

Ćwiczenie U4

**Analiza chemiczna materiałów kryjących
ekstrahowanych z papieru
– kryminalistyczne badania dokumentów**

Prowadzący: mgr Małgorzata Szafarska

ELEKTROFOREZA KAPILARNA JAKO NARZĘDZIE W BADANIACH KRYMINALISTYCZNYCH

Michał Woźniakiewicz, Joanna Mania, Małgorzata Szafarska

Wstęp

Elektroforeza kapilarna (CE – Capillary Electrophoresis) jest prawdopodobnie najszybciej rozwijającą się na przestrzeni ostatnich dwudziestu pięciu lat metodą analityczną. Ewoluowała ona wychodząc poza zakres aplikacji typowych dla elektroforezy prowadzonej na żelu czy bibule. Obecnie objęła swym zakresem nie tylko biopolimery, ale również analizy: jonów nieorganicznych, chelatów metali, farmaceutyków i leków (także wyosobnionych z próbek biologicznych), węglowodorów, węglowodanów, kwasów organicznych, amin, polimerów, barwników, itp. – które były domeną chromatografii. Ze względu na swoje zalety i szerokie zastosowania analityczne wzbudziła ona zainteresowanie ekspertów sądowych.

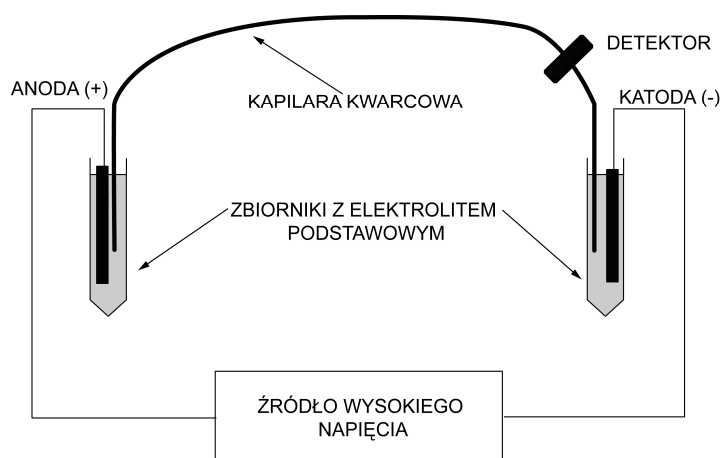
I. Podstawy metody

Metoda analityczna znana jako elektroforeza kapilarna opiera się na zjawisku elektroforezy, czyli migracji w polu elektrycznym cząstek obdarzonych ładunkiem. Rozdział poszczególnych jonów możliwy jest dzięki różnicom w prędkościach z jakimi migrują one wzdłuż kapilary.

Podstawowe elementy aparatury do elektroforezy kapilarnej to:

- kapilara kwarcowa o średnicy wewnętrznej od 20 do 100 μm , długa zwykle na 20-100 cm
- źródło wysokiego napięcia (zwykle do 30 kV, przy prądzie nie przekraczającym 250 μA)
- dwa naczynia na mieszaninę separacyjną (często zwaną buforem separacyjnym – ze względu na swe właściwości buforujące pH lub też elektrolitem podstawowym, ze względu na stałą siłę jonową)
- elektrody platynowe
- system wprowadzania próbki
- detektor (najczęściej spektrofotometryczny, konduktometryczny lub fluorescencyjny. Możliwe jest podłączenie także innych detektorów, w tym spektrometru mas).

System taki pokazany jest schematycznie na rys. 1.



Rys. 1. Schemat aparatury do elektroforezy kapilarnej. W wariacie klasycznym, podczas wprowadzania próbki, zbiornik próbki wprowadzany jest po stronie anody

Najczęściej, w celu wykonania analizy próbka jest wstrzykiwana pod ciśnieniem do kapilary wypełnionej buforem separacyjnym o zasadowym pH od strony anody. Następnie obydwa końce kapilary oraz elektrody podłączone do źródła wysokiego napięcia zanurzone są w buforze separacyjnym. W momencie włączenia prądu, cząstki obdarzone ładunkiem poruszałyby się w kierunku odpowiednich elektrod z prędkością zależną od stosunku ich ładunku do masy. Jednak rozdział składników próbki zachodzi w wyniku istnienia dwóch zjawisk: elektroforezy oraz elektroosmozy. Dzięki drugiemu z wymienionych zjawisk, w trakcie swojej wędrówki wzdłuż kapilary wszystkie jony poruszają się w stronę katody, przechodząc przez okno detektora, gdzie zliczone sygnały są rejestrowane w postaci zależności sygnału detektora od czasu (tzw. elektroforegramu).

