

Пробоподготовка чернил синих шариковых ручек для определения состава красящих компонентов методом ОФ ВЭЖХ

А.А. Кечин, *А.В. Кравченко, Л.А. Карцова

ФГАУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет, Институт химии»,
Российская Федерация, 198504, г. Санкт-Петербург, Петродворец, Университетский пр., 26

*Адрес для переписки: Кравченко Анастасия Витальевна, E-mail: kravchenko161216@gmail.com

Поступила в редакцию 02 ноября 2023 г., после доработки 05 декабря 2023 г.

В работе представлены различные теоретические и практические аспекты пробоподготовки нанесенных на бумагу чернил синих шариковых ручек для последующего количественного анализа методом обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ОФ ВЭЖХ). Обсуждаются оценочные аналитические характеристики варианта такого способа, как вырезание бумажного фрагмента, содержащего нанесенные чернила, на повторяемость результатов анализа; осуществлен поиск состава экстрагирующей системы и условий экстракции. Качественную и количественную характеристику экстрактов проводили методом ОФ ВЭЖХ с диодно-матричным детектированием. Рекомендовано использование скальпеля в качестве инструмента вырезания бумажных фрагментов с нанесенным образцом, в качестве экстрагента — подкисленной смеси растворителей, а также проведение экстракции в УЗ ванне при комнатной температуре в течении 2 мин. Показано, что влияние различной степени нажима на шариковую ручку при нанесении чернил на бумагу можно нивелировать использованием нормированных площадей пиков индивидуальных красителей. Предложенные условия пробоподготовки апробированы при изучении процессов изменения состава нанесенных чернил в процессе искусственного старения под воздействием постоянного ультрафиолетового (УФ) облучения.

Ключевые слова: жидкостная экстракция, пробоподготовка, анализ чернил, триарилметановые красители, криминалистика

For citation: *Analitika i kontrol'* [Analytics and Control], 2023, vol. 27, no. 4, pp. 241-251

DOI:10.15826/analitika.2023.27.4.005

Sample preparation of blue ballpoint pen ink for determining the composition of color components by RP HPLC method

A.A. Kechin¹, *A.V. Kravchenko¹, L.A. Kartsova¹

¹St. Petersburg State University, Institute of Chemistry
26 Universitetsky Av., Petrodvorets, St. Petersburg, 198504, Russian Federation

*Corresponding author: Anastasia V. Kravchenko, E-mail: kravchenko161216@gmail.com

Submitted 02 November 2023, received in revised form 05 December 2023

The paper presents various theoretical and practical aspects of sample preparation of blue ballpoint pen ink applied on paper for subsequent quantitative analysis using reverse-phase high-performance liquid chromatography (RP HPLC). Estimation of analytical characteristics of a variant of cutting out a paper fragment containing applied ink for reproducibility of analysis results is discussed; composition of the extraction system and extraction conditions were evaluated. Qualitative and quantitative characterization of the extracts was performed by RP HPLC with the diode array detection. Using a scalpel as a tool for cutting out sample fragments and an acidified mixture of solvents as an extractant with performing extraction in an ultrasonic bath at the room temperature for 2 minutes is recommended. It was shown that the influence of different degree of pressure on a ballpoint pen when applying ink to the paper can be minimized by using normalized peak areas of individual dyes. The proposed sample preparation conditions were tested when

studying the processes of changes in the composition of applied ink during artificial aging under the influence of constant ultraviolet (UV) irradiation.

Keywords: liquid-liquid extraction, sample preparation, ink analysis, triarylmethane dyes, forensic science

ВВЕДЕНИЕ

Несмотря на активное внедрение информационных технологий в нашу жизнь и появление электронного документооборота, многие важнейшие документы по-прежнему подписываются человеком лично, а проверка подлинности документа включает в себя качественный и количественный анализ состава нанесенных на бумагу чернил ручек и остается одним из важнейших направлений в криминалистике. Несмотря на сложный состав шариковых ручек (красители и пигменты, растворители, добавки по типу ПАВ и т.д. [1]), при решении данной задачи в качестве объекта анализа выступают красители и пигменты (далее красящие компоненты), используемые в производстве шариковых ручек. Для ручек синего цвета это триарилметановые красители (*кристаллический фиолетовый, метиловый фиолетовый* и т.д.), для которых характерна наибольшая насыщенность цвета и низкая стабильность при хранении и воздействии внешних факторов (например, выцветание при облучении светом или воздействии повышенной температуры), а также фталоцианиновые пигменты [2]. Именно выявление различий в качественном и количественном составе этих красящих компонент лежит в основе экспертизы документов [3].

Для анализа используют различные методы, которые условно подразделяют на деструктивные (с разрушением целостности исследуемого документа) и малодеструктивные (с минимальным повреждением документа). К последним относят инфракрасную и рамановскую спектроскопию [4 - 6], а также масс-спектрометрию (МС) с различными способами ионизации [7 - 10] из-за малого количества требуемого образца и возможности анализа непосредственно с листа исследуемого документа. Несмотря, казалось бы, на предпочтительность малодеструктивных методов, позволяющих оставлять документ практически неповрежденным,

интерпретация данных может быть затруднена, особенно в случае долгого хранения документов из-за появления продуктов деградации и интерференции значительного количества аналитических сигналов. Именно поэтому в судебной экспертизе чаще применяют деструктивные методы: ВЭЖХ [11 - 14], тонкослойная хроматография [2] и капиллярный электрофорез [15, 16], применение которых требует нарушения целостности документа и экстракции красящих компонентов с бумаги, однако при этом позволяют разделять сложные смеси красителей и выявлять малые различия в составе анализируемого образца. Наиболее предпочтительным среди методов разделения является ВЭЖХ из-за высокой воспроизводимости и возможности использования различных вариантов детектирования (диодно-матричный, УФ, МС, флуориметрический). Необходимость выполнения предварительной пробоподготовки, а также повышенный интерес исследователей к данной теме привели к появлению большого количества вариантов пробоподготовки без четкого обоснования выбора тех или иных условий. А отсутствие оценки влияния различных факторов на результат не позволяет выбрать тот или иной алгоритм.

Схема пробоподготовки, предшествующая ВЭЖХ анализу. Определение красящих компонентов включало два основных этапа: вырезание бумажного фрагмента, содержащего анализируемый объект, и экстракция красящих компонентов с этого фрагмента. На втором этапе в ходе жидкостной экстракции варьировали состав экстрагента, время обработки ультразвуком и температуру [11, 13, 14]. Соответствующая информация представлена в табл. 1; далее каждый этап будет рассмотрен подробнее.

Способы вырезания бумажных фрагментов. В имеющихся публикациях наиболее часто встречаются следующие два способа: с помощью скальпеля [13, 17] и дырокола [11, 14]. Однако авторы не аргументируют конкретный выбор.

