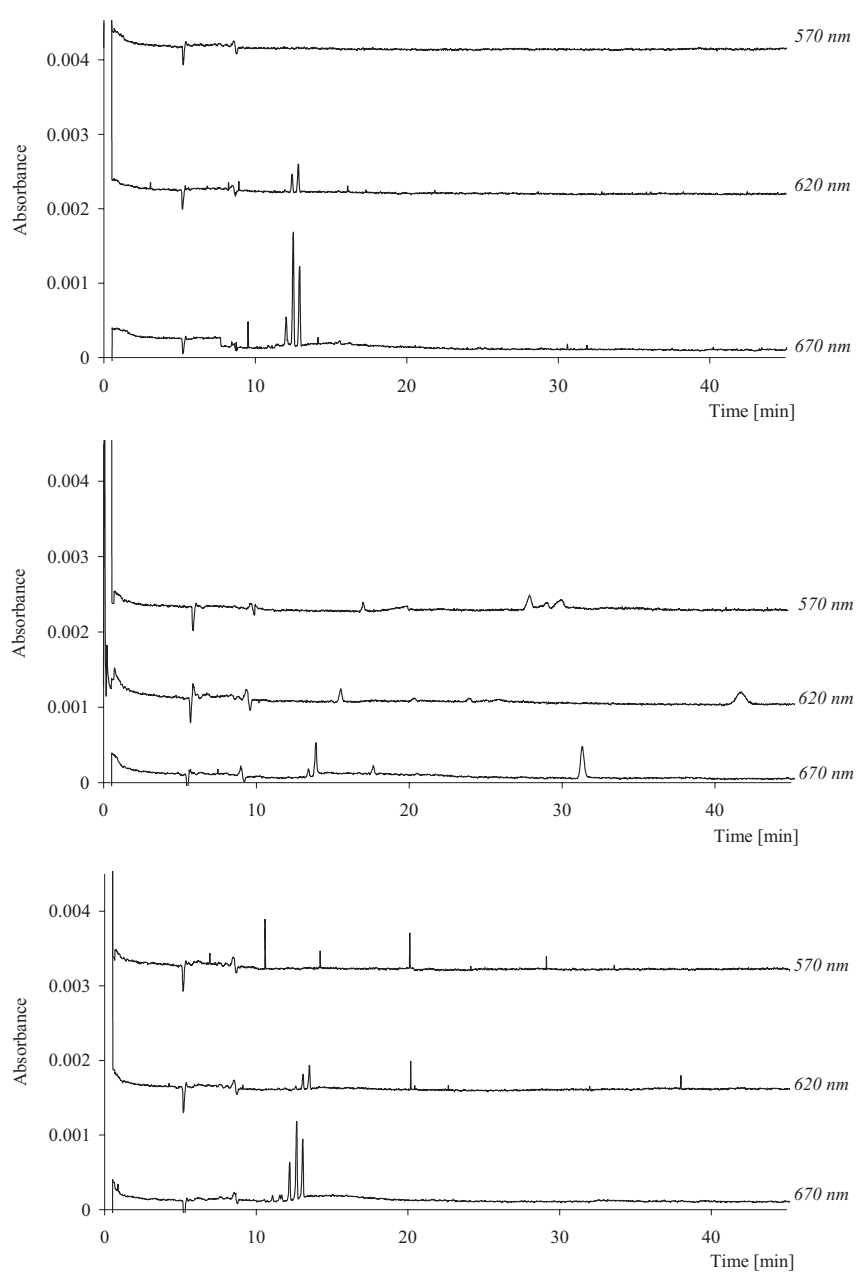


Fig. 4. Examples of electropherograms of three different blue ball pen inks obtained for the following wavelengths: 570, 620 and 670 nm.

tial of electrophoretic measurements, opening up the possibility of effective determination of differences and similarities in chemical composition of inks, and so of establishing the degree of similarity between evidence and comparative material.

CONCLUSIONS

As result of the performed research, optimal analytical conditions were established for examination of blue and black ballpoint pen inks by capillary electrophoresis using a PrinCE 550 system with spectrophotometric detection. The following recommendations, resulting from the performed research, can be put forward:

- The solvent that should be used for the extraction of ballpoint pen inks from samples collected from a writing line is a mixture of pyridine with water. It ensures a relatively high efficiency of extraction, and facilitates the storage of the analyte in the form of dry remains after finishing the extraction and evaporation of the solvent.
- It was ascertained that the smallest quantity of ink taken from a writing line for electrophoretic measurement is: 4 discs of 0.8 mm diameter for blue and 2 (discs of 0.8 mm diameter) for black ballpoint pen inks. One should, however, remember that in practice the thickness of the writing line can vary in different parts of the document depending on the kind, colour and thickness of the ballpoint pen ink. Thus, in order to be certain that the quantity of sample collected in a given case will be sufficient to obtain an electrophoretic image suitable for reliable interpretation, collection of a greater number of discs, e.g. 6, from a writing line is recommended.
- For a single sample of ink, one should perform measurements at different wavelengths: 570, 620 and 670 nm. The obtained electrophoretic images, significantly differing from each other in respect of position and intensities of peaks, provide a basis for reliable assessment of the similarity of the examined material with the comparative material. Evaluation of the similarity will of course be more reliable, the greater the number of different electrophoretic images it is based on.

To summarise, one can ascertain that the developed analytical method of electrophoretic measurement fulfils basic criteria of criminalistic study of documents, i.e. provides the possibility of obtaining results of high reliability and great informative potential, with little destruction of the document and a relatively short time of analysis.

References:

1. Mania J., Madej K., Kościelniak P., Inks analysis by Capillary Electrophoresis – analytical conditions optimisation, *Analytical Chemistry* 2002, vol. 47, pp. 585–594.
2. Rohde E., Vogt C., Heineman W. R., The analysis of fountain pen inks by capillary electrophoresis with ultraviolet/visible absorbance and laser-induced fluorescence detection, *Electrophoresis* 1998, vol. 19, pp. 31–41.
3. Vogt C., Becker A., Vogt J., Investigation of ball point pen inks by Capillary Electrophoresis (CE) with UV/Vis absorbance and laser induced fluorescence detection and particle induced X-ray emission (PIXE), *Journal of Forensic Sciences* 1999, vol. 44, pp. 819–831.
4. Xu X., de Koeijer J. A., de Moel J. J. M. [et al.], Ink analysis for forensic science applications by micellar electrokinetic capillary chromatography with photo-diode array detection, *International Journal of Forensic Document Examiners* 1997, vol. 3, pp. 240–260.

OCENA MOŻLIWOŚCI ZASTOSOWANIA METODY ELEKTROFOREZY KAPILARNEJ DO BADANIA MATERIAŁÓW KRYJĄCYCH POD KĄTEM KRYMINALISTYCZNYM

Joanna MANIA, Joanna BIS, Paweł KOŚCIELNIAK

WPROWADZENIE

Analiza chemiczna materiałów kryjących stanowi stosunkowo niewielką, lecz bardzo ważną dziedzinę kryminalistycznych badań dokumentów. Przedmiotem dochodzenia bywa najczęściej określanie autentyczności, wieku lub źródła pochodzenia dokumentu.

Specyfika badań w laboratorium kryminalistycznym, gdzie badany obiekt stanowi materiał dowodowy w sprawie sądowej, wymaga stosowania w pierwszej kolejności nieniszczących metod analitycznych: głównie metod mikroskopowych, optycznych i spektrometrycznych. Często nie są one jednak wystarczające do zróżnicowania środków kryjących użytych do sporządzenia zapisu. W takich przypadkach konieczne jest zastosowanie metod chemicznych powodujących częściowe zniszczenie badanego materiału. Jedną z nich jest metoda elektroforezy kapilarnej (CE). Ze względu na swoje zalety i szerokie zastosowanie analityczne budzi ona coraz częstsze zainteresowanie ekspertów sądowych.

Badania nad wykorzystaniem metody CE do identyfikacji i porównywania materiałów kryjących dla celów sądowych są prowadzone w nielicznych laboratoriach chemicznych, m.in. w Holenderskim Instytucie Sądowym (Netherlands Forensic Institute, NFI) w Rijswijk w Holandii [4] i na Uniwersytecie w Lipsku w Niemczech [2, 3]. Temat ten został niedawno również zainicjowany w Pracowni Chemii Sądowej Wydziału Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego [1]. Głównym uzasadnieniem tego kroku były zalety metody CE, wyróżniające ją spośród innych metod analitycznych wykorzystywanych na tym samym polu badawczym: wymagana niewielka ilość próbki, duża rozdzielczość składników próbki, niewielkie zużycie odczynników, stosunkowo niski koszt eksploatacji aparatury. Z drugiej strony wiadomo było, że osiągnięte tą metodą wyniki zależą w dużym stopniu od warunków chemicznych, w jakich próbka jest przygotowywana do analizy, a także od rodzaju stosowanej aparatury pomiarowej. Postanowiono zatem sprawdzić możliwość opracowania pełnej procedury analizy materiałów kryjących metodą CE w lokalnych warunkach laboratoryjnych i instrumentalnych. Osiągnięte rezultaty zaprezentowano w obecnej pracy.

MATERIAŁY I METODY

Badania prowadzono przy użyciu zestawu PrinCE 550 (Prince Technologies, Emmen, Holandia) termostowanego powietrzem i wyposażonego w detektor spektrofotometryczny UV-VIS Lambda 1010 Spectrophotometer (Bischoff, Leonberg, Niemcy). W badaniach stosowano technikę micelarnej elektrokinetycznej chromatografii kapilarnej (MEKC). Roztwór buforu separacyjnego zawierał 30% (v/v) aceton-

trylu oraz $42 \cdot 10^{-3}$ M SDS, $10,5 \cdot 10^{-3}$ M 3-aminopropanolu, $5,25 \cdot 10^{-3}$ M HCl i $0,35 \cdot 10^{-3}$ M Brij-35. Bufor separacyjny sporządzano na trzy dni przed rozpoczęciem pomiarów, tzn. po osiągnięciu równowagi micelarnej. Wszystkie roztwory sporządzano przy użyciu odczynników pochodzących z firmy Sigma-Aldrich (Niemcy).

Analizom poddano próbki barwników syntetycznych i materiałów kryjących. Użyto barwników: Methyl Violet, Fast Blue MBSN, Patent Blue VF, Victoria Blue B, Victoria Blue R, Sudan Black B, Orange II, Rhodamine B, Tartrazine Yellow (wszystkie zakupione w firmie Merck), Methyl Violet i Crystal Violet (firmy Sigma-Aldrich) oraz Reactive Black 31, Solvent Black 27, Solvent Black 3 (otrzymane z NFI). Widma absorbcyjne standardowych barwników mierzono w zakresie długości fal promieniowania UV/VIS przy użyciu spektrofotometru Helios (Unicam, Wielka Brytania) z oprogramowaniem Aurora Scan 1.1.

Bufor separujący i próbki wprowadzono do aparatu ze szklanych pojemników w kształcie fiolek o pojemności 250 μ l. Roztwory wprowadzono w sposób hydrodynamiczny pod ciśnieniem 100 mBar w czasie 6 s. Rozdział składników prowadzono pod napięciem 30 kV przy użyciu kapilar (SpectroLab, Polska) o średnicy wewnętrznej 50 μ m i długości całkowitej 75 cm (odległość do detektora wynosiła 57 cm). Elektroferogramy rejestrowano za pomocą komputera typu IBM PC z oprogramowaniem Dax (PP van Mierlo, Holandia).

Do przygotowania roztworów używano wody dejonizowanej.

WYNIKI I DYSKUSJA

Badania optymalizacyjne

Czułość aparatów do elektroforezy kapilarnej z detekcją spektrofotometryczną UV-VIS jest stosunkowo mała, co wynika z bardzo krótkiej drogi promienia przechodzącego przez badany roztwór, a równej wewnętrznej średnicy kapilary (50 μ m). W tej sytuacji szczególnie ważne było opracowanie odpowiedniej metodyki pobierania i przygotowania próbki do analizy, a także ustalenie odpowiednich warunków wykonywania pomiarów elektroforetycznych.

W celu określenia warunków zapewniających maksymalną czułość pomiarów wykonano doświadczenia przy użyciu 14 różnych barwników wchodzących w skład materiałów kryjących. W fiolkach o pojemności 4 ml sporządzano metanole roztwory wzorcowe barwników o stężeniu podstawowym 1 mg/ml. Z każdego z nich pobierano porcję o objętości 36 μ l i rozcieńczano metanolem (1,5 ml) oraz mieszaniną roztworów $2 \cdot 10^{-3}$ M Brij-35, $10 \cdot 10^{-3}$ M HCOOH i $5 \cdot 10^{-3}$ M NaOH o objętości 3,5 ml i pH = 3,5. Tak przygotowane próbki poddawano pomiarom spektrofotometrycznym w zakresie długości fali od 200 do 800 nm, używając roztworu buforu separacyjnego jako odnośnika. Otrzymane widma przedstawiono na rycinie 1.

Na podstawie otrzymanych wyników można stwierdzić, że w przypadku niebieskich i czarnych barwników maksimum absorpcji przypada na zakres 575–680 nm. Fioletowe barwniki i czerwona Rhodamine B najsilniej absorbują przy długości fali ok. 570 nm, a żółty Tartrazin Yellow 23 i pomarańczowy Orange II odpowiednio przy 420 i 480 nm. Uwzględniając fakt, że większość badanych niebieskich i czarnych past długopisowych zawiera trzy barwniki: Methyl Violet, Solvent Black 3 i Fast Blue, jako analityczne długości fali wybrano 215, 375, 570 i 620 nm.

W następnym etapie zbadano różne odczynniki zdolne do ekstrakcji materiałów kryjących z papieru. Chodziło o wybór takiego odczynnika, który umożliwi ekstrakcję materiałów różnego rodzaju z dużą wydajnością umożliwiającą oznaczania analizatów w niewielkiej ilości pobranej próbki.

Do badań przeznaczono 41 różnych materiałów kryjących w formie atramentów, żeli i past o różnej barwie. Jako ekstrahenty wybrano rozpuszczalniki: metanol, acetonitryl, metoksyetoksyetanol (MEE), dimetyloformamid (DMF), pirydynę oraz mieszaninę pirydyna-woda (1:1, v/v). Materiały kryjące ekstrahowano z linii graficznych naniesionych na paski papieru o długości 2 cm. Paski te zanurzano w kolejnych rozpuszczalnikach w naczyniach o objętości 4 ml i poddawano działaniu ekstrahentu w płuczce ultradźwiękowej przez 5 i 10 minut. Podstawę wyboru najlepszego ekstrahenta stanowiła wizualna ocena wyglądu podłoża (papieru) po 5 i 10 minutach ekstrakcji. Wyniki odnoszące się do oceny wyglądu papieru po 10 minutach ultrasonifikacji przedstawiono w tabeli I.

Najtrudniej ekstrakcja zachodziła w grupie żeli. Jedynie w przypadku czerwonych żeli (nr 7, 8 i 9) udało się odbarwić papier za pomocą dimetyloformamidu i pirydyny. Dla większości atramentów najbardziej skutecznym odczynnikiem okazała się mieszanina pirydyny z wodą (1:1, v/v). W przypadku past długopisowych najlepiej zachodziła ekstrakcja za pomocą metanolu i dimetyloformamidu, gorzej metoksyetoksyetanolu, pirydyny i mieszaniny pirydyny z wodą. Najmniej skutecznym spośród testowanych rozpuszczalników okazał się acetonitryl.

Z powyższego wynika, że żadnego z zastosowanych rozpuszczalników nie można więc wykorzystać do izolacji z papieru wszystkich trzech typów materiałów kryjących. Ponieważ w praktyce najczęstszym przedmiotem badań bywają zapisy sporządzone przy użyciu długopisów i piór, do ekstrakcji postanowiono stosować mieszaninę pirydyny z wodą.

Stwierdzono doświadczalnie, że dodatkową zaletą stosowania mieszaniny pirydyny z wodą do ekstrakcji materiałów kryjących z papieru jest możliwość przechowywania analitu w postaci suchej pozostałości przez dłuższy czas po zakończeniu ekstrakcji i odparowaniu rozpuszczalnika. Tak sporządzone „suche” próbki, zabezpieczone folią parafinową i przechowywane bez dostępu światła, nie wykazywały zmian w składzie chemicznym nawet po kilku dniach. Właściwości takich nie zapewniały inne rozpuszczalniki stosowane do ekstrakcji.

Obserwując intensywność barwy ekstraktu podczas ultrasonifikacji, stwierdzono, iż w większości przypadków wzrastała ona od momentu rozpoczęcia procesu przez ok. 5 min. Przez następne 5 min nie zauważono widocznych zmian w intensywności barwy. Ponadto dalsza trwająca dłużej niż 10 minut ekstrakcja za pomocą mieszaniny pirydyny z wodą powodowała widoczny rozpad papieru i zmętnienie roztworu. Za optymalny czas ekstrakcji uznano więc okres 5 minut.

Celem kolejnych doświadczeń było ustalenie takiej ilości próbki pobieranej do analizy z linii pisma, która zapewnia uzyskanie sygnału analitycznego pozwalającego na jednoznaczną identyfikację badanego materiału kryjącego. Próbki pobierano w postaci krążków wycinanych za pomocą stalowej igły o średnicy wewnętrznej 0,8 mm. Do badań przeznaczono losowo wybrane pasty długopisowe (czarną nr 6 i niebieską nr 17).

Wycięte krążki w liczbie: 2, 4, 6, 8 i 10 poddawano kolejno ekstrakcji ultradźwiękowej w mieszaninie pirydyna-woda (1:1, v/v) w sposób opisany poprzednio. Po

5 min ekstrakt przenoszono przy użyciu mikrostrzykawki do czystej fiolki i w strumieniu argonu odparowywano rozpuszczalnik. Otrzymaną pozostałość rozpuszczano w 2 l MEE i dodawano 1 l mieszaniny $2 \cdot 10^{-3}$ M Brij-35, $10 \cdot 10^{-3}$ M HCOOH i $5 \cdot 10^{-3}$ M NaOH. Tak przygotowaną próbkę wprowadzano do aparatu i poddawano pomiarom przy długości fali 215 nm. Uzyskane elektroferogramy porównywano ze sobą, biorąc pod uwagę liczbę i intensywność zarejestrowanych pików. Zależność liczby pików od liczby krążków pobranych do analizy przedstawiono na rycinie 2.

W przypadku obydwu past długopisowych liczba rejestrowanych pików zmniejszała się wraz ze spadkiem liczby krążków pobranych do analizy. Dla czarnej pasty długopisowej spadek ten był wyraźniejszy niż w przypadku pasty niebieskiej. Na podstawie powyższych wyników stwierdzono, że najmniejsza liczba krążków pozwalająca na efektywne przeprowadzenie pomiaru to 4 dla pasty niebieskiej i 2 dla pasty czarnej.

Badania testowe

W celu określenia możliwości różnicowania materiałów kryjących na podstawie ich elektroferogramów, analizom w zoptymalizowanych warunkach aparaturowych i chemicznych poddano standardowe próbki barwników i próbki materiałów kryjących.

Próbki standardowe sporządzano przez zmieszanie roztworów odpowiednich barwników. Kierowano się przy tym ich budową jonową i barwą, przyjmując, że te właściwości decydują o możliwości ich występowania w naturalnych materiałach kryjących.

Mieszaniny barwników sporządzano przez połączenie jednakowych objętości wyjściowych roztworów metanолоwych o stężeniu 10 g na 10 l, a następnie odparowanie metanolu do sucha, rozpuszczenie pozostałości w MEE i rozcieńczenie mieszaniną $2 \cdot 10^{-3}$ M Brij-35, $10 \cdot 10^{-3}$ M HCOOH i $5 \cdot 10^{-3}$ M NaOH w stosunku 1:2. Tak przygotowane próbki poddawano pomiarom przy długościach fal 215, 375, 570, 620, 670 nm. Typowy przykład uzyskanych elektroferogramów dla pojedynczej mieszaniny barwników przedstawiony jest na rycinie 3.

Badaniom porównawczym poddano również różne naturalne materiały kryjące. Próbki pobierano z linii pisma w postaci 6 krążków. Na rycinie 4 przedstawiono wybrane elektroferogramy otrzymane dla trzech różnych niebieskich past długopisowych przy długości fali 570, 620 i 670 nm.

Wyniki pokazane na powyższych przykładach, a także otrzymane dla innych próbek syntetycznych i naturalnych wykazały, że dla próbki określonego materiału referencyjnego analizowanego przy różnych długościach fali można się spodziewać pojawienia się obrazów elektroforetycznych znacząco różniących się od siebie tak pod względem położenia pików, jak i ich intensywności. Świadczy to o bardzo dużym potencjale informacyjnym pomiarów elektroforetycznych, otwierającym możliwość efektywnego określania różnic i podobieństw składu chemicznego materiałów kryjących, a w konsekwencji ustalania stopnia podobieństwa między materiałem dowodowym i porównawczym.

WNIOSKI

W wyniku przeprowadzonych badań ustalono optymalne warunki analityczne metody elektroforezy kapilarnej z zastosowaniem systemu PrinCE 550 z detekcją spektrofotometryczną do badań niebieskich i czarnych past długopisowych. Zalecenia wypływające z przeprowadzonych badań są następujące:

- Rozpuszczalnikiem, który należy stosować do ekstrakcji past długopisowych z próbek pobieranych z linii pisma, jest mieszanina pirydyny z wodą. Zapewnia on stosunkowo wysoką wydajność ekstrakcji oraz ułatwia przechowywanie analitu w postaci suchej pozostałości po zakończeniu ekstrakcji i odparowaniu rozpuszczalnika.
- Stwierdzono, że najmniejsza ilość materiału kryjącego pobranego z linii pisma z przeznaczeniem do pomiaru elektroforetycznego, określona liczbą krążków o średnicy 0,8 mm, wynosi 4 dla niebieskich i 2 dla czarnych past długopisowych. Należy jednak pamiętać, że w praktyce grubość linii pisma może wahać się w różnych miejscach zapisu w zależności od rodzaju, koloru i gęstości pasty długopisowej. Aby zatem być pewnym, że ilość próbki pobranej w danym przypadku będzie wystarczająca dla uzyskania obrazu elektroforetycznego możliwego do wiarygodnej interpretacji, zaleca się pobieranie z linii pisma większej liczby krążków, np. 6.
- Dla pojedynczej próbki materiału kryjącego należy wykonać pomiary przy co najmniej różnych długościach fali: 570, 620 i 670 nm. Otrzymane obrazy elektroforetyczne, różniąc się wówczas znacznie od siebie pod względem położenia i intensywności pików, dają podstawę do wiarygodnego określenia podobieństwa badanego materiału z materiałem porównawczym. Analiza podobieństwa będzie oczywiście tym bardziej wiarygodna, im większa liczba różnych obrazów elektroforetycznych będzie stanowiła jej podstawę.

Podsumowując, można stwierdzić, że opracowana metoda analityczna oparta na pomiarach elektroforetycznych spełnia podstawowe kryteria kryminalistycznych badań dokumentów, tj. stwarza możliwość uzyskania wyników o dużej wiarygodności i dużym potencjale informacyjnym przy niewielkim zniszczeniu dokumentu i stosunkowo krótkim czasie analizy.