Zasada separacji elektroforetycznej oparta jest na różnicy w ruchliwości cząstek poruszających się w polu elektrycznym. Ruchliwość elektroforetyczna cząstki naładowanej μ [$\text{m}^2 \text{s}^{-1} \text{V}$] zdefiniowana jest jako szybkość migracji cząstki v [m s^{-1}] w jednostkowym polu elektrycznym o natężeniu E [V m^{-1}]:

$$\mu = \frac{v}{E} \quad (1)$$

Natężenie pola elektrycznego zależy od zastosowanej różnicy napięć U [V] i od odległości pomiędzy elektrodami, w tym przypadku mierzonej całkowitą długością kapilary L_r [m]:

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

Ruchliwość elektroforetyczna w danym roztworze jest wielkością charakterystyczną dla danego jonu i zależy od jego ładunku q [C], promienia Stokesa¹ tego jonu r [pm] i lepkości ośrodka η [Pa·s]:

$$\mu = \frac{q}{6\pi\eta r} \quad (3)$$

Dobierając odpowiednio skład chemiczny elektrolitu podstawowego możliwe jest kontrolowanie selektywności rozdzielania składników próbki poprzez zmianę ruchliwości poszczególnych analitów. Przykładowo, wzrost stężenia i siły jonowej buforu powoduje zmniejszenie ruchliwości jonów, a dodatek rozpuszczalników organicznych zmienia lepkość roztworu.

Gdyby jedyną siłą oddziałującą na analit było przyłożone pole elektryczne, jedynie cząstki o ładunku dodatnim docierałyby do katody umieszczonej na wyjściu, obojętne zostałyby na miejscu, a ujemne wróciłyby do wejściowej, dodatnio naładowanej elektrody - anody. Jednak w procesie rozdziału elektroforetycznego wszystkie składniki wprowadzonej mieszaniny, ulegając separacji, przechodzą przez okno detektora niezależnie od rodzaju ładunku, jakim obdarzona jest dana cząstka. Dzieje się to za sprawą tzw. **przepływu elektroosmotycznego** (EOF - Electroosmotic Flow), czyli przepływu cieczy wypełniającej kapilarę pod wpływem przyłożonego napięcia.

Jako że w elektroforezie kapilarnej stosuje się kapilary ze stopionej krzemionki (ang. *fused silica*), w konsekwencji zetknięcia się wewnętrznych ścianek kapilary z roztworem elektrolitu o odpowiednim pH, następuje jonizacja grup silanolowych², **-Si-OH** w wyniku czego na powierzchni wewnętrznej kapilary pojawia się ładunek ujemny. Dodatnio naładowane cząstki z elektrolitu podstawowego gromadzą się więc w pobliżu tworząc tzw. podwójną warstwę elektryczną o potencjale elektrokinetycznym ξ . Warstwa ta składa się z części bezpośrednio przylegającej do powierzchni kapilary oraz z części dyfuzyjnej, rozciągającej się w głąb roztworu o nadmiarowym ładunku dodatnim. Gdy taki układ

¹ Więcej informacji o promieniu Stokesa znajduje się w prezentacji multimedialnej.

² Prezentacja multimedialna, str. 12.

umieszczony zostanie w polu elektrycznym o natężeniu E , hydratowane kationy z części dyfuzyjnej poruszać się będą w kierunku katody, powodując obserwowalny makroskopowo przepływ cieczy w kapilarze.

Wraz ze wzrostem pH buforu wzrasta jonizacja grup silanolowych, a zatem i ujemny ładunek na ściankach kapilary. Wzmaga to przepływ elektroosmotyczny zwiększając jego prędkość. Zmiana stężenia lub siły jonowej buforu wpływa na potencjał elektrokinetyczny; wzrost tych parametrów powoduje spadek potencjału elektrokinetycznego i przez to zmniejszenie prędkości EOF. Zbyt duże jednak stężenie elektrolitu jest niekorzystne ze względu na wzrost wydzielanego ciepła Joule'a, a przez to zwiększenie dyfuzji powodującej niekorzystne poszerzenie segmentów poszczególnych analitów.

W celu optymalizacji warunków separacyjnych możliwe jest kontrolowanie przepływu elektroosmotycznego poprzez dodawanie do elektrolitu podstawowego różnych dodatków, tj. rozpuszczalników organicznych, związków powierzchniowo czynnych, a także modyfikatorów wewnętrznej ścianki kapilary. Optymalizację szybkości przepływu przeprowadza się w celu osiągnięcia odpowiedniej rozdzielczości w jak najkrótszym czasie, natomiast jego stabilność jest warunkiem koniecznym do uzyskania powtarzalnych wyników. Przy wysokich wartościach pH grupy silanolowe są silnie zdeprotonowane, tym samym przepływ elektroosmotyczny jest o wiele mocniejszy od ruchliwości elektroforetycznej anionów i kationów, więc wszystkie komponenty mieszaniny pchane są w kierunku katody w kolejności: **kationy, cząsteczki obojętne, aniony**³.

W odróżnieniu od metod chromatograficznych, gdzie ciśnieniowy system przepływu cieczy powoduje jego paraboliczny profil poprzeczny, w elektrycznym systemie elektroforezy, profil EOF, a zarazem profil przepływu cieczy jest stały i prostopadły do ścian kapilary. W konsekwencji także prędkość przepływu jest stała na całej długości i średnicy kapilary⁴.

Wszechstronność zastosowań CE wynika częściowo z występowania jej licznych technik. Mechanizm procesu rozdziału w każdej z nich jest inny, a zatem informacje uzyskane w wyniku analiz wzajemnie się uzupełniają. Podstawowe techniki objęte pojęciem wysokosprawnej elektroforezy kapilarnej (HPCE - High Performance Capillary Electrophoresis) to⁵:

- strefowa elektroforeza kapilarna (CZE - Capillary Zone Electrophoresis),

³ Prezentacja multimedialna, str. 13 i dalsze.

⁴ Prezentacja multimedialna, str. 14.

⁵ Więcej informacji o technikach elektroforezy kapilarnej umieszczono w prezentacji multimedialnej

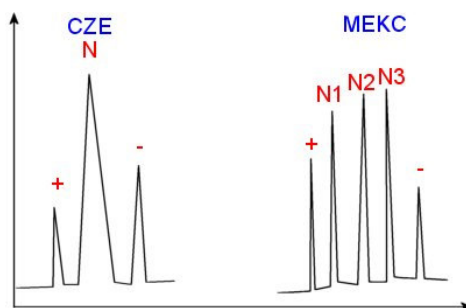
- micelarna elektrokinetyczna chromatografia kapilarna (MECC – Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography),
- izoelektryczne elektroogniskowanie kapilarne (CIEF- Capillary Isoelectric Focusing),
- żelowa elektroforeza kapilarna (CGE - Capillary Gel Electrophoresis),
- izotachoforeza kapilarna (CITP- Capillary Isotachopheresis)
- elektrochromatografia kapilarna (CEC- Capillary Electrochromatography).

Strefowa elektroforeza kapilarna to najprostsza i najczęściej stosowana technika, w której mechanizm separacji opiera się jedynie na różnicy w stosunku ładunku do masy analizowanych cząsteczek. Określona objętość próbki zostaje wprowadzona do kapilary wypełnionej buforem separacyjnym, gdzie pod wpływem przyłożonego napięcia jej składniki rozdzielają się na segmenty i w odpowiedniej kolejności przechodzą przez okno detektora. Technika ta ma zastosowanie zarówno dla małych jak i dla dużych molekuł organicznych, szczególnie protein, peptydów i leków.

Zasada rozdziału w technice micelarnej elektrokinetycznej chromatografii kapilarnej (MECC) opiera się na dodatku do mieszaniny separacyjnej środka powierzchniowoczynnego o stężeniu przewyższającym tzw. krytyczne stężenie micelizacji (CMC – Critical micelle concentration). W takich warunkach surfaktanty tworzą micelle – amfifilowe agregaty cząsteczek zorganizowanych w ten sposób, że hydrofobowy „ogon” skierowany jest do wnętrza, natomiast hydrofilowa „głowa” na zewnątrz miceli. W roztworze powstają więc dwie fazy: pseudostacjonarna faza micelarna oraz ruchoma faza ciekła. Surfaktanty są zwykle związkami jonowymi, w zależności od rodzaju ładunku wędrują więc zgodnie lub przeciwnie do kierunku przepływu elektroosmotycznego. Jednym z najczęściej stosowanych w micelarnej elektrokinetycznej chromatografii kapilarnej środków powierzchniowoczynnych jest dodecylosiarczan (VI) sodu (SDS) – amfifil anionowy. Przy pH obojętnym lub zasadowym prędkość EOF ma wartość większą niż szybkość poruszających się miceli SDS, wypadkowy ruch cieczy jest więc zgodny z ruchem EOF.

W technice MECC, obojętne składniki mieszaniny ulegają podziałowi między wspomniane fazy w różnych stosunkach w zależności od ich charakteru hydrofobowego. W przypadku stosowania anionowych środków powierzchniowoczynnych oraz zasadowego odczynu buforu separacyjnego, im bardziej hydrofobowa substancja, tym silniej oddziałuje z micelami i przez to migruje wolniej niż substancje o charakterze bardziej hydrofilowym

pozostające w roztworze. Jeśli cząsteczki analitu nie oddziałują z micelami, poruszają się z prędkością EOF.



Rys. 2. Porównanie zdolności separacyjnej strefowej elektroforezy kapilarnej (CZE) i micelarnej elektrokinetycznej chromatografii kapilarnej (MECC). + kationy; - aniony; N: N1, N2, N3 cząsteczki obojętne

Zaletę opisaną powyżej techniki stanowi przede wszystkim możliwość oddziaływania z fazą micelarną wszystkich składników próbki, zarówno obojętnych jak i obdarzonych ładunkiem. Pozwala to na lepszy rozdział składników zjonizowanych i umożliwia rozdzielenie składników obojętnych. Oprócz analizy barwników, MECC ma szerokie zastosowanie w badaniach aminokwasów, nukleotydów, witamin, farmaceutyków, węglowodorów aromatycznych, pozostałości po eksplozjach, itp. Możliwa jest także analiza próbek o złożonych matrycach, np. krwi i moczu.

II. Zastosowanie CE w badaniach kryminalistycznych i toksykologicznych

Elektroforeza kapilarna bardzo szybko została zaadaptowana do badań prowadzonych dla celów sądowych. Stało się to przede wszystkim dzięki analizom z dziedziny biologii molekularnej i potrzeb identyfikacji osób na podstawie wyników analizy DNA.

Analiza DNA to jedna z najbardziej rozpowszechnionych aplikacji elektroforezy kapilarnej. Ilość artykułów, które ukazały się na ten temat można liczyć już w tysiącach pozycji, a wciąż trwają prace badawcze i ukazują się kolejne publikacje i opracowania książkowe. Klasyczna technika analizowania fragmentów DNA to elektroforeza żelowa na płytkach szklanych. Mimo, że jest to metoda czasochłonna i pracochłonna, jest ona powszechnie akceptowaną i stosowaną w rutynowych analizach z dziedziny biologii molekularnej. Elektroforeza kapilarna stanowi dla niej alternatywę o dobrej wydajności i powtarzalności, zaś wprowadzenie detektora fluorescencyjnego ze wzbudzeniem laserowym (LIF – Laser Induced Fluorescence) znacznie poprawiło czułość tej metody. Zakres badań DNA, do których można wykorzystać elektroforezę kapilarną jest bardzo

szeroki, od ustalania sekwencji pojedynczego łańcucha po analizę DNA i całego chromosomu.

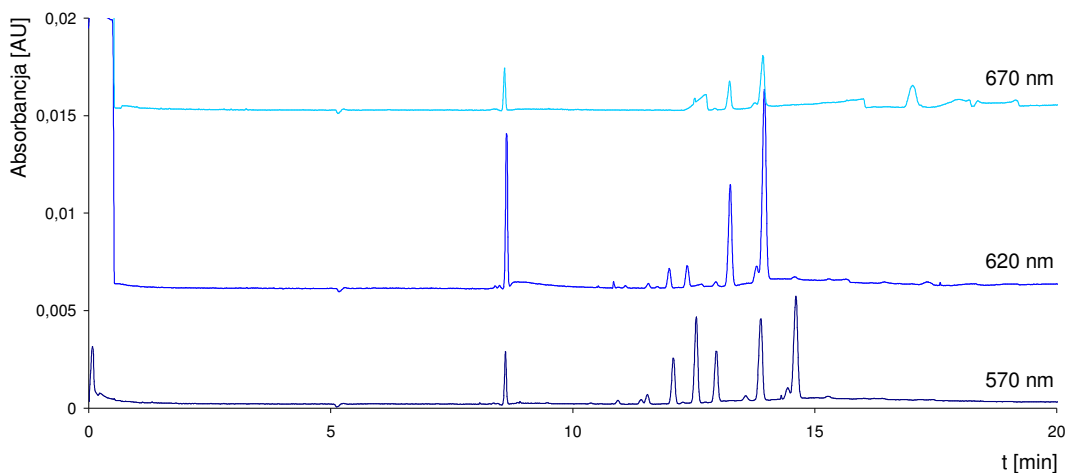
Często zadaniem laboratorium kryminalistycznego bywa zbadanie składu chemicznego substancji w postaci proszków bądź tabletek, w celu określenia zarówno zawartości głównych składników (często narkotyków) jak i zanieczyszczeń, pomocnych w ustaleniu sposobu produkcji i pochodzenia analizowanej substancji. W toksykologii sądowej najczęściej istnieje potrzeba identyfikacji i oznaczenia leków, narkotyków, ich metabolitów oraz innych potencjalnych trucizn w materiale biologicznym, zarówno posekcyjnym, jak i we krwi, moczu, ślinie i włosach pobranych od osób żyjących. Doniesienia o zastosowaniu do powyższych celów elektroforezy kapilarnej są szeroko spotykane w literaturze. Jak dotychczas z powodzeniem zastosowano CE do oznaczania: heroiny oraz jej zanieczyszczeń i metabolitów; morfiny, kodeiny, kokainy, LSD, barbituranów, trójpierścieniowych leków przeciwdepresyjnych, benzodiazepin, kanabinoidów oraz efedryny, amfetaminy, metamfetaminy i ich pochodnych.

Micelarna elektroforeza kapilarna jest wysmienitym narzędziem w badaniach śladów powystrzałowych (GSR – Gun Shot Residues), powybuchowych oraz samych materiałów wybuchowych. Rozdzielanie i oznaczanie typowych jonów obecnych w materiałach powybuchowych (chlorków, azotanów, azotynów, siarczanów, siarczynów, węglanów, cyjanków, tiocyjanianów i nadchloranów) może być prowadzona z wykorzystaniem strefowej elektroforezy kapilarnej (CZE) doskonale nadającej się do oznaczania nieorganicznych anionów i kationów.

Innym zastosowaniem analizy jonów metodą elektroforezy kapilarnej jest wyznaczanie czasu zgonu na podstawie stężenia jonów potasowych w płynie z gałki ocznej. W laboratoriach kryminalistycznych opracowano także procedury wykrywania śladów śliny i nasienia w różnych matrycach na podstawie oznaczania charakterystycznych białek oraz procedury oznaczania markerów choroby alkoholowej w surowicy.

Badania nad wykorzystaniem metody CE do identyfikacji i porównywania materiałów kryjących dla celów sądowych prowadzone są w nielicznych laboratoriach chemicznych w Europie i Stanach Zjednoczonych. Temat ten został również zainicjowany w Pracowni Chemii Sądowej Wydziału Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego. 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, niewielkie zużycie odczynników, stosunkowo niski koszt eksploatacji aparatury. Obecnie prowadzone w pracowni badania skupiają się na

zastosowaniu opracowanych już procedur do analizy materiałów kryjących występujących w drukarkach atramentowych.



Rys. 3 Rozdział mieszaniny barwników stosowanych w pastach długopisowych techniką MECC

III. Materiały kryjące

Najbardziej popularnym materiałem kryjącym jest atrament. Atramenty są mieszaninami naturalnych bądź syntetycznych barwników, czasami pigmentów, rozpuszczonymi w wodzie lub alkoholu z dodatkiem składnika nadającego konsystencję (gliceryna, guma arabska) i środka konserwującego (np. fenol, formalina). Można wyróżnić kilka podstawowych typów atramentów: atrament chiński (indyjski), atramenty kampezoowe, żelazo-garbnikowe, nigrozynowe i barwnikowe.

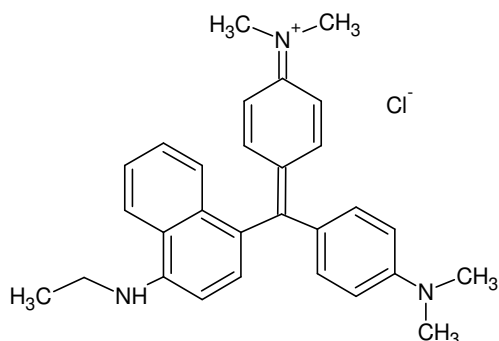
Atramenty chińskie lub indyjskie należą do najstarszych znanych atramentów. Są to zawiesiny sproszkowanego węgla (grafitu) w roztworze wody i gumy (lub innego spoiwa) lub w roztworze szelaku (rodzaj żywicy naturalnej) i boraksu z odczynnikami dodającym wilgotność. Są to atramenty o najtrwalszym i najintensywniejszym zabarwieniu.

Atramenty kampezoowe także zaliczyć można do historycznych materiałów kryjących, obecnie bardzo rzadko spotykanych w Polsce. Podstawę składu tego atramentu stanowi wyciąg z igieł modrzejca kampechiańskiego (*Haematoxylon campechianum*) – drzewa rosnącego dziko w Ameryce Środkowej - zawierających hematoksylinę i chromian potasu.

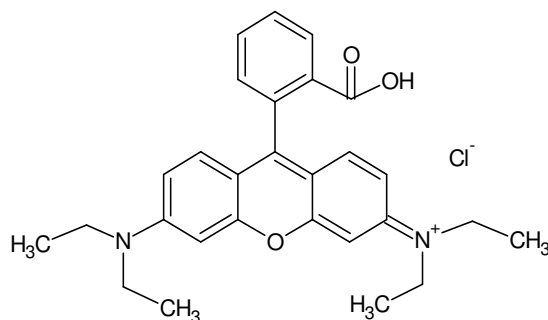
Atramenty żelazo-garbnikowe zawierają kwas garbnikowy (taninę), kwas galusowy, siarczan żelaza i często zasadowe barwniki anilinowe. Są to atramenty wnikaające w papier, czasami nawet składniki reagują z włóknami papieru, dzięki czemu atramenty te charakteryzują się dużą trwałością.

Nigrozyna była jednym z pierwszych syntetycznych czarnych barwników stosowanym w produkcji atramentów. Ze względu na dużą rozpuszczalność nigrozyny w wodzie oraz efekt wietrzenia zapisów sporządzonych tego typu atramentami, są one teraz bardzo rzadko wykorzystywane.

Obecnie powszechnie spotykane atramenty to atramenty barwnikowe, zawierające różne mieszaniny głównie syntetycznych barwników wanadowych, wolframowych, anilinowych i innych. W składzie polskich atramentów znajdują się najczęściej barwniki triarylometanowe np. fiolet krystaliczny, błękit Wiktoria R, rodamina B, oraz tiazynowe, np. błękit metylenowy, a także zieleń malachitowa i kompleksy metali np. żelazowo-taninowy.

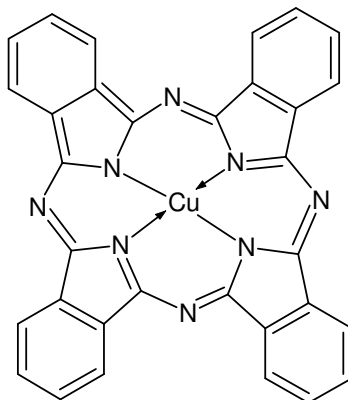


Błękit Wiktoria R



Rodamina B

Pasty długopisowe stanowią zawiesiny barwnika(ów) w cieczy o dużej lepkości. Oprócz rozpuszczalnika ulatniającego się podczas pisania, zawierają żywicę naturalną lub syntetyczne polimery odpowiedzialne za konsystencję, a także kwaśne związki, np. kwasy tłuszczowe zmniejszające współczynnik tarcia podczas pisania. Do past długopisowych dodaje się również substancji zapobiegających wysychaniu pasty, nadających jej odpowiednią lepkość i zapobiegające korozji. Barwniki, które najczęściej stosowane są w produkcji past długopisowych to Solvent Blue 38, fiolet metylowy oraz kompleksy metaloorganiczne, odporne na działanie światła, np. ftalocyjaniana miedzi.



Ftalocyjanina miedzi (II)

Często w analizie chemicznej poddaje się również tusze pochodzące z pieczętek. W ich skład wchodzi barwniki, guma arabska, gliceryna, klej rybi, szelak, środki konserwujące i inne dodatki. W związku ze zwiększającą się liczbą dokumentów powstających przy użyciu komputera badaniom poddawane są także takie dokumenty, w których materiałem kryjącym jest toner. Tonery zawierają żywicę (składnik wiążący), barwniki lub pigmenty oraz różnego rodzaju domieszki zwiększające masę tonera, poprawiające lub nadające pożądane właściwości, np. amorficzną krzemionkę.

Ćwiczenie

Analiza chemiczna materiałów kryjących ekstrahowanych z papieru – kryminalistyczne badania dokumentów

Cel ćwiczenia

Celem ćwiczenia jest uzyskanie przez studenta umiejętności:

- przeprowadzania ekstrakcji typowych materiałów kryjących z papieru;
- prowadzenia analizy próbek metodą elektroforezy kapilarnej;
- interpretacji uzyskanych w postaci elektroforegramów wyników;
- różnicowania materiałów kryjących w oparciu o wyniki uzyskane metodą elektroforezy kapilarnej.

Zakres materiału naukowego

- ogólna wiedza na temat metod stosowanych do badania dokumentów i materiałów kryjących w laboratorium kryminalistycznym
- podstawy teoretyczne elektroforezy kapilarnej
- podstawy teoretyczne micelarnej elektrokinetycznej chromatografii kapilarnej

Literatura obowiązkowa

1. Hołyst B., *Kryminalistyka*, PWN 1996, 508 – 594.
2. Kościelniak P., Piekoszewski W. (red.), *Chemia Sądowa*, Wydawnictwo IES 2002, str.: 238–240, 301–306.
3. Witkiewicz Z., *Podstawy chromatografii*, WNT 2005, 367-410.
4. Szczepaniak W., *Metody instrumentalne w analizie chemicznej*, PWN 2004, 333-339.
5. Scoog D.A., West D.M., Holler F.J., Crouch S.R., *Podstawy chemii analitycznej 2*, PWN 2007, 509-516
6. Materiały umieszczone na stronie www.chemia.uj.edu.pl/forensic poświęcone analizie materiałów kryjących techniką elektroforezy kapilarnej.

Literatura uzupełniająca

1. Xu X., de Koeijer J.A., *Ink analysis for forensic science applications by micellar electrokinetic capillary chromatography with photo-diode array detection*, Int. J. Forensic Doc. Examiner 1997, vol. 3, 240.
2. Mania J., Madej K., Kościelniak P., *Ink analysis by capillary electrophoresis – analytical conditions optimisation*, Chem. Anal. (Warsaw) 2002, vol. 47, 585.
3. Bell S., *Forensic Chemistry*, Pearson Prentice Hall, New Jersey 2006, 460-526.

Przyrządy, materiały, odczynniki

1. Mikroskop optyczny, mikroskop do badania dokumentów w świetle podczerwonym, płuczka ultradźwiękowa, przyrząd do pobierania próbek, system do elektroforezy kapilarnej PrinCE 550 z detektorem DAD-170 (Prince Technologies), kapilara kwarcowa o średnicy wew. 50 μm , mikrostrzykawka o pojemności 1 μl .
2. Roztwór do ekstrakcji: pirydyna–woda (1:1, v/v);
odczynniki do rozcieńczania próbek: metoksyetoksyetanol (MEE) oraz roztwór zawierający 2 mM Brij-35 (niejonowy środek powierzchniowoczynny), 10 mM HCOOH i 5 mM NaOH;
elektrolit podstawowy: 30 % (v/v) acetonitryl, 42 mM SDS, 10,5 mM 3-aminopropanolu, 5,25 mM HCl i 0,35 mM Brij-35.
3. Fikcyjny dokument sporządzony ręcznie lub linie pisma sporządzone różnymi materiałami kryjącymi (pasty długopisowe lub atramenty do piór wiecznych).
4. Stanowisko do odparowywania próbek w strumieniu azotu (azot techniczny).

Sposób wykonania

1. Wstępne oględziny linii pisma (dokumentu) przy użyciu oka „nieuzbrojonego” oraz lupy, a następnie: mikroskopu optycznego i mikroskopu do badania dokumentów w świetle podczerwonym. Obserwacja potencjalnych różnic w badanych materiałach kryjących (np. grubość, intensywność linii, barwa) oraz wytypowanie fragmentów linii, z których pobrane zostaną próbki do analizy chemicznej.
2. Pobranie próbek do analizy w postaci niewielkich krążków, w liczbie od 12 do 15 w zależności od grubości i intensywności linii. Do tego celu wykorzystuje się specjalnie przygotowany przyrząd: strzykawkę ze stalową igłą o śred. 0,8 mm.

3. Umieszczenie pobranych krążków w fiolce szklanej i dodanie 5 μL mieszaniny ekstrahującej. Przeprowadzenie ekstrakcji w płuczce ultradźwiękowej przez 5 minut, następnie przeniesienie ekstraktu (przy pomocy mikrostrzykawki) do fiolki szklanej o poj. 250 μL i odparowanie rozpuszczalnika pod strumieniem azotu.
4. Rozpuszczenie stałej pozostałości po ekstrakcji w 2 μL MEE i rozcieńczenie 4 μL roztworu Brij-35/HCOOH/NaOH.
5. W analogiczny sposób przygotowanie tzw. ślepej próby, czyli ekstraktu z czystego papieru.
6. Przeprowadzenie separacji elektroforetycznej z detekcją DAD (z wybranymi długościami fali: 215, 375, 570, 620 i 670 nm): umieszczenie fiolek z próbkami oraz buforem separacyjnym w autosamplerze i wybranie stosownych metod w panelu sterowania (na komputerze).

Opracowanie wyników

1. Interpretacja otrzymanych elektroforegramów poprzez porównanie:
 - a) liczby uzyskanych pików,
 - b) ich położenia (czasu migracji) i wzajemnych stosunków pól powierzchni pod pikiem,
 - c) porównanie elektroforegramów uzyskanych dla ekstraktów materiałów kryjących z tzw. ślepą próbą.
2. Wyciągnięcie wniosków odnośnie podobieństw i różnic w uzyskanych obrazach (profilach) elektroforetycznych poszczególnych próbek.
3. Wysłunięcie propozycji opinii biegłego, odpowiadając na pytanie czy na podstawie przeprowadzonych analiz można uznać badane zapisy za sporządzone różnymi materiałami kryjącymi czy też takimi samymi.