Таблица 1

Варианты комбинаций основных этапов пробоподготовки в различных исследованиях

Table 1

Variants of combinations of the main stages of sample preparation in different studies

Инструмент для вырезания бумажных фрагментов с нанесенными чернилами	Состав экстрагента	Условия экстракции	Ссылка
Дырокол	MeOH	2 мин при комнатной температуре	[14]
Скальпель	Трибутиламино-ацетатный буфер/ACN (1: 1 по объему)	—	[17]
Дырокол	ACN	2 мин при комнатной температуре	[11]
Скальпель	ACN	5 – 10 мин при комнатной температуре	[13]
Скальпель	MeOH	10 мин при комнатной температуре	[18]

В рутинном варианте использование дырокола позволяет значительно снизить погрешность размера вырезаемых фрагментов и ускорить процесс пробоподготовки, однако такой подход требует наличия в анализируемом документе области с определенным диаметром прокола без попадания в нее дополнительного текста. Использование скальпеля увеличивает время пробоподготовки, но позволяет контролировать ширину и длину вырезаемого штриха, делая работу с данным инструментом более гибкой, что особенно важно при анализе реальных объектов, где длина вырезаемого штриха может быть ограничена просто отсутствием прямых линий.

При *экстракции красящих компонентов* для последующего анализа методом ОФ ВЭЖХ к вырезанному бумажному фрагменту с нанесенными чернилами добавляют экстрагент. В имеющихся публикациях в качестве экстрагентов для чернил синих шариковых ручек чаще всего упоминают ацетонитрил [11, 13] и метанол [18 - 20]. Однако альтернативных вариантов и сопоставления результатов с данными растворителями не приводят, что не позволяет сделать заключение относительно эффективности экстракции и оптимального выбора экстрагента. В ряде работ рассмотрены сразу несколько различных экстрагентов: метанол, ацетонитрил, тетрагидрофуран, 2-пропанол, вода, ацетон, с оценкой степеней извлечения красящих компонентов [13]. Однако заключение о большей эффективности ацетонитрила сделано на выборке только из трёх типов синих шариковых ручек, что, конечно, недостаточно. Кроме того, отсутствуют данные о влиянии pH экстрагента на эффективность экстракции, хотя в составе молекул определяемых красителей есть функциональные группы, которые могут влиять на их растворимость и, следовательно, экстрагируемость.

Таким образом, отсутствие рекомендаций и протокола к пробоподготовке образцов рукописного документа для анализа ВЭЖХ требует установления влияния ряда факторов на получаемые результаты для последующего использования в рутинном анализе. После детального изучения имеющихся публикаций в этой области нами была запланирована и реализована специальная серия экспериментов для оценки влияния различных факторов на получаемые результаты. В рамках данной работы проведена оценка вариантов использования различных инструментов для вырезания на воспроизводимость экстракции, а также – состава экстрагента и условий экстракции на эффективность извлечения аналитов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Реактивы. Используемые реагенты: ацетонитрил (>99.9 %, Sigma Aldrich), метанол (>99.9 %, Sigma Aldrich), диметилформамид (>99.0 %, Реахим), трифторуксусная кислота (>99.0 %, Sigma Aldrich), гидроксид натрия (>98.0 %, Sigma Aldrich), диметилсульфоксид (>99.9 %, SeccoSolv), муравьиная

кислота (>99.0 %, ChemSolute), Метилловый фиолетовый (>80.0 %, Sigma Aldrich), Кристаллический фиолетовый (>88.0 %, Sigma Aldrich), Виктория синяя Б (>90.0 %, Sigma Aldrich), Виктория синяя БО (>95.0 %, Sigma Aldrich).

Объекты исследования. Синие шариковые ручки для исследования приобретены в местных магазинах. Stabilo galaxy 818 (0.38 мм, Малайзия), Corvina 51C (0.7 мм, Италия), Pilot BPS-GP (0.32 мм, Япония), Erich Krause R301 (0.4 мм, Китай), BIC Round Stic (0.4 мм, Мексика), Attache Оптима (0.7 мм, Россия), BIC cristal medium blue (0.4 мм, Франция), Berlingo W-219 (0.7 мм, Китай), Stabilo Performer (0.35 мм, Малайзия), Paper Mate InkJoy (0.3 мм, Бельгия), MunHwa MC Gold (0.3 мм, Корея), ErichKrause Ultra-20 (0.26 мм, Индия), Penac Soft Glider (0.7 мм, Япония), Pilot RexGrip BPR6-10R (0.22 мм, Япония), Berlingo Triangle 110 (0.7 мм, Индия), Pilot BPRK-10M (0.21 мм, Япония).

Оборудование. Хроматографический анализ проб проводили с использованием хроматографов Shimadzu LC-20 и Shimadzu LC-40 (Shimadzu, Япония) с диодно-матричным детектором; колонка Agilent ZORBAX Eclipse XDB-C18, 2.1 × 150 мм, 5 мкм и Agilent ZORBAX RR StableBond C18, 2.1 × 150 мм, 3.5 мкм (Agilent Technologies, США). Дозирование пробы в хроматограф проводили при помощи встроенного автосемплера.

Обработку результатов хроматографического анализа проводили с применением программного обеспечения «LabSolutions». Математическую обработку результатов проводили в программе «Excel».

Для приготовления растворов использовали аналитические весы Shimadzu AUX220 (Shimadzu, Япония), УЗ ванну Branson 1510 (Branson Ultrasonics Corporation, Швейцария), центрифугу ELMi CM-50 (ELMI Ltd., Латвия), деионизатор Д-301 (Аквилон, Россия), микродозаторы переменного объема вместимостью 500 – 5000, 200-1000, 20 – 200, 10 – 100, 1 - 20 мкл (Satorius, Германия), дырокол, скальпель.

Пробоподготовка образцов для ВЭЖХ анализа. На лист бумаги А4 каждой шариковой ручкой наносили линии, из которых вырезали штрихи скальпелем или дыроколом (общая длина 1 см). Оценки повторяемости выполнены на примерах шариковых ручек (Penac Soft Glider BA1904, Berlingo Triangle 110 color RT, Erich Krause Ultra-20, Stabilo Performer, Pilot Rexgrip F) в трех повторах каждым инструментом для вырезания. Далее бумажный фрагмент помещали в микроцентрифужную пробирку типа эппендорф вместимостью 1.5 мл, куда добавляли 500 мкл экстрагента, природу которого варьировали. Наряду с наиболее часто используемыми метанолом (MeOH) и ацетонитрилом (ACN) проверены другие экстрагенты: индивидуальные растворители (деионизованная вода, диметилформамид (DMFA)), система DMFA и MeOH (1:1 по объему), подкисленные трифторуксусной кислотой растворы MeOH, ACN и смеси DMFA с MeOH (1:1 по

объему) и ДМСО с АСН (1:1 по объему); объемная доля трифторуксусной кислоты во всех подкисленных экстрагентах составляла 0.1 %; 5 мМ раствор щелочи в MeOH готовили следующим образом: к 10 мг гидроксида натрия добавляли 40 мл MeOH в мерной колбе вместимостью 50 мл и доводили MeOH до метки.

Для оценки влияния на эффективность экстракции варьировали температуру (20 °С и 40 °С) и время (2, 5 и 20 мин) обработки ультразвуком. Далее пробы центрифугировали (RCF 10000 g), отбирали дозатором 300 мкл супернатанта и помещали в вials для хроматографического анализа. Для визуальной оценки дополнительно регистрировали интенсивность цвета штрихов до экстракции при помощи стереомикроскопа ЛОМО МСП-2 (АО «ЛОМО», Россия) с интегрированными цифровыми камерами (ТСА-3.0 и МС-5) и лампой накаливания в качестве источника освещения. После экстракции штрих доставали из пробирки, оставляли на подложке в вытяжном шкафу до полного высыхания и снова регистрировали цвет.

Миниатюризация пробоподготовки для анализа реальных объектов. На лист бумаги А4 шариковой ручкой наносили линии, из которых с помощью скальпеля вырезали штрих длиной 0.3 см. Далее этот бумажный фрагмент помещали в микроцентрифужную пробирку типа эппендорф вместимостью 1.5 мл, куда добавляли 30 мкл экстрагента. Для увеличения эффективности процесса экстракции пробирку помещали в ультразвуковую ванну и обрабатывали ультразвуком в течение 2 мин при 20 °С. Затем в пробирку добавляли 270 мкл 0.1%-ного раствора муравьиной кислоты в АСН (в соответствии с составом подвижной фазы). Полученный экстракт вновь обрабатывали ультразвуком в течение 2 мин при 20 °С. Далее с помощью дозатора отбирали 150 мкл подготовленного раствора с экстрагирован-

ными с бумаги компонентами чернил и помещали в вials для хроматографического анализа.

Процесс нанесения штрихов для определения влияния силы нажима шариковой ручки на бумагу. Для воспроизводимого нанесения штрихов с разной силой нажима использовали самодельную установку с числовым программным управлением (ЧПУ), которая включала следующие основные узлы: (1) подвижный модуль, обеспечивающий перемещение ручки, (2) держатель ручки, (3) лист бумаги (рис. 1). Штрихи наносили на поверхность бумажного носителя с заданной длиной (1.5 см) и степенью нажима. Контроль нажима проводили путем фиксирования давления стержня ручки при письме, что в свою очередь, отслеживалось с помощью весов (ВСП-0,6/0,1-1, Вессервис, Россия), расположенных непосредственно под листом, на который наносятся штрихи. Выбрано 5 степеней нажима, каждому соответствовал свой массовый эквивалент: 1 – слабая, <100 г; 2 – средне-слабая, 100-180 г; 3 – средняя 180-250 г; 4 – средне-сильная, 250-350 г; 5 – сильная, > 400 г. Пример нанесенных тестовых штрихов со степенями нажима от 1 до 5 для двух ручек представлен на рис. 1.

Условия хроматографического анализа. В качестве начальных условий для хроматографического анализа экстрактов красящих компонент при поиске наиболее эффективного экстрагента и оптимального способа вырезания бумажных фрагментов выбирали условия, описанные в [21]. В качестве компонентов подвижной фазы использовали АСН (В) и воду (А), содержащие 0.1 %-ный раствор муравьиной кислоты. Скорость потока элюента 0.30 мл/мин. Agilent ZORBAX Eclipse XDB-C18, 2.1 × 150 мм, 5 мкм. Режим элюирования – градиентный (0.25 – 15 %; 21.50 – 70 %; 22.00 – 70 %; 22.50 – 15 %; 25.00 – 15 %). Объем ввода пробы 5 мкл. Температура термостата 40 °С.

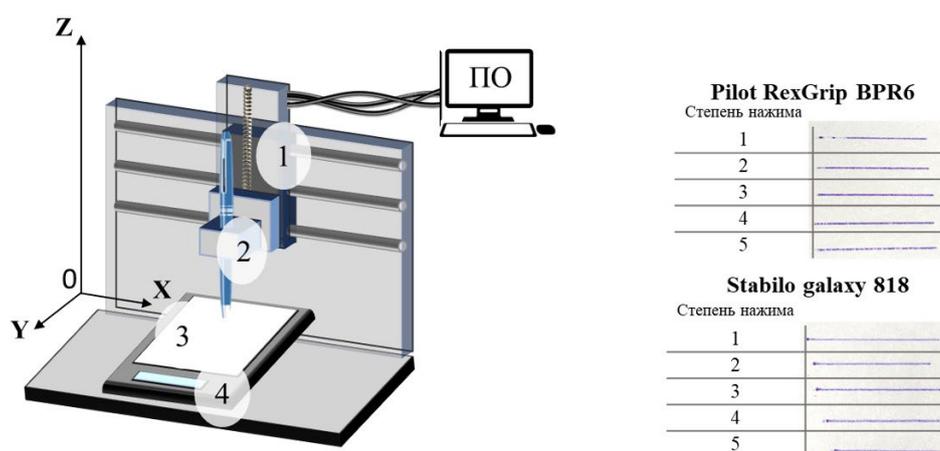


Рис. 1. Схема самодельной установки ЧПУ (1) подвижный модуль, обеспечивающий перемещение ручки, (2) держатель ручки, (3) лист бумаги, расположенный на (4) весах и пример нанесенных на бумажный носитель штрихов с разной силой нажима для двух ручек

Fig. 1. Scheme of a custom made computer numerical control (CNC) installation (1) a movable module allowing pen movement, (2) a pen holder, (3) a sheet of paper placed on (4) the balance and an example of strokes applied to a paper carrier with different pressure forces for two pens

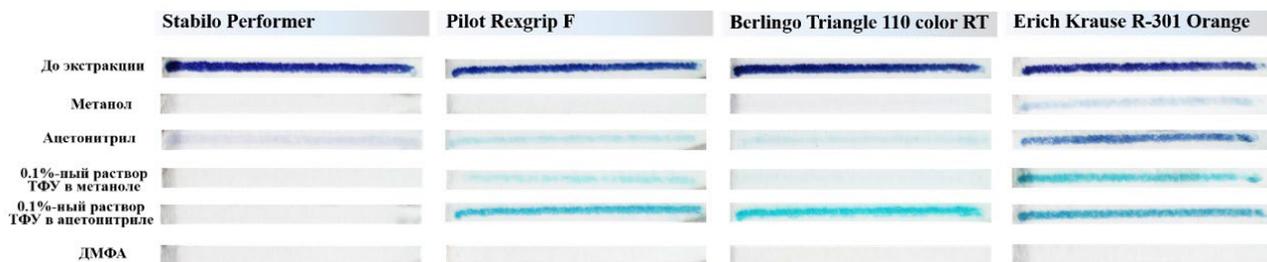


Рис. 2. Фотографии штрихов некоторых шариковых ручек после проведения экстракции. См. условия в экспериментальной части

Fig. 2. Photographs of the strokes of some ballpoint pens after extraction. For conditions cf. the Experimental part

Далее условия были оптимизированы для рутинного анализа триарилметановых красителей. Колонка Agilent ZORBAX RR StableBond C18, 2.1 × 150 мм, 3.5 мкм. Скорость потока элюента 0.30 мл/мин. Режим элюирования – градиентный (3.00 – 35 %, 11.35 – 85 %, 13.85 – 85 %, 14.35 – 95 %, 15.00 – 95 %, 15.30 – 35 %, 20.00 – 35 %). Объем ввода пробы 5 мкл. Температура термостата 40 °С. Это позволило сократить время анализа до 20 мин.

Идентификация красителей. Идентификацию красящих компонентов проводили по временам удерживания. Стандартные растворы триарилметановых красителей с концентрацией 1 мг/мл (Метиловый фиолетовый, Кристаллический фиолетовый, Виктория Б, Виктория БО) готовили растворением соответствующих навесок в MeOH. Рабочие растворы готовили разбавлением стандартных до концентрации 0.1 мг/мл раствором, состав которого ACN : 0.1% раствор муравьиной кислоты в воде в соотношении 15:85 по объему.

Искусственное старение нанесенных на бумажный носитель штрихов под воздействием постоянного УФ облучения. Лист бумаги с 16 линиями, нанесенными различными синими шариковыми ручками, помещали в специальный бокс с тремя УФ лампами (Camelion LH26-FS/BLB/E27 26 Вт, 220 В, 7.5 мВт/см²) без доступа внешнего света. Далее проводили облучение нанесенных штрихов в течение заданного времени и по его завершении проводили пробоподготовку (см. Экспериментальную часть, вырезание штриха из линии и экстракция) и ВЭЖХ анализ. Максимальное время составило 13 ч (при дальнейшем облучении не происходило значительных изменений): первые 6 ч УФ облучения интервал анализируемых временных точек 20 мин, далее - интервал составлял 1 ч.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Выбор наиболее эффективного экстрагента. Наиболее распространенными экстрагентами красящих компонент с бумаги для последующего ВЭЖХ анализа являются MeOH [14, 18] и ACN [11, 13]. Однако наши предварительные эксперименты показали, что данные растворители способны извлекать не все виды красителей. Более устойчивые

красители остаются на бумаге даже после длительного процесса экстракции, поэтому наряду с профилями, полученными методом ВЭЖХ, полноту экстракции независимо оценивали визуально, делая фотографии штрихов под микроскопом (рис. 2). Проведение данного эксперимента оказалось полезным и легло в основу разработки цифрового метода анализа штрихов до и после экстракции различными экстрагентами для последующей классификации [22].

Нанесенные штрихи фотографировали до проведения экстракции, помещали в пробирку на 1.5 мл типа «эппендорф», добавляли экстрагент. Далее отбирали экстракт красящих веществ для анализа методом ОФ-ВЭЖХ, а штрих вытаскивали и сушили на специальной подложке в вытяжном шкафу. После полного высыхания штрих фотографировали и сопоставляли с фото, полученным до экстракции. В результате анализа ВЭЖХ получали хроматографический профиль экстрагированных красящих компонент для каждой шариковой ручки (рис. 3).

Вывод об эффективности экстрагирующих систем делали для каждой ручки как по абсолютным значениям площадей регистрируемых пиков красящих компонент, так и по сравнению фотографий красящих компонент на бумаге до и после экстракции. На рис. 4 приведены примеры гистограмм, которые использовали для сопоставления аналитических возможностей экстракционных систем. Для большинства ручек наблюдали наибольшие значения площадей соответствующих хроматографических пиков в подкисленных экстрактах, однако при использовании метанола или ацетонитрила с добавлением трифторуксусной кислоты для некоторых ручек визуально фиксировали наличие красителя (светло-голубой оттенок) на бумаге после экстракции. Добавление ДМСО или ДМФА в экстракционную систему позволяет полностью извлечь данные компоненты: при визуальной оценке штриха на бумаге их не оставалось.

Однако использование подкисленных систем может быть оптимальным не для всех типов ручек. Так, нами обнаружено, что для ручки Erich Krause, наоборот, подкисление приводит к снижению степени извлечения по сравнению с неподкисленными экстрагентами, что может свидетельствовать

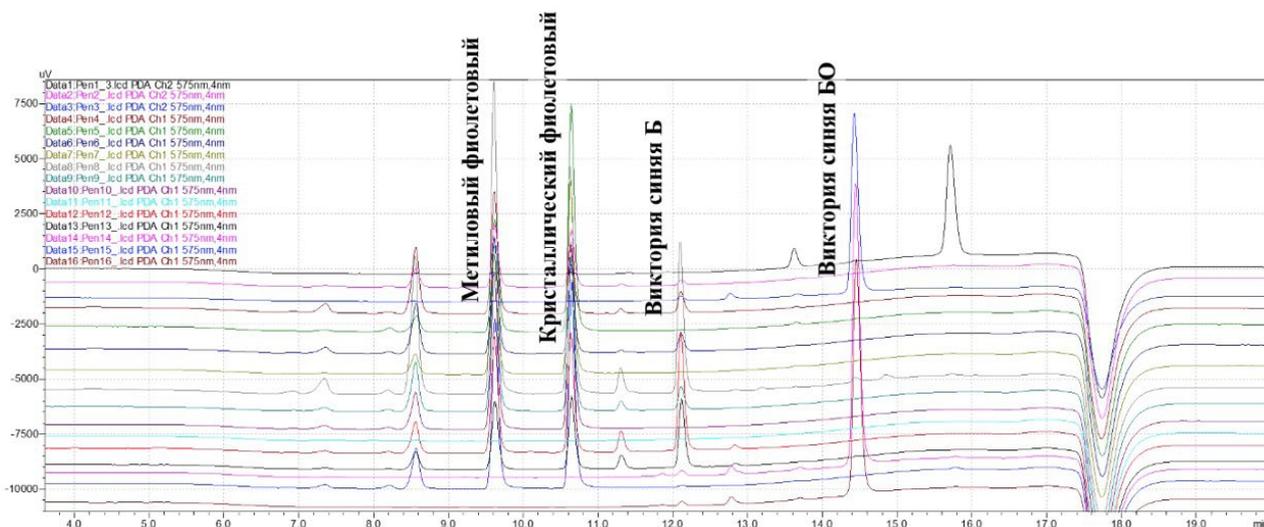


Рис. 3. Хроматографические профили различных ручек, полученные при экстрагировании 0.1%-ным раствором трифторуксусной кислоты в ACN. Условия хроматографического анализа: подвижная фаза: ACN (B) и вода (A), содержащие 0.1 (объемн.) % муравьиной кислоты; скорость потока элюента 0.30 мл/мин, режим элюирования – градиентный (3.00 – 35 %, 11.35 – 85 %, 13.85 – 85 %, 14.35 – 95 %, 15.00 – 95 %, 15.30 – 35 %, 20.00 – 35 %). Колонка Agilent ZORBAX RR StableBond C18, 2.1 × 150 мм, 3.5 мкм. Объем ввода пробы 5 мкл. Температура термостата 40 °С. Shimadzu LC-20 с диодно-матричным детектором

Fig. 3. Chromatographic profiles of different pens obtained by extraction with 0.1% solution of trifluoroacetic acid in acetonitrile. Chromatographic analysis conditions: mobile phase: acetonitrile (B) and water (A), containing 0.1 (vol.) % formic acid; eluent flow rate 0.30 ml/min, elution mode – gradient (3.00 – 35 %, 11.35 – 85 %, 13.85 – 85 %, 14.35 – 95 %, 15.00 – 95 %, 15.30 – 35 %, 20.00 – 35 %). Column Agilent ZORBAX RR StableBond C18, 2.1 × 150 mm, 3.5 μm. Sample injection volume 5 μl. Thermostat temperature was 40 °C. Shimadzu LC-20 with the diode-array detection

о дополнительном влиянии матрицы чернил на процесс экстракции.

Для оценки влияния **условий экстракции** на полноту извлечения компонентов выполнена серия специальных экспериментов. Изменяли два параметра: время обработки УЗ (2, 5 и 20 мин) и температуру (20 и 40 °С) на примере двух часто используемых экстрагентов, показавших наиболее высокие значения содержания красителей на предыдущем этапе: метанола и ацетонитрила. Сопоставление проводили

по абсолютным площадям хроматографических пиков красящих компонентов (рис. 5). Варьирование температуры и времени экстракции не привело к существенному изменению значений площадей хроматографических пиков, что свидетельствует об отсутствии влияния данных параметров на процесс извлечения аналитов. В качестве доминирующего фактора оказалась обработка ультразвуком (2 мин при 20 °С), обеспечивающая экспрессность анализа и минимальное воздействие на аналиты.

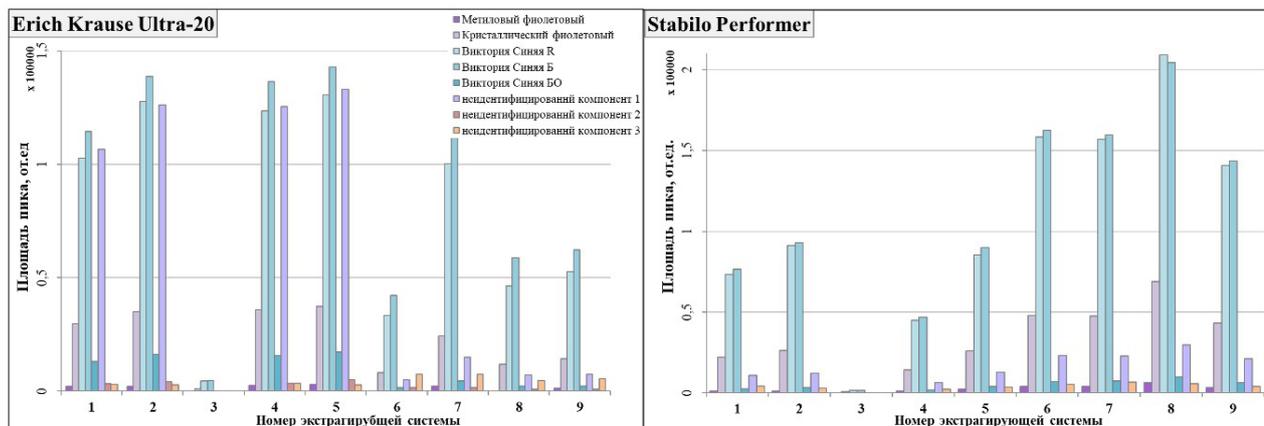


Рис. 4. Найденные хроматографические площади красящих компонент ручек при использовании различных экстрагирующих систем 1 – MeOH; 2 – ACN; 3 – H₂O; 4 – ДМФА; 5 – MeOH/ДМФА; 6 – MeOH, 0.1 % ТФУ; 7 – ДМФА/MeOH, 0.1 % ТФУ 8 – ACN, 0.1 % ТФУ, 9 - MeOH/NaOH

Fig. 4. Found chromatographic areas of the coloring components of pens using various extraction systems 1 – MeOH; 2 – ACN; 3 – H₂O; 4 – DMF; 5 – MeOH/DMF; 6 – MeOH, 0.1 % TFA; 7 – DMF/MeOH, 0.1 % TFA 8 – ACN, 0.1 % TFA, 9 – MeOH/NaOH

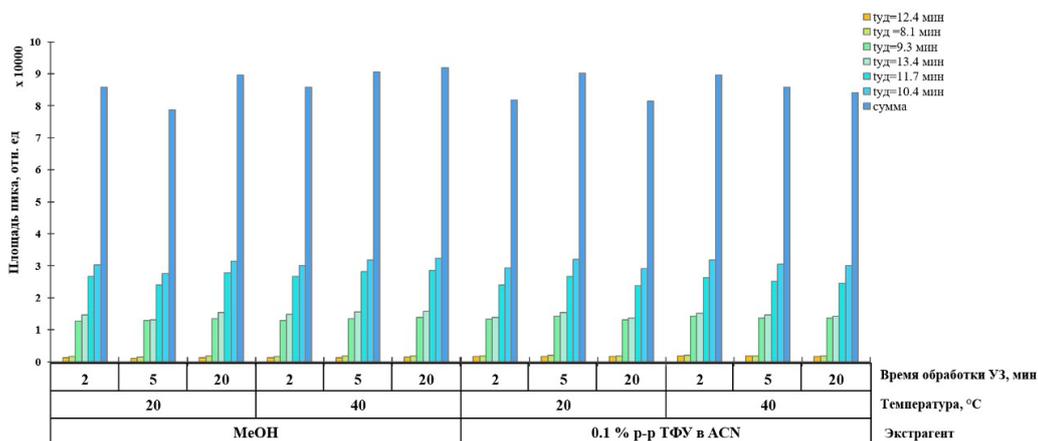


Рис. 5. Площади пиков красящих компонентов в зависимости от времени и температуры ультразвуковой обработки
Fig. 5. Peak areas of coloring components depending on the time and temperature of ultrasonic treatment

Выбор способа вырезания бумажных фрагментов. Как отмечено выше, использование скальпеля или дырокола в качестве инструментов вырезания бумажных фрагментов имеют как свои преимущества, так и недостатки. Влияние этих способов подготовки бумажного фрагмента к анализу на повторяемость получаемых результатов ранее не обсуждалось.

Для пяти ручек выполнили пробоподготовку двумя способами по три раза. Каждая из ручек имеет несколько красящих компонентов и повторяемость рассчитывали для каждого индивидуального красителя на основе наблюдаемых площадей хроматографических пиков. В табл. 2 приведены значения относительного стандартного квадратичного отклонения (ОСКО) для основных компонентов на

основе трех измерений. Каких-либо закономерностей отмечено не было, для некоторых ручек значение ОСКО достаточно велико и не зависит от способа вырезания, что может быть обусловлено случайной погрешностью или другими факторами (например, влияние компонентов матрицы чернил).

Тем не менее, на наш взгляд, более приемлемым является применение для этой цели скальпеля, что позволяет существенно сократить и упростить этап пробоподготовки.

Влияние силы нажима шариковой ручкой при письме. Один из часто обсуждаемых вопросов в области хроматографического анализа чернил – учет силы нажима, с которой человек давит на ручку, подписывая документ, поскольку разная сила нажима может влиять на количество наносимых красящих

Таблица 2

Относительное СКО определения основных экстрагируемых красящих компонент для двух различных способов вырезания бумажного фрагмента с нанесенными чернилами

Table 2

Relative standard deviation of determining primary extracted coloring components for two different methods of cutting out a paper fragment with applied inks

Название ручки	ОСКО при вырезании скальпелем, % (n = 3)				ОСКО при вырезании дыроколом, % (n = 3)			
	Метилловый фиолетовый	Кристаллический фиолетовый	Виктория синяя Б	Виктория синяя БО	Метилловый фиолетовый	Кристаллический фиолетовый	Виктория синяя Б	Виктория синяя БО
Penac Soft Glider BA1904	4.1	3.8	11.8	-	3.1	3.2	5.7	-
Berlingo Triangle 110 color RT	2.7	2.6	-	-	6.6	6.4	-	-
Erich Krause Ultra-20	8.6	8.6	12.5	-	18.7	18.3	19.0	-
Stabilo Performer	3.2	6.9	5.7	-	7.7	7.6	4.2	-
Pilot Rexgrip F	-	-	-	3.8	-	-	-	0.4

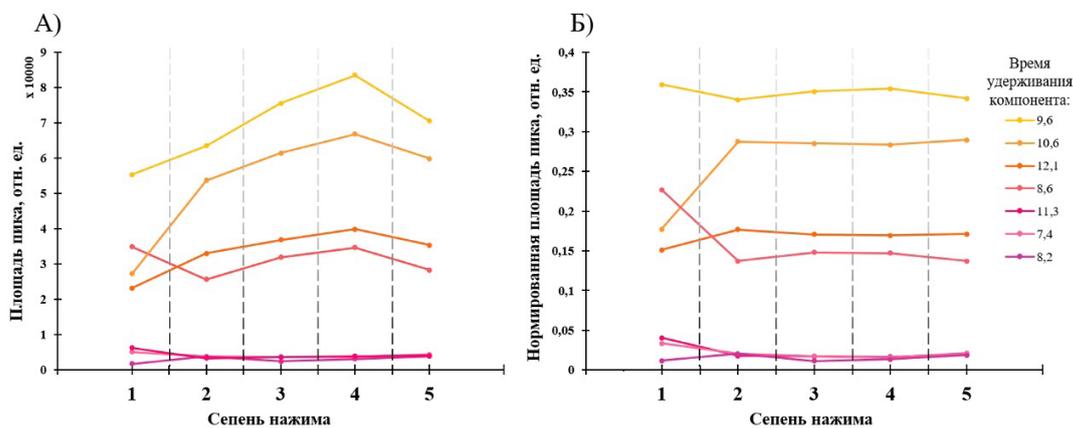


Рис. 6. График зависимости исходных (А) и нормализованных (Б) площадей пиков красящих компонентов от силы нажима. Справа на графике подписано время выхода соответствующего пика (9.8 мин – метиловый фиолетовый; 10.6 мин – кристаллический фиолетовый; 12.1 мин – виктория синяя Б)

Fig. 6. Plot showing the dependence of the original (A) and normalized (B) peak areas of the coloring components on the pressure force. Time of appearance of the corresponding peak is indicated on the right side of the plot (9.8 min – methyl violet; 10.6 min – crystal violet; 12.1 min – Victoria blue B)

компонентов шариковой ручки и, соответственно, на результат. Для оценки данного фактора нами использована специальная роботизированная установка, схема и принцип действия которой описан в разделе «Экспериментальная часть».

В качестве модельной системы для изучения влияния нажима выбраны чернила ручки (8) в связи с наибольшим количеством извлекаемых компонентов. Получена зависимость исходных (рис.

6А) и нормализованных (рис. 6В) площадей пиков красящих компонентов от силы нажима.

Из графика на рис 6А видно, что в результате увеличения степени нажима повышается содержание красителей из-за большего количества чернил на бумаге, следовательно, и суммарное количество красящих компонентов также становится большим. Однако для степени нажатия 5 (> 400 г) наблюдается уменьшение площади пика, связанное с ухудшением

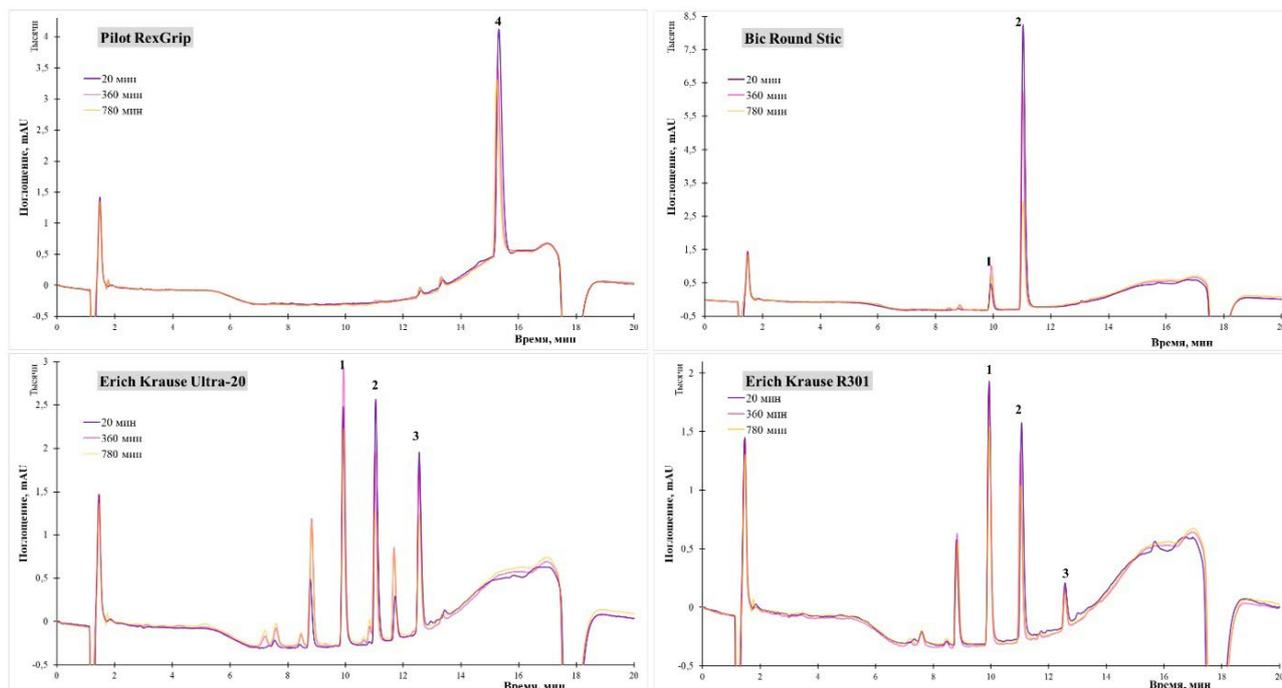


Рис. 7. Хроматографические профили некоторых ручек, полученные при различном времени УФ-облучения чернил. Условия хроматографического анализа см. рис. 3. Shimadzu LC-40 с диодно-матричным детектором. 1-Метиловый фиолетовый, 2-Кристаллический фиолетовый, 3- Виктория синяя Б, 4-Виктория синяя БО

Fig. 7. Chromatographic profiles of some pens obtained at different times of UV irradiation of the ink. For chromatographic analysis conditions see Fig. 3. Shimadzu LC-40 with the diode-array detection. 1 – Methyl violet, 2 – Crystal violet, 3 – Victoria blue B, 4 – Victoria blue BO

16			-4.6												-4.6		-8.1
14.8	-68.2																
13.6			2.0												4.6		5.2
12.8	13.5		2.6	-1.1		-1.9		-1.8	-3.6			-8.1	-8.4	-8.4			2.9
11.9	17.7							2.2				5.6	6.0	6.9			
11.2		-17.1		-2.4	-19.1	-12.6	-22.1	-4.4	-18.4	-22.1	-14.9	-14.2	-18				-15.3
10.8														2.3			
10	24.0	-3.4		1.3	15.5	5.8	17.1	-0.2	-7.9	3.9	2.3	-0.2	0.7				1.1
8.9		20.5		2.2	3.6	8.7	5.0	2.0	13.4	18.2	11.1	9.2	13.8				8.6
8.5													1.7				3.2
7.7	13.0							2.2	8.4			4.0	3.6	5.0			2.4
7.3									8.1								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	

Рис. 8. Схематичное изображение изменения относительного состава чернил синих шариковых ручек после 13 ч облучения УФ

Fig. 8. Schematic representation of the change in the relative composition of blue ballpoint pen inks after 13 hours of UV irradiation

пишущих возможностей ручки. Тем не менее, на графике зависимости нормированных площадей от силы нажатия (рис. 6Б) можно видеть, что полученные значения практически не зависят от степени нажима на шариковую ручку в области нормальной силы нажима (степень нажима 2 - 4), что позволяет оперировать нормированными площадями пиков, а также нивелировать влияние силы нажатия на шариковую ручку на получаемые результаты.

Апробация предложенного алгоритма пробоподготовки при оценке деградации красителей в условиях искусственного старения под УФ облучением. В случае анализа чернил изменения в концентрациях красителей и растворителей лежит в основе определения срока давности нанесенного текста. Однако под воздействием различных внешних факторов может меняться не только количественный, но и качественный состав, поскольку в процессе естественного старения происходит разрушение структур некоторых красителей с образованием их производных, например, для триарилметановых красителей часто наблюдается N-деметилирование кристаллического фиолетового под действием света [18].

Пробоподготовку и анализ образцов после облучения проводили согласно алгоритму, описанному в экспериментальной части. В результате получены хроматограммы для каждой шариковой ручки после заданного времени воздействия УФ облучения (рис. 7) и построены зависимости нормированной площади пика красящего компонента каждой ручки от времени УФ.

Предложенный алгоритм пробоподготовки позволяет проводить оценку изменения качественного и количественного состава красящих компонентов синей шариковой ручки. Для визуальной оценки процесса разрушения и образования новых красителей на рис. 8 приведены изменения относительного состава синих шариковых ручек после 13 ч облучения (рассматривали хроматографические пики с разным временем элюирования). Значения, приведенные в ячейках, соответствуют разнице относительного

содержания данного компонента после облучения УФ в течение 13 ч и до облучения, выраженной в процентах (%).

Из приведенных данных следует, что относительный состав ручек 3, 14, 16 и 4, 8 практически не меняется, в то время как для остальных наблюдается разрушение исходного красителя (выделено красным) и появление/накопление продуктов деградации (выделено зеленым). Это особенно выражено для ручки 1.

Соединения, время удерживания которых составляют 7.3, 7.7 и 8.5 мин, отсутствуют в начальных составах шариковых ручек, однако под действием УФ излучения происходит их образование и накопление в результате деградации некоторых красителей, концентрация которых, в свою очередь, закономерно уменьшается. Появление красителя с временем удерживания 7.3 мин наиболее характерно для ручки 9, для которой также происходит увеличение концентрации компонента с временем удерживания 7.7 мин. При этом появление соединения $t_{уд} = 8.5$ мин наблюдается лишь для 12-ой и 15-ой ручек после 180 мин УФ облучения.

Краситель с временем удерживания 8.9 мин находится в начальном составе практически всех ручек, а по мере облучения образцов, его концентрация в некоторых из них повышается. Аналогичная ситуация наблюдается и с метиловым фиолетовым ($t_{уд} = 10.0$ мин), однако в случае 9-ой ручки его концентрация уменьшается, что может объясняться деградацией с образованием соединений с временами удерживания 7.3 и 7.7 мин.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Выявлены различные аспекты пробоподготовки чернил синих шариковых ручек, нанесенных на бумагу, для дальнейшего анализа их состава методом ВЭЖХ с матрично-диодным детектированием. Выделено три основных этапа пробоподготовки, требующих оптимизации и стандартизации, для улучшения аналитических характеристик результатов. При

изучении возможности различных экстрагирующих систем для извлечения красящих компонентов синих шариковых ручек с листа бумаги обнаружено, что для большинства из них наиболее подходящими являются подкисленные растворы MeOH и ACN, а добавление диметилсульфоксида или диметилформамида (0,1%-ные растворы трифторуксусной кислоты в системах диметилформамид : метанол (1:1, по объему) и диметилсульфоксид : ацетонитрил (1:1, по объему) позволяют извлечь остаточные компоненты, что дополнительно фиксировали макросъемкой при помощи стереомикроскопа. Изменение условий экстракции (температуры и времени обработки УЗ) не влияли на получаемые хроматографические профили, поэтому выбраны минимальные значения – обработка 2 мин УЗ —при 20 °С. На примере пяти шариковых ручек изучена повторяемость вырезания бумажных фрагментов с нанесенными чернилами разными инструментами (скальпель, дырокол), однако ни один из вариантов не имеет выраженного преимущества, поэтому рекомендован скальпель как более удобный в работе. В ходе специального эксперимента по оценке силы нажима шариковой ручкой при письме на наблюдаемые хроматографические профили установлено, что использованием нормированных площадей можно нивелировать влияние силы нажима.

Предложенный алгоритм пробоподготовки апробирован для оценки изменения хроматографического профиля красящих компонентов в условиях искусственного старения (под действием УФ излучения) в течение 13 ч, что позволило отследить динамику изменения содержания основных красящих компонент, а также обнаружить продукты их деградации.

БЛАГОДАРНОСТИ

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда (грант 22-23-00577), руководитель Кравченко А.В. Авторы благодарят к.х.н. Калиничева Андрея Владимировича за помощь в планировании и реализации эксперимента по искусственному старению, а также советы при обработке данных.

ACKNOWLEDGMENTS

The study was supported by the Russian Science Foundation (grant 22-23-00590), supervisor Kravchenko A.V. The authors thank Dr. Andrey Vladimirovich Kalinichev for help in planning and performing the experiment on artificial aging, as well as for advice on data processing.

ЛИТЕРАТУРА

- Ezcurra M., Góngora J. M.G., Maguregui I., R. Alonso R. Analytical methods for dating modern writing instrument inks on paper // *Forensic Sci. Int.* 2010. V. 197. P. 1-20.
- Weyermann C., Marquis R., Mazzella W., Spengler B. Differentiation of Blue Ballpoint Pen Inks by Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry and High-Performance Thin-Layer Chromatography// *J. Forensic Sci.* 2007.V. 52. P. 216-220.
- Bügler J., Buchner H., Dallmayer A. Age Determination of Ballpoint Pen Ink by Thermal Desorption and Gas Chromatography–Mass Spectrometry// *J. Forensic Sci.* 2008. V. 53. P. 982-988.
- Senior S., Hamed E., Masoud M., Shehata E. Characterization and dating of blue ballpoint pen inks using principal component analysis of UV-Vis absorption spectra, IR spectroscopy, and HPTLC // *J. Forensic Sci.* 2012. V. 57. P. 1087-1093.
- The discrimination potential of ultraviolet-visible spectrophotometry, thin layer chromatography, and Fourier transform infrared spectroscopy for the forensic analysis of black and blue ballpoint inks / Causin V. [et al.] // *J. Forensic Sci.* 2008 V. 53. P. 1468-1473.
- de Souza Lins Borba F., Saldanha Honorato R., de Juan A. Use of Raman spectroscopy and chemometrics to distinguish blue ballpoint pen inks // *Forensic Sci. Int.* 2015. V. 249. P. 73-82.
- Analysis of black writing ink by electrospray ionization mass spectrometry / Williams M. R. [et al.]// *Forensic Sci. Int.* 2009. V. 191. P. 97-103.
- da Silva Ferreira P., Fernandes de Abreu e Silva D., Augusti R., Piccin E. Forensic analysis of ballpoint pen inks using paper spray mass spectrometry // *Analyst.* 2015. V. 140. P. 811- 819.
- Jones R. W., McClelland J. F. Analysis of writing inks on paper using direct analysis in real time mass spectrometry // *Forensic Sci. Int.* 2013. V. 231. P. 73-81.
- Study of chemical profile and of lines crossing using blue and black ink pens by LDI (+) MS and LDI (+) imaging / Almeida C. M. [et al.]// *Microchem. J.* 2019. V. 148. P. 220-229.
- Kher A., Mulholland M., Green E., Reedy B. Forensic classification of ballpoint pen inks using high performance liquid chromatography and infrared spectroscopy with principal components analysis and linear discriminant analysis // *Vib. Spectrosc.* 2006. V. 40. P. 270-277.
- Andrasko J. HPLC Analysis of Ballpoint Pen Inks Stored at Different Light Conditions // *J. Forensic Sci.* 2001. V. 46. P. 21-30.
- Samanidou V. F., Nikolaidou K. I., Papadoyannis I. N. Development and Validation of a Gradient-HPLC-PDAD Method for the Identification of Ballpoint Pen Ink Components: Study of Their Decomposition on Aging for Forensic Science Applications // *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 2004. V. 27. P. 215-235.
- Díaz-Santana O., Conde-Hardisson F., Vega-Moreno D. Comparison of the main dating methods for six ball-point pen inks // *Microchemical J.* 2018. V. 138. P. 550-561.
- Fakhari A. R., Breadmore M. C., Macka M., Haddad P. R. Non-aqueous capillary electrophoresis with red light emitting diode absorbance detection for the analysis of basic dyes // *Anal. Chim. Acta.* 2006. V. 580. P. 188-193.
- Analysis of ballpoint pen inks directly from paper using capillary electrophoresis / Copper C. [et al.]// *Forensic Chem.* 2019. V. 13. Article 100145.
- Liu Y.Z., Yu J., Xie M.X., Chen Y., Jiang G.Y., Gao Y. Studies on the degradation of blue gel pen dyes by ion-pairing high performance liquid chromatography and electrospray tandem mass spectrometry / Liu Y.Z. [et al.]// *J. Chromatogr. A.* 2006. V. 1125. P. 95-103.
- Studying of Handwritten Strokes Aging Kinetics by High-Performance Liquid Chromatography–Mass Spectrometry / Baygildieva D.I. [et al.]// *J. Anal. Chem.* 2019. V. 74. P. 1263–1270.

19. Akhmerova D., Krylova A., Stavrianidi A., et al. Forensic Identification of Dyes in Ballpoint Pen Inks Using LC–ESI–MS // *Chromatographia*. 2017. V. 80. P. 1701–1709.
20. Djozan D., Baheri T., Karimian G., Shahidi M. Forensic discrimination of blue ballpoint pen inks based on thin layer chromatography and image analysis // *Forensic Sci. Int.* 2008. V. 179. P. 199–205.
21. Шевченко Т. Н., Темердашев З. А., Киселева Н. В. Идентