

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**

**Přírodovědecká fakulta**

**Katedra analytické chemie**

**Analýza inkoustů metodou kapilární  
elektroforézy**

**Bakalářská práce**

**Praha 2007**

**Alice Nováková**

## Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně, pod vedením školitele prof. RNDr. Věry Pacákové CSc. (a konsultanta Mgr. Evy Svobodové), a že jsem všechny použité prameny řádně citovala.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne.....3. 4. 07.....

.....Kovářová Marie.....

podpis

Vedoucí bakalářské práce

Prof. RNDr. Věra Pacáková, CSc.

Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, katedra analytické chemie

Konzultant bakalářské práce

Mgr. Eva Svobodová

Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, katedra analytické chemie

## Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala všem, kteří mi byli nápomocni při vzniku této práce. Především pak svým školitelkám prof. RNDr. Věře Pacákové CSc. a Mgr. Evě Svobodové za odborné rady a vedení během práce a Mgr. Martinovi Fůrbachovi za poskytnutí odborné literatury. Děkuji také všem členům katedry za vytvoření přátelského pracovního prostředí.

## OBSAH

1 ÚVOD.....	8
2 TEORETICKÁ ČÁST .....	9
2.1 KULIČKOVÁ PERA A JEJICH SLOŽENÍ .....	9
2.2 KAPILÁRNÍ ELEKTROMIGRAČNÍ METODY .....	11
2.2.1 Kapilární zónová elektroforéza (CZE) .....	12
2.2.2 Micelární elektokinetická kapilární chromatografie (MEKC, MECC) .....	14
2.3 METODY ANALÝZY INKOUSTŮ.....	15
2.3.1 Vizuelní metody.....	15
2.3.2 Separační metody.....	15
2.3.3 Přímá hmotnostní spektrometrie.....	19
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	20
3.1 CHEMIKÁLIE.....	20
3.2 PŘÍPRAVA ROZTOKŮ.....	20
3.2 POUŽITÉ PŘÍSTROJE .....	22
4. VÝSLEDKY A DISKUZE.....	23
4.1 VOLBA DETEKCE .....	23
4.1.1 Zjištění optimální vlnové délky .....	23
4.1.2 Určení disociačních konstant .....	24
4.2 OPTIMALIZACE SEPARAČNÍCH PODMÍNEK .....	26
4.2.1 Volba pufu.....	26
4.2.2 Vliv přídavku organického modifikátoru do roztoku elektrolytu.....	26
4.3 KVANTIFIKACE STANDARDŮ .....	28
5 ZÁVĚR.....	32
6 LITERATURA .....	33

## POUŽITÉ ZKRATKY

C.I.	Colour Index, Index barevnosti
CE	kapilární elektroforéza
CZE	kapilární zónová elektroforéza
CGE	kapilární gelová elektroforéza
MEKC, MECC	micelární elektrokinetická kapilární chromatografie
EC, CEC	elektrochromatografie v naplněných kapilárách
CIEF	kapilární izoelektrické fokusování
CITP	kapilární izotachoforéza
EOF	elektroosmotický tok
E	intenzita elektrického pole
$v_{ef,i}$	elektroforetická rychlost i-tého iontu
$\mu_{ef,i}$	elektroforetická pohyblivost i-tého iontu
$v_{eof}$	rychlost elektroosmotického toku
$\mu_{eof}$	elektroforetická pohyblivost
$t_{mig,i}$	migrační čas analytu
$t_{eof}$	migrační čas neutrální látky
U	napětí
$L_C$	celková délka kapiláry
$L_D$	délka kapiláry k detekčnímu okénku
$Q_i$	celkový náboj i-tého iontu
$r_i$	poloměr i-tého iontu
$\eta$	dynamická viskozita prostředí
SDS	dodecylsírán sodný
PC	papírová chromatografie
TLC	tenkovrstvá chromatografie
HPTLC	vysokoúčinná tenkovrstvá chromatografie
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
GC	plynová chromatografie
UV	ultrafialová oblast
VIS	viditelná oblast
MS	hmotnostní spektrometrie

LDMS	laserová desorpční hmotnostní spektrometrie
CV	krystalová violet
MV	metylvá violet
$\lambda$	vlnová délka
A	absorbance
AU	absorpční jednotky
A	plocha píku
h	výška píku
c	koncentrace
pKa	logaritmus disociační konstanty
MeOH	methanol
LOD	mez detekce
LOQ	mez stanovitelnosti
$\sigma$	směrodatná odchylka šumu

## 1 ÚVOD

Předmětem práce bylo studium inkoustových náplní kuličkových per. Znalosti o jejich složení lze využít především v kriminalistice. Například ze složení inkoustů lze určit stáří dokumentu a jeho pravost.

V současné době se k analýze inkoustů využívají chromatografické a elektromigrační metody. Kapilární elektroforéza zaujímá významné místo v soudních analýzách, protože je velmi citlivá, rychlá a k analýze postačí minimální množství vzorku.

Proto je tato práce zaměřena na aplikaci kapilární elektroforézy k charakterizaci inkoustů. Prezentuje předběžné výsledky s optimalizací separace a detekce krystalové violeti a metylové violeti jako hlavních složek inkoustů.



## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 KULIČKOVÁ PERA A JEJICH SLOŽENÍ <sup>[1]</sup>

Kuličkové pero bylo poprvé patentováno v roce 1895 a k jeho rozsáhlejšímu používání přispěla až druhá světová válka. První kuličkové pero obsahovalo minerální oleje a kyselá barviva, jako například nitrosoazobarviva a nitroazobarviva.

Kolem roku 1950 se začínají používat psací pasty založené na glykolech se zásaditými barvivy anilínového typu. Okolo roku 1955 jsou poprvé použita barviva na bázi chelátů kovů, z nichž nejčastěji modrozelený komplex mědi s ftalokyaninem. Tato barviva byla velmi stabilní.

V padesátých letech minulého století se začíná jako barvivo používat methylová a krystalová violeť, a využívají se dodnes. V tabulce 1. je uvedeno typické složení náplně kuličkových per.

Tabulka 1. Typické složení náplně kuličkového pera

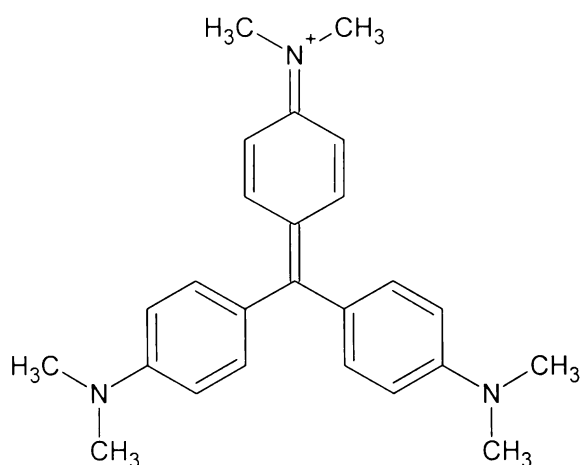
Sloučenina	relativní obsah*
Pigmenty / barviva	5 - 25 %
Rozpouštědla	25 - 50 %
Pryskyřice / polymery	5 - 35 %
Oleje (ve starších psacích pastách)	5 - 50 %
Modifikátory (antioxidanty, pesticidy)	1 - 5 %
Nečistoty (stopové prvky, vedlejší produkty)	< 3 %

\* Přibližný rozsah byl získán z údajů o složení různých psacích past

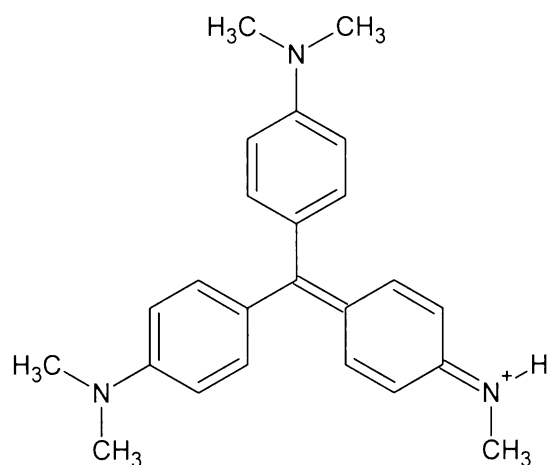
Materiály, ze kterých jsou tvořeny náplně kuličkových per, spadají do tří kategorií: barevná složka, nosiče a modifikátory.

Barevná složka tvoří přibližně čtvrtinu obsahu náplně. Je tvořena pigmenty a barvivy. Pigmenty jsou stabilnější a barevnější, barviva jsou rozpustnější, ale více degradují na světle. V současnosti jsou kuličková pera složena z krystalové violeti a jejích derivátů, kterým je i methylová violeť. Obě tyto látky jsou kationtová barviva se zářivými odstíny. Mají podobné vlastnosti a proto jsou často zaměňovány. Methylová violeť se od krystalové violeti odlišuje absencí jedné methylové skupiny, která je

nahrazena vodíkem. Struktury obou látek jsou zobrazeny na obr. 1. a obr. 2. Výčet vlastností obou látek je v tabulce 2.



Obr. 1. Struktura krystalové violeti



Obr. 2. Struktura methylové violeti

Tabulka 2. Vlastnosti krystalové a methylové violeti [2]. [3]. [4]. [5]

	<b>Krystalová violeť</b>	<b>Methylová violeť</b>
<b>Vzorec</b>	$C_{25}H_{30}ClN_3$ Hexamethylpararosanilin chlorid	$C_{24}H_{28}ClN_3$ Cl Zásaditá violeť 1
<b>Používaná synonyma</b>	Methylová violeť 10B Genciánová violeť Zásaditá violeť 3 Anilinová violeť	Methylová violeť 2B
<b>Molární hmotnost</b>	407,99	393,96
<b>Index barevnosti (Colour Index, C.I.)</b>	42 555	42 535
<b>Hustota (při 20 °C)</b>	1,19 g / cm <sup>3</sup>	
<b>Vzhled</b>	tmavě zelený prach či krystaly	modré zelené krystaly
<b>Teplota tání</b>	205 °C	137 °C

Nosiče obsahují hlavně rozpouštědla a pryskyřice. Modifikátory zahrnují různé sloučeniny, které ovlivňují vlastnosti inkoustu, jako jsou viskozita a stálost na světle.

## 2.2 KAPILÁRNÍ ELEKTROMIGRAČNÍ METODY <sup>[6]</sup>

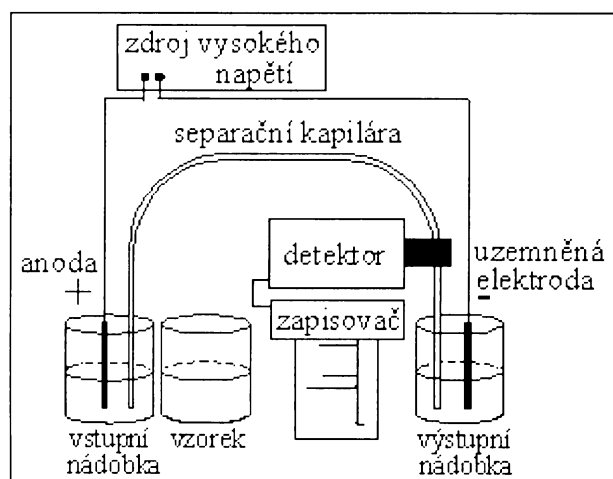
Kapilární elektromigrační separační metody jsou založeny na elektroforetické migraci iontů v elektrickém poli. Vlastní analýza je prováděna v kapiláře o velmi malém vnitřním průměru několika desítek mikrometrů. Nejpoužívanějšími kapilárami jsou kapiláry křemenné.

Výhodami kapilárních elektromigračních metod je malá spotřeba vzorku a velká účinnost separace. Naproti tomu nevýhodou ve srovnání s ostatními separačními technikami, např. chromatografií, bývá menší reprodukovatelnost a nižší citlivost.

Zapojení přístroje pro kapilární elektroforézu je zobrazeno na obr. 3.

Mezi kapilární elektromigrační separační metody řadíme tyto techniky:

1. Kapilární zónová elektroforéza (CZE)
2. Kapilární gelová elektroforéza (CGE)
3. Micelární elektrokinetická kapilární chromatografie (MEKC, MECC)
4. Elektrochromatografie v naplněných kapilárách (EC, CEC)
5. Kapilární izoelektrické fokusování (CIEF, IEF)
6. Kapilární izotachoforéza (CITP, ITP)



Obr. 3. Zapojení přístroje pro kapilární elektroforézu <sup>[7]</sup>

### 2.2.1 Kapilární zónová elektroforéza (CZE)

Metoda kapilární zónové elektroforézy využívá dvou transportních jevů: elektroforetické migrace iontů a elektroosmotického toku kapaliny kapilárou, na které je vloženo vysoké napětí.

#### *Elektroforetická migrace*

Elektroforetická migrace (rychlost) je pohyb iontů v elektrickém poli vlivem elektrostatického přitahování elektrického náboje k opačně nabitě elektrodě. Ionť putující k opačně nabitě elektrodě je v poli obklopen iontovou sférou tvořenou opačně nabitým iontem a molekulou vody.

Elektroforetická rychlost  $i$ -tého iontu  $v_{ef,i}$  ( $\text{m s}^{-1}$ ) je konstantní a je přímo úměrná intenzitě elektrického pole  $E$  ( $\text{V m}^{-1}$ ) a elektroforetické pohyblivosti  $\mu_{ef,i}$  ( $\text{m}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$ )

$$v_{ef,i} = \mu_{ef,i} \cdot E \quad (1)$$

Intenzitu elektrického pole uvnitř separační kapiláry lze vyjádřit jako podíl napětí  $U$  (V) vloženého mezi elektrody a celkové délky kapiláry  $L_c$  (m)

$$E = \frac{U}{L_c} \quad (2)$$

Různé ionty, s různými poloměry, nesoucí různý náboj, mají v homogenním elektrickém poli různé elektroforetické pohyblivosti.

Elektroforetická pohyblivost je přímo úměrná celkovému náboji iontu  $Q_i$  (C) a nepřímo úměrná poloměru iontu  $r_i$  a dynamické viskozitě prostředí  $\eta$  ( $\text{kg m}^{-1} \text{s}^{-1}$ )

$$\mu_{ef,i} = \frac{Q_i}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r_i} \quad (3)$$

Elektroforetické pohyblivosti mají v jednotkách  $\text{cm}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$  řádovou hodnotu  $10^{-4}$ . Pro kationty nabývají kladných hodnot a pro anionty záporných.

### *Elektroosmotický tok (EOF)*

Elektroosmotický tok je měřitelný tok roztoku nosného elektrolytu křemennou kapilárou vlivem elektrického pole, které je vytvořeno vložением napětí. EOF transportuje všechny komponenty vzorku a nepřispívá k jejich separaci.

Po naplnění křemenné kapiláry vhodným elektrolytem dochází na její vnitřní straně k hydrolyze siloxanových skupin ( $\equiv\text{Si}-\text{O}-\text{Si}\equiv$ ) za vzniku silanolových skupin ( $\equiv\text{Si}-\text{OH}$ ) a jejich následné disociaci. Tímto způsobem získává vnitřní povrch kapiláry negativní náboj a pokrývá disociovanými křemičitanovými skupinami ( $\equiv\text{Si}-\text{O}^-$ ). Protony, které jsou uvolňovány vytvářejí v roztoku kladně nabitou vrstvu, která přiléhá k vnitřní straně kapiláry. Po vložení elektrického napětí mezi elektrody se na jejich koncích pohybují hydratované vodíkové ionty směrem ke katodě, čímž vzniká elektroosmotický tok. Jeho rychlost  $v_{eof}$  ( $\text{m s}^{-1}$ ) je přímo úměrná intenzitě elektrického pole  $E$  ( $\text{V m}^{-1}$ ) a přes elektroforetickou pohyblivost  $\mu_{eof}$  ( $\text{m}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$ ) závisí na velikosti negativního náboje, který se vytvořil na vnitřní stěně kapiláry disociací silanolových skupin.

$$v_{eof,i} = E \cdot \mu_{eof,i} \quad (4)$$

Čím je vyšší pH elektrolytu, tím větší negativní náboj je rozprostřen po vnitřní stěně kapiláry a tím je rychlejší elektroosmotický tok.

Záznamem závislosti absorbance analytu na jeho migračním čase je elektroferogram, ze kterého lze odečíst počet separovaných zón analytů, které prošly detektorem. Poskytuje jak kvalitativní tak kvantitativní informaci.

Kvalitativní informaci je poloha píku, kterou udává migrační čas analytu  $t_{mig,i}$  (min) a z jehož hodnoty, hodnoty migračního času neutrální látky  $t_{eof}$  (min) a znalosti celkové délky separační kolony  $L_C$  (m), délky separační kolony od vstupního konce

k detekčnímu okénku  $L_D$  (m) a hodnoty vloženého napětí  $U$  (V) lze podle vztahu (5) vypočítat elektroforetickou pohyblivost dané látky  $i$ .

Elektroforetická pohyblivost je pro kationty a anionty specifickou vlastností, z jejíž experimentálních hodnot lze daný iont částečně identifikovat. Závisí však na mnoha experimentálních podmínkách, jako je teplota, viskozita, iontová síla či pH separačního pufru, a tak je identifikace na základě porovnání se standardní látkou možná pouze tehdy, jsou-li podmínky obou měření stejné.

Kvantitativní informací je poloha píku analytu, jejímž častým využitím jsou metody měření kalibračních přímek.

$$\mu_{ef,i} = \left( \frac{1}{t_{mig,i}} - \frac{1}{t_{cot}} \right) \cdot \frac{L_c \cdot L_D}{U} \quad (5)$$

## 2.2.2 Micelární elektokinetická kapilární chromatografie (MEKC, MECC)

Tato metoda je vhodná pro analýzu neutrálních molekul, a to jak v hydrofobní, tak hydrofilní povahy. Nabité částice jsou solvatovány v micelách, které vznikají v separačním pufru po přidání vhodné povrchově aktivní látky (tenzidu). Nejčastěji bývá využíván aniontový tenzid tvořený dodecylsíránem sodným (SDS, sodim dodecyl sulfát), jehož molekulu tvoří dlouhý hydrofobní uhlíkatý řetězec zakončený disociovatelnou sulfátovou skupinou, která je hydrofilní. SDS po přidání do roztoku začne tvořit kulovité útvary zvané micely, čímž vytvoří micelární fázi.

Micela může být vytvořena buď v hydrofilním prostředí, její povrch tvořený disociovanými síranovými skupinami má pak polární charakter a nepolární řetězce tvoří hydrofobní dutinu; nebo může být SDS rozpuštěno v nepolárním rozpouštědle a vzniká tak micela s hydrofobním povrchem a hydrofilní dutinou.

Pokud jsou hydrofobní dutiny micel SDS vytvořeny ve vodném pufru, jsou schopny do sebe pojmout molekuly nepolární, tím dochází k jejich solvataci nebo rozpuštění v mobilní fázi. V tomto systému budou neutrální molekuly tím více rozpuštěny v polární fázi, čím více jsou polární a čím jsou méně polární tím více budou rozpuštěny

v micelách. Neutrální analyt je tedy rozdělen částečně mezi vodnou a micelární fázi a separační mechanismus je založen na rozdílné distribuci analytu mezi fázemi.

## **2.3 METODY ANALÝZY INKOUSTŮ** <sup>[1], [2], [8]</sup>

### **2.3.1 Vizuelní metody**

Nejstaršími metodami analýzy inkoustů jsou metody vizuelní a pozorování v ultrafialovém a infračerveném světle.

Před rokem 1950 byl k analýze poskytován celý vzorek, protože soudy odmítaly jakoukoliv destrukci vzorku. K analýze inkoustů se používaly například fotografie s různě barevnými filtry, mikrospektrofotometrie či viditelná a infračervená luminiscence. Nejčastějším vizuelním analýzám byla podrobována pera plnicí a studovala se jejich rozpustnost a difúze chloridových iontů po zviditelnění dusičnanem stříbrným.

Většina těchto metod je stále využívána a slouží především k orientačním stanovením, avšak s rozvojem uznání semidestruktivních metod a nároků na minimální spotřebu vzorku dochází k využívání metod separačních.

### **2.3.2 Separační metody**

Mezi separační techniky využívané k analýze inkoustů patří řada chromatografických technik, jako je papírová chromatografie, tenkovrstvá chromatografie, plynová chromatografie či vysokoúčinná kapalinové chromatografie, ale také metody elektromigrační, především kapilární elektroforéza.

#### **Papírová chromatografie**

První pokusy o analýzu inkoustů papírovou chromatografií (PC) jsou zaznamenány v polovině padesátých let minulého století. Tato snaha byla řízena zvýšenou výrobou inkoustů založených na organických barvách, které jsou v chromatografii snadno

oddělitelné. Dříveji byla barviva založena na gallitanu železitém a nebylo je možno takto dělit.

V roce 1989 byla PC navržena [9] jako metoda vhodná pro malé soudní laboratoře, protože je velmi levná, nevzniká při ní velké množství odpadů a nevyžaduje speciální instrumentaci.

## **Tenkovrstvá chromatografie**

Chromatografie na tenké vrstvě (TLC) se začínala rozmáhat v polovině šedesátých let minulého století a pozvolna vytlačovala chromatografii papírovou. Rozvoj byl dán větší dostupností tenkých vrstev na bázi silikagelu a celulosy a vyšší separační účinností této metody.

Brunelle [10] popisuje dva systémy mobilních fází vhodných k analýze inkoustů. Jedním ze systémů je ethylacetát – ethanol – voda (70:35:30) a druhým butanol – ethanol – voda (50:10:15).

Další standardní metody, které byly navrženy [11], využily také silikagel a celulosu a jako mobilní fázi opět dva systémy: butanol – izopropanol – voda (2:1:1) a butanol – ethanol – 10 % roztok kyseliny šťavelové (50:10:15).

Postupem času dochází ke zdokonalování TLC technik. Významným pokrokem je snížení množství potřebného vzorku, dále se zvyšuje účinnost separace podobných látek a jsou vytvářeny standardní postupy pro vyšší reprodukovatelnost analýzy a možnost přenosu výsledků mezi laboratořemi.

Kvalitnějšího rozlišení je dosahováno ve vysokoúčinné tenkovrstvé chromatografii (HPTLC). V tomto provedení jsou částice stacionární fáze menší a homogennější než v chromatografii tenkovrstvé, mobilní fáze se pohybuje stejně jako u klasické vysokoúčinné kapalinové chromatografie pod tlakem. K vyhodnocení se používají densitometry. Tuto metodu pro různá barviva i druhy inkoustů optimalizoval Tappolet [12].



## **Vysokoúčinná kapalinová chromatografie**

Metoda TLC má velmi široké využití pro analýzu inkoustů a to díky snadnému provedení a nízké ceně. Má však pouze semikvantitativní charakter a proto je nahrazována metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC).

První aplikaci HPLC pro kuličková pera popsal Lyter [13]. Rozdělil deset inkoustů kuličkových per v TLC nerozeznatelných. Rozlišil též i stejné inkousty různých šarží. Využíval kolonu s oktadecylovou stacionární fází a jako mobilní fází systém acetonitril – voda (80:20).

White a Wheals [14] využili pro inkousty kuličkových per otáčivý diskový detektor, který byl schopen proměřit čtyři vlnové délky současně, a tak získali další důležité informace. Testovali tři reverzní stacionární fáze a našli optimální složení mobilní fáze (acetonitril – tetrahydrofuran – voda (924:432:644)).

V roce 1993 Lofgren a Andrasko [15] použili rovněž reverzní systém, ve spojení s třemi detektory zapojenými v sérii, a to ultrafialovým, fluorescenčním a viditelným. Zabývali se také využitím extrakce rozpouštědly pro odběr vzorku z papíru.

## **Plynová chromatografie**

Plynová chromatografie (GC) se využívá především k analýze těkavých složek inkoustu, tedy rozpouštědel. Je to metoda velmi rychlá a s vysokou účinností. Smyslem těchto analýz je jejich využití při datování stáří dokumentů.

## **Kapilární elektroforéza**

Kapilární elektroforéza (CE) nachází mnoho aplikací ve forenzních vědách vzhledem ke svým výhodám, kterými jsou vysoké rozlišení, krátká doba analýzy, nízká spotřeba vzorku a možnost kvantifikace.

V roce 1991 publikovali Fanali a Schudel [16] první CE analýzu inkoustů. Metodu aplikovali na inkousty černé a červené. Tsutsumi a Ohga [17] použili CE k analýze 6 černých a 20 barevných kuličkových per a podařilo se jim odlišit inkousty od různých výrobců. Rhode a spol. [18] obdrželi separaci až na základní linii pro složky řady inkoustů. Předběžné výsledky analýzy inkoustů z kuličkových per uvádí Zlotnick a

Smith [19], kteří použili CE pro analýzu 10 tekutých černých inkoustů kuličkových per. Vogt [20] se zaměřil na oddělení složek komerčně dostupných originálních plnicích per, které byly aplikovány na různých papírových substrátech. Jejich vzorky inkoustů pocházely od různých výrobců z různých zemí a byly separovány v borátovém pufru s různým zastoupením methanolu. Výsledné elektroferogramy vykazovaly zřetelně odlišné látky. Inkousty extrahované z papíru byly porovnány s originálními vzorky inkoustů na základě spekter hlavních a stopových složek. Byl použit jak UV/VIS spektrofotometrický detektor, tak fluorescenční detektor při různé excitační a emisní vlnové délce. V roce 1998 Vogt a spol. [21] použili CE pro analýzu ve vodě rozpustných plnicích per. Zabývali se vývojem elektroforetických separačních metod a optimalizovali techniky pro extrakci inkoustů z papíru. Výsledkem jejich práce je separace 17 modrých a černých inkoustů od různých výrobců z různých zemí původu. Jako optimální podmínky pro separaci uvádějí  $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  borátový pufr o pH 8,0 s obsahem 20 % methanolu. Pro vyhodnocení použili UV/VIS detektor a fluorescenční detektor s indukcí laserem. Vogt a spol. se v další práci [22] zabývali i dalšími aplikacemi pro analýzu inkoustů a konstatovali, že inkousty kuličkových per se liší od klasického inkoustu horší rozpustností ve vodě a nižším obsahem složek, a proto jsou hůře identifikovatelné. Rozdělili dvacet vzorků a provedli identifikaci složek, zejména barviv a pryskyřic. Měření bylo provedeno metodou CE s fluorescenčním detektorem s indukcí laserem. Nejlepších výsledků bylo dosaženo v systému  $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  borátového pufru o pH 9,0 s 50 % methanolu.

Pro soudní účely byla v roce 2005 [23][24] navržena metoda CE s UV/VIS a fluorescenčním detektorem s indukcí laserem (190 – 600 nm). Pro analýzu černých i modrých inkoustů kuličkových per byly použity dva systémy pufrů a výsledky měření porovnány s TLC metodou. Hodnocena byla citlivost a účinnost metody. Barevné složky byly separovány v krátkém čase a identifikace byla založena na srovnání hodnot elektroforetických pohyblivostí ve spektru s jednotlivými barevnými standardy.

V roce 1997 [25] byly inkousty analyzovány také metodou micelární elektrokinetickou kapilární chromatografií (MEKC). Velmi dobrých výsledků bylo dosaženo pro čtyřicet barviv rozdílného původu použitím pufru o složení  $15 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  3-amino-1-propanol,  $7,5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  HCl pufru s  $60 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  SDS a  $0,5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  Brij-35 o pH 10,0 s přidavkem 30 % acetonitrilu jako organického modifikátoru. Metoda byla úspěšně aplikována na více než padesát druhů psacích i tiskařských

inkoustů různých barev, extrahovaných z papíru. Pro 27 modrých a černých kuličkových per byl výsledek separace porovnán s výsledky TLC a HPLC. Separace metodou MEKC byla vždy účinnější.

### **2.3.3 Přímá hmotnostní spektrometrie**

Využití přímé hmotnostní spektrometrie (MS) bez separace popisuje Grim [26]. K identifikaci náplně per a určení jejich stáří byla využita laserová desorpční fotoionizace. Zabývá se aplikacemi pro ink-jetové tiskárny a studuje methylovou violet, kterou obsahují. V další práci [27] se věnuje stárnutí inkoustů v kuličkových perech a to jak v uzavřeném systému, tak pro vzorek nanesený na papíře. Minimální změny ve složení s časem vykazují systémy uzavřené. Práce z roku 2003 [28] je věnována nedestruktivní analýze uměleckých barviv a rozlišení dvou komerčních barviv pomocí laserové desorpční hmotnostní spektrometrie (LDMS).

### 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

#### 3.1 CHEMIKÁLIE

krystalová violet (Merck KGaA, Německo)  
methylová violet (Merck KGaA, Německo)  
methanol (Sigma-Aldrich s.r.o., ČR)  
tetraboritan disodný (dekahydrát, p.a., Lachema, ČR)  
thiomočovina (p.a., Lachema, ČR)  
hydroxid sodný (p.a., Lach-Ner s.r.o., ČR)  
kyselina chlorovodíková ( 35 % p.a., Lach-Ner s.r.o., ČR)  
kyselina boritá (p.a., Lach-Ner s.r.o., ČR)  
kyselina octová (98 %, p.a., Lach-Ner s.r.o., ČR)  
kyselina fosforečná (80 %, Lachema n.p. Brno, ČR)

#### 3.2 PŘÍPRAVA ROZTOKŮ

##### *Příprava pufru*

Tetraboritanový  $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  pufr byl připraven rozpuštěním 381,4 mg dekahydrátu tetraboritanu sodného ve 100 ml vody. Jeho přirozené pH je 9,3. Pro úpravu pH na 10,7 byl použit  $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  hydroxid sodný.

Britton-Robinsonův kyselý pufr pro stanovení disociačních konstant byl připraven z 2,744 g  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 2,7 ml  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (80 %,  $\rho = 1,71 \text{ g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ), 2,31 ml  $\text{CH}_3\text{COOH}$  (98 %,  $\rho = 1,06 \text{ g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ) doplněním deionizovanou vodou na objem 1 L. Různé hodnoty pH byly připravené přidáváním  $0,2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  roztoku hydroxidu sodného (připraven rozpuštěním 4g NaOH v 500 ml deionizované vody).

## *Příprava vzorku*

Vzorky pro měření disociační konstanty byly připraveny z roztoků standardu krystalové violeti ( $4,31 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) a methylové violeti ( $3,55 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ), ze kterých byla ředěním a doplněním kyselým Britton-Robinsonovým pufrům vytvořena sada roztoků v rozmezí pH 1.8 až 13. Výsledná koncentrace ve vzorcích byla pro krystalovou violeť  $1,73 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  a pro methylovou violeť  $1,42 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ .

Vzorky pro zjištění vlivu přídavku organického modifikátoru do roztoku elektrolytu byly rozpuštěny v methanolu a doplněny do celého objemu vialky  $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  tetraboritanovým pufrům o pH 10,7.

Kalibrační řada pro kvantifikaci byla připravena ředěním standardního roztoku o nejvyšší koncentraci, připraveného rozpuštěním 4,12 mg krystalové violeti (CV), nebo 1,97 mg methylové violeti (MV) v 20 ml methanolu a doplněním do objemu 100 ml  $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  tetraboritanovým pufrům o pH 9,3. Výsledná koncentrace byla  $1 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ .

## **Postup při CE měření**

Před analýzou byla každý den kapilára promývána 10 min  $0,1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  hydroxidem sodným, 10 min deionizovanou vodou a 10 min  $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  kyselinou chlorovodíkovou. Vše pod tlakem 1000 mbar.

Poté následovalo měření, které se sestávalo z 3 min promývání methanolem, 5 min deionizovanou vodou, 5 min  $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  hydroxidem sodným a 5 min deionizovanou vodou pod tlakem 1000 mbar, které bylo prováděno mezi jednotlivými analýzami a následným 5 min promytím elektrolytem za tlaku 1000 mbar, dávkování vzorku pod tlakem 20 mbar po 5 s a vlastní analýzy při napětí 30 kV.

### 3.2 POUŽITÉ PŘÍSTROJE

Byly použity předvážky TUNING-FORK VIBRATION GC-600c (SCHINKO, Japonsko) a analytické vahy Precisa 262 SMA-FR (Precisa Instrument AG – Dietikon, Švýcarsko).

Pro měření pH pufru byl použit pH metr JENWAY 4330 Conductivity & pH Meter (JENWAY Ltd., Velká Británie) s kombinovanou skleněnou elektrodou JENWAY. Pro přípravu vzorků k měření disociační konstanty byl použit laboratorní pH metr pHM 82 (Radiometer, Dánsko) s kombinovanou skleněnou elektrodou.

K zjištění optimální vlnové délky byl použit spektrofotometr HP 8453 (HEWLETT PACKARD, USA) s 1 cm křemennými kyvetami.

Pro zjištění disociačních konstant byl použit spektrofotometr Pye-Unicam PU 8800 (Philips-Unicam, Velké Británie), připojený k řídicímu počítači a ovládaný softwarem (Labview, National Instruments, USA), se skleněnými kyvetami s tloušťkou absorpční vrstvy 1 cm.

K měření byla použita kapilární elektroforéza, PrinCE 250 (PrinCE Technologies B.V., Nizozemsko) s UV/VIS spektrofotometrickým detektorem Spectra 100 (Thermo Separation Products, USA). Pro separaci byly použity dvě křemenné kapiláry firmy CACO s.r.o. (Slovensko) s vnitřním průměrem 75  $\mu\text{m}$  a vnějším průměrem 380  $\mu\text{m}$ . První o celkové délce  $L_C$  70 cm a délce k detekčnímu okénku  $L_D$  59 cm, druhá s  $L_C = 70$  cm a  $L_D = 58,9$  cm.

Data byla zpracována programem Clarity verze 2.4.4.139 (DataApex, Česká Republika) a programy Microsoft Excel a Origin® v6.1052 (Original Lab Corporation, USA).

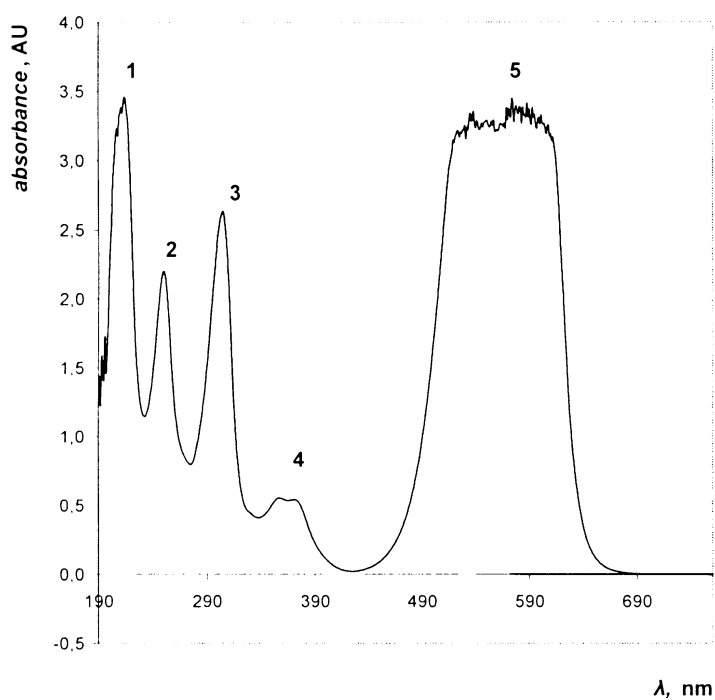
## 4. VÝSLEDKY A DISKUZE

### 4.1 VOLBA DETEKCE

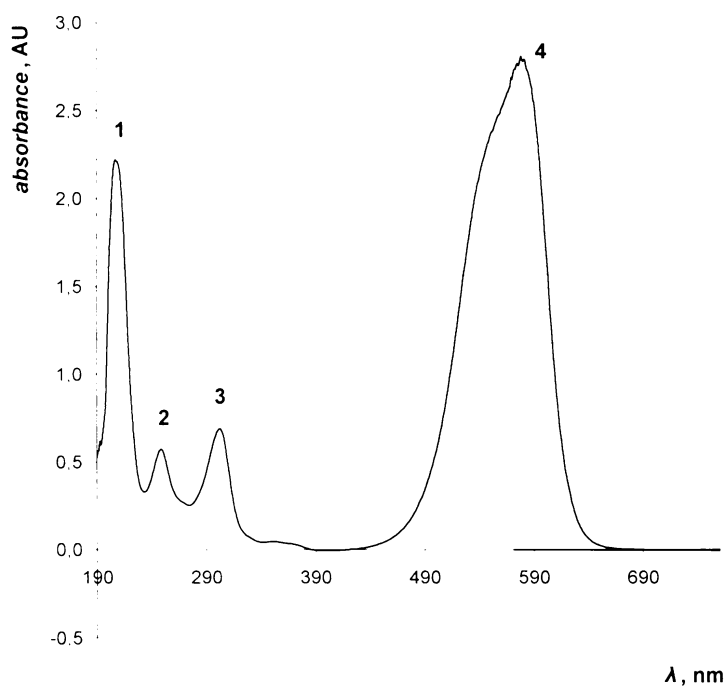
#### 4.1.1 Zjištění optimální vlnové délky

Optimální vlnová délka pro detekci krystalové a methylové violeti byla zjišťována pro vzorky rozpuštěné v methanolu v rozsahu vlnových délek 190 – 760 nm (měřeno proti methanolu).

Závislosti absorbance na vlnové délce vykazovaly pro obě barviva více maxim a to 4 pro krystalovou, 3 pro methylovou violet' v ultrafialové a jedno ve viditelné oblasti (viz obr. 4 a 5). Přehled maxim vlnových délek udává tabulka 3.



Obr. 4. Závislost absorbance krystalové violeti na vlnové délce.



Obr. 5. Závislost absorbance methylové violeti na vlnové délce.

I přes to, že se obě látky absorbují nejvíce ve viditelné oblasti, byla pro měření metodou kapilární elektroforézy vybrána vlnová délka 214 nm v ultrafialové oblasti. Důvodem je vybavení detektoru pouze UV lampou.

Tabulka 3. Vlnové délky odpovídající lokálním absorpčním maximům pro krystalovou a methylovou violet.

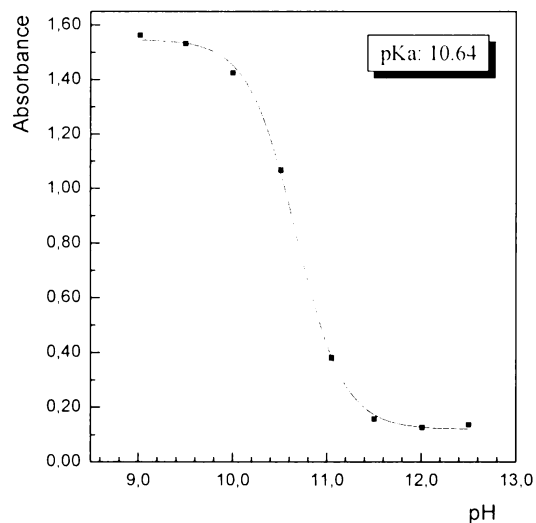
Lokální maximum	$\lambda_{max}, nm$	
	CV	MV
1	214	207
2	250	249
3	305	302
4	357	578
5	574	

#### 4.1.2 Určení disociačních konstant

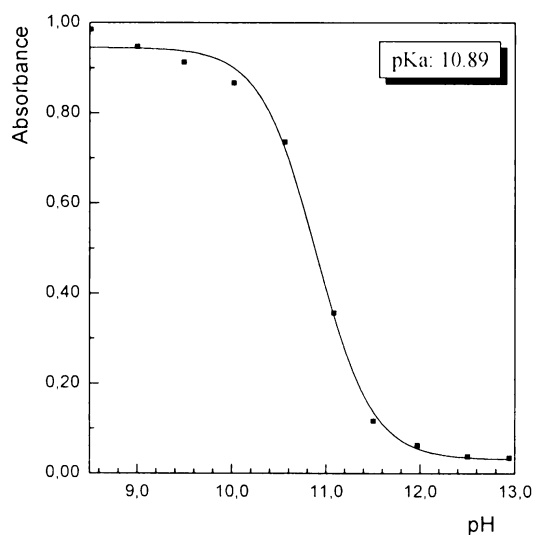
Stanovení disociačních konstant bylo provedeno z důvodů nalezení optimální hodnoty pH separačního elektrolytu. U připravených roztoků byly proměřeny spektra ve



viditelné oblasti 400 až 700 nm. Ze získaných hodnot byly a v programu Origin® v6.1052 sestaveny sigmoidní křivky závislosti absorbance na pH v (obr. 6 a 7) a vypočteny hodnoty disociačních konstant, které odpovídaly pH v inflexním bodě (viz tab. 4).



Obr. 6. Závislost absorbance krystalové violeti na pH. Měřeno ve viditelné oblasti 400 – 700 nm.



Obr. 7. Závislost absorbance methylové violeti na pH. Měřeno ve viditelné oblasti 400 – 700 nm.

Tabulka 4. Hodnoty disociačních konstant.

Látka	pKa
Krystalová violet'	10,64 ± 0,04
Methylová violet'	10,89 ± 0,04

## 4.2 OPTIMALIZACE SEPARAČNÍCH PODMÍNEK

### 4.2.1 Volba pufru

Oba studované analyty patří mezi kationtová barviva s podobnou velikostí a nábojem, což značně omezuje možnost separace. Aby separace mohla být uskutečněna, bylo zapotřebí jednu z těchto vlastností změnit. Změnu velikosti nebylo možno uskutečnit díky obtížné substituci a proto byla vybrána změna volby náboje uskutečněná správným výběrem pH elektrolytu. Optimální hodnota pH 10,7 separačního pufru byla zvolena v rozmezí hodnot disociačních konstant obou látek.

Při volbě separačního pufru se vycházelo z publikovaných prací, které využívají tetraboritanový pufr [20], [21], [22]. V této práci byl jako základní elektrolyt vybrán 10 mmol · L<sup>-1</sup> tetraboritanový pufr a to pro svou snadnou dostupnost a dostatečnou vodivost vhodnou k urychlení elektroosmotického toku kapilárou. Další výhodou je jeho použitelnost v široké oblasti pH. Při vyšší koncentraci může způsobovat vysoké proudy v kapiláře, které mohou ovlivnit celé měření.

### 4.2.2 Vliv přídavku organického modifikátoru do roztoku elektrolytu

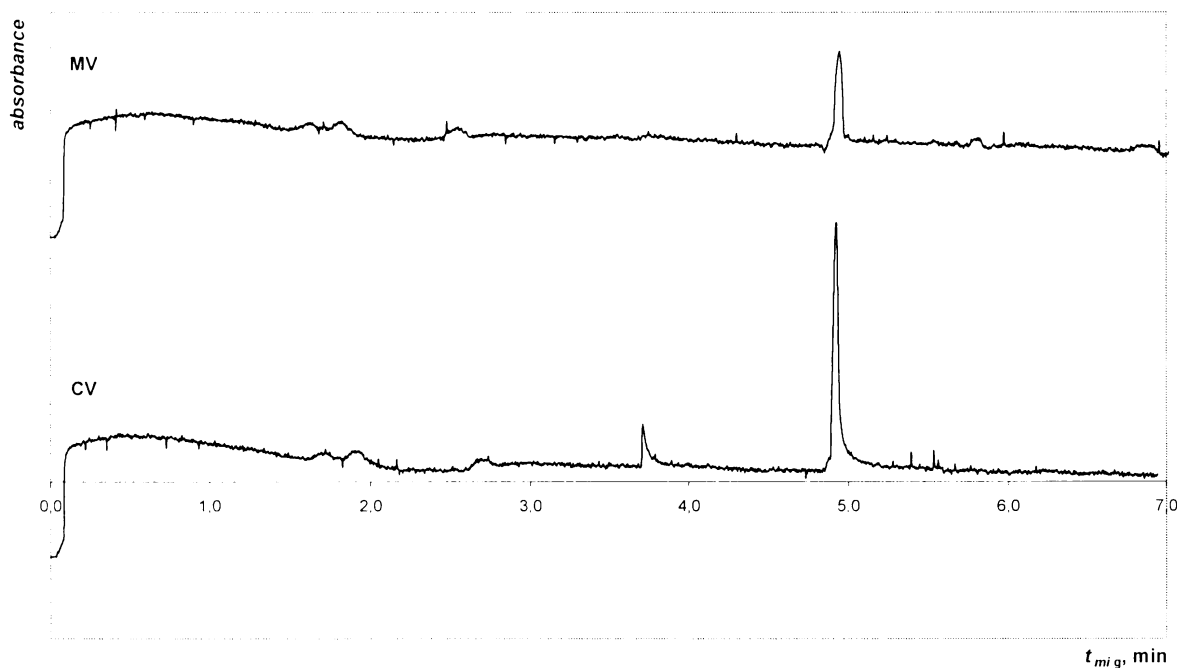
Toto měření bylo provedeno za účelem zjištění nejvhodnějšího elektrolytu pro další použití. Organickým modifikátorem byl methanol, který byl do roztoku 10 mmol · L<sup>-1</sup> tetraboritanového pufru o pH 10,7 přidáván v množství 0, 5, 10, 15, 20 a 25 %.

Ze získaných hodnot migračních časů analytu a migračního času elektroneutrální látky byly vypočteny elektroforetické pohyblivosti podle vztahu (5). Jejich přehled je v tabulce 5.

Tabulka 5. Migrační časy a efektivní elektroforetické pohyblivosti krystalové a methylové violeti v závislosti na obsahu methanolu v  $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  tetraboritanovém pufru o pH 10,7. ( $U = 30 \text{ kV}$ , hydrodynamické dávkování  $40 \text{ mbar}$  po  $5 \text{ s}$ , teplota laboratorní,  $L_C = 70 \text{ cm}$ ,  $L_D = 59 \text{ cm}$ , detekce při  $214 \text{ nm}$ ).

Methanol %	Krystalová violet'		Methylová violet'	
	$t_{\text{mig}}$ , min	$\mu_{\text{eff}}$ , $10^{-5} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$	$t_{\text{mig}}$ , min	$\mu_{\text{eff}}$ , $10^{-5} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$
0	2,614	-1,870	2,638	-2,623
5	3,137	-2,767	3,009	0,328
10	3,398	1,684	3,391	16,938
15	4,066	3,828	4,175	1,482
20	4,916	1,885	4,900	1,284
25	5,718	0,046	5,723	0,011

U obou změřených látek byly zjištěny velmi podobné migrační časy. Látky tedy za těchto podmínek není možné oddělit. Také změna pH nevedla k separaci CV a MV. Záznam analýzy obou látek v elektrolytu  $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  tetraboritanového pufru o pH 10,7 s 20 % methanolem je na obr. 8.



Obr. 8. Elektroferogram analýzy krystalové a methylové violeti v elektrolytu tvořeném  $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  tetraboritanovým pufrům o pH 10,7 s 20 % methanolu. Detekce 214 nm,  $U = 30 \text{ kV}$ , hydrodynamické dávkování 40 mbar po 5 s, teplota laboratorní.

#### 4.3 KVANTIFIKACE STANDARDŮ

Kvantifikace byla provedena jak pro krystalovou, tak pro methylovou violeť pro rozsah koncentrací  $1 \times 10^{-4}$  až  $1 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ . Pro obě látky byl použit  $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  tetraboritanový pufr o pH 9,3. Některé hodnoty mezi detekce a stanovitelnosti pro CV a MV nabývaly záporných hodnot a proto bylo měření opakováno s elektrolytem  $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  tetraboritanový pufr o pH 9,3 s 20 % methanolu, který byl při studiu množství organického modifikátoru v elektrolytu zvolen jako optimální se symetrickými píky a velmi malým šumem základní linie. Z naměřených hodnot pro methylovou violeť byly sestaveny závislosti plochy píku (obr. 9.) a výšky píku na koncentraci analytu (obr. 10.). Kvantifikace krystalové violeti s novým elektrolytem již nebyla z časových důvodů možná a proto nelze hodnoty porovnávat.

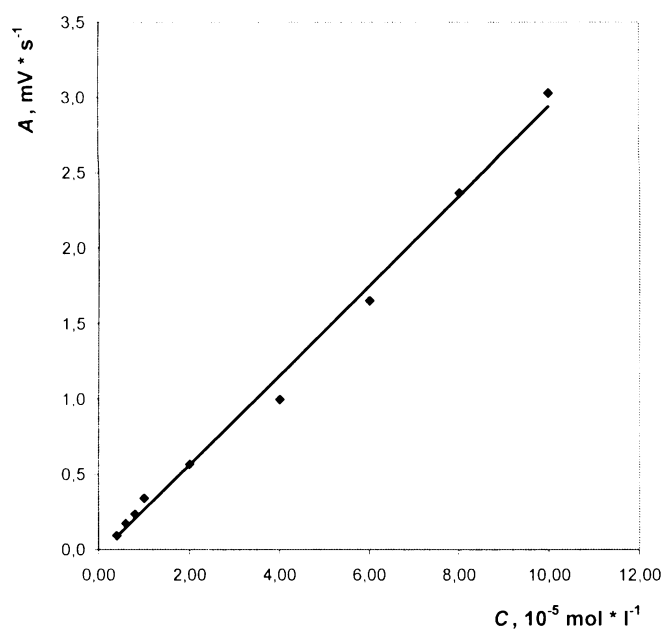
Vzhledem k tomu, že během měření vlivu organického modifikátoru v separačním elektrolytu došlo k ucpání kapiláry, byla pro další analýzy vyměněna za novou kapiláru

stejného typu s celkovou délkou  $L_C$  70 cm a délkou od vstupního konce k detekčnímu okénku  $L_D$  58,9 cm.

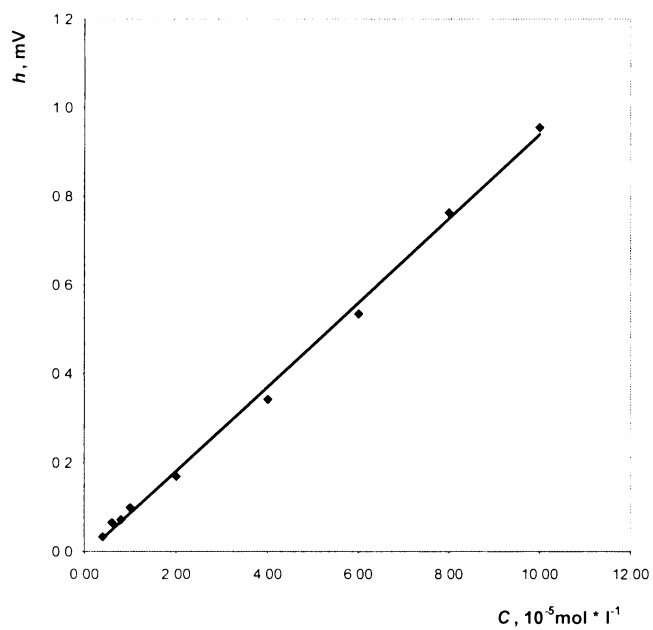
Každý vzorek byl proměřen čtyřikrát a zpracovávány byly jejich průměrné hodnoty. Ze závislosti plochy píku na koncentraci analytu byla vypočtena regresní rovnice a korelační koeficient. Mez detekce LOD a mez stanovitelnosti LOQ byly vypočteny jako trojnásobek a desetinásobek šumu  $\sigma$ . Šum byl vypočten jako směrodatná odchylka od základní linie. Přehled výsledků je znázorněn v tabulce 6.

Tabulka 6. Parametry regresních křivek ze závislosti plochy píku na koncentraci analytu s vypočtenými LOD a LOQ pro krystalovou violet v elektrolytu  $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  tetraboritanového pufru o pH 9,3 a methylovou violet v elektrolytu  $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  tetraboritanového pufru o pH 9,3 a  $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  tetraboritanového pufru o pH 9,3 s 20 % methanolu.

Elektrolyt	Analyt	Regresní rovnice	Korelační koeficient	LOD $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	LOQ $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$
0 % MeOH	CV	$y = 0,2165x + 0,0057$	0.9647	$5,54 \times 10^{-7}$	$2,46 \times 10^{-6}$
20 % MeOH	MV	$y = 0,2969x - 0,0318$	0.9944	$1,67 \times 10^{-6}$	$3,06 \times 10^{-6}$



Obr. 9. Závislost plochy píku methylové violeti na koncentraci analytu. Detekce při 214 nm,  $U = 30 \text{ kV}$ , hydrodynamické dávkování 40 mbar po 5 s. Elektrolytem byl  $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  tetraboritanový pufr o pH 9,3 s 20 % methanolu.



Obr. 10. Závislost výšky píku methylové violeti na koncentraci analytu. Detekce 214 nm,  $U = 30 \text{ kV}$ , hydrodynamické dávkování 40 mbar po 5 s. Elektrolytem byl  $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  tetraboritanový pufr o pH 9,3 s 20 % methanolu.

## 5 ZÁVĚR

Tato práce je zaměřena na hledání vhodných podmínek pro identifikaci a kvantifikaci inkoustů kuličkový per. Nejprve byla provedena studie dostupných publikovaných materiálů o již známých metodách využitých k analýze inkoustů.

Pro měření byla nalezena vhodná detekční vlnová délka, a to jak v ultrafialové, tak ve viditelné oblasti. Přes to, že ve viditelné oblasti je absorbance obou látek vyšší, byla z technických důvodů všechna měření provedena v oblasti ultrafialové.

Pro zjištění optimálního pH separačního pufru byly proměřeny disociační konstanty obou látek. Výsledné hodnoty jsou však velmi podobné (krystalová violet 10,64; methylová violet 10,89), což značně ztěžuje separaci.

Hodnota pH 10,7 byla použita pro zjištění vlivu obsahu organického modifikátoru v elektrolytu. V elektrolytu, který obsahoval  $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  tetraboritanového pufru o pH 10,7 s 20 a 25 % methanolu byly píky symetrické a základní linie vykazovala nejnižší šum. Ani při analýze s různým obsahem methanolu nedošlo k rozdělení krystalové a methylové violeti.

Dále byla provedena kvantifikace obou standardů a to v  $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  tetraboritanového pufru o pH 9,3 bez přídavku methanolu. Za těchto podmínek mez detekce LOD vypočtená z plochy píku pro CV byla  $5,54 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  a mez stanovitelnosti LOQ  $2,46 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ . Pro MV byly zjištěny záporné hodnoty. Proto byl použit elektrolyt s 20 % MeOH a v tomto případě byla pro MV hodnota LOD  $1,67 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  a LOQ  $3,06 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ . Pro CV toto měření nebylo uskutečněno z časových důvodů.

V závěru lze tedy dodat, že po optimalizaci podmínek měření bylo možno látky pouze detekovat a kvantifikovat, nikoliv však separovat a poskytnout podmínky měření pro reálné vzorky.



## 6 LITERATURA

1. Fůrbach M., Kokiš P., Pacáková V.: *Analýza psacích past kuličkových per a zjišťování jejich stáří*. Bezpečnostní teorie a praxe, sborník Policejní akademie ČR, Policejní akademie 2004, editor Lukešová A., ISBN 80-7251-144-0, 215 – 225.
2. Fůrbach M.: *Forenzní analýza inkoustů kuličkových per a zjišťování jejich stáří*. Diplomová práce. PřF UK v Praze, Katedra analytické chemie 2003.
3. Material Safety Data Sheet.: *Safety data for crystal violet*. Dostupné z URL: <[http://physchem.ox.ac.uk/MSDS/CR/crystal\\_violet.html](http://physchem.ox.ac.uk/MSDS/CR/crystal_violet.html)> [cit. 13.8.2007].
4. University of South Carolina, USA: *Department of Chemistry and Physics*. Dostupné z URL: <<http://www.usca.edu/chemistry/spectra/crsviol.htm>> [cit. 13.8.2007].
5. Material Safety Data Sheet.: *Methyl violet*. Dostupné z URL: <<http://www.jtbaker.com/msds/englishhtml/m7673.htm>> [cit. 13.8.2007].
6. Bosáková Z., Coufal P., Jelínek I., Pacáková V., Ševčík J., Štulík K.: *Analytické separační metody*. Skriptum Univerzity Karlovy v Praze. dotisk 1. vydání. Praha, Nakladatelství karolinum 2005.
7. Coufal, P.: *Capillary Zone Electrophoresis , CZE*. Dostupné z URL: <<http://www.natur.cuni.cz/~pcoufal/>> [cit. 13. 8. 2007].
8. Zlotnick, J. A.; Smith, F. P.: *J. Chromatogr. B* **733**, 265 (1999).
9. Lederer, M.; Schudel, M.: *J. Chromatogr.* **475**, 451 (1989).
10. Brunelle, R. L.; Pro, M. J.: *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **55**, 823 (1972).
11. Kelly, J. D.; Cantu, A. A.: *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **58**, 122 (1975).
12. Tappolet, J. A.: *Forensic Sci. Int.* **22**, 99 (1983).
13. Lyter, A. H.: *J. Forensic Sci.* **27**, 154 (1982).
14. White, P. C.; Wheals, B. B.: *J. Chromatogr.* **303**, 211 (1984).
15. Lofgren, A.; Andrasko, J.: *J. Forensic Sci.* **38**, 1151 (1993).
16. Fanali, S.; Schudel, M.: *J. Forensic Sci.* **36**, 1192 (1991).
17. Tsutsumi, K.; Ohga, K.: *Anal. Sci.* **12**, 997 (1996).
18. Rohde, E.; McManus, A. C.; Vogt, C.; Heineman, W. R., *J. Forensic Sci.* **42**, 1004 (1997).
19. Zlotnick, J. A.; Smith F. P., *Forensic Sci. Int.* **92**, 269 (1998).
20. Vogt, C.; Vogt, J.; Becker, A.; Rohde, E.: *J. Chromatogr. A*, **781**, 391 (1997).

21. Rohde, E.; Vogt, C.; Heineman, W. R.: *Electrophoresis* **19**, 31 (1998).
22. Vogt, C.; Becker, A.; Vogt, J.: *J. Forensic Sci.* **44**, 819 (1999).
23. Egan, J. M.; Hagan, K. A.; Brewer, J. D.: *Forensic Sci. Commun.* **7** (2005). *Forensic Analysis of Black Ballpoint Pen Inks Using Capillary Electrophoresis*.  
Dostupné z URL:  
<[www.fbi.gov/hq/lab/fsc/backissu/july2005/research/2005\\_07\\_research01.htm](http://www.fbi.gov/hq/lab/fsc/backissu/july2005/research/2005_07_research01.htm)>  
[cit. 20.3. 2007]
24. Brewer, J. D.; Hagan, K. A.; Egan, J. M.: *Forensic Sci. Commun.* **7** (2005). *Forensic Analysis of Blue Ballpoint Pen Inks Using Capillary Electrophoresis*.  
Dostupné z URL:  
<[www.fbi.gov/hq/lab/fsc/backissu/july2005/research/2005\\_07\\_research02.htm](http://www.fbi.gov/hq/lab/fsc/backissu/july2005/research/2005_07_research02.htm)>  
[cit. 20.3.2007]
25. Xu, X.; de Koeijer, J. A.; de Moel, J. J. M.; Logtenberg, H.: *Journal Forensic Document Examiners* **3**, 240 (1997).
26. Grim, D. M.; Siegel, J.; Allison J.: *J. Forensic Sci.* **46**, 1411 (2001).
27. Grim, D. M.; Siegel, J.; Allison J.: *J. Forensic Sci.* **47**, 1265 (2002).
28. Grim, D. M.; Allison J.: *J. Forensic Sci.* **222**, 85 (2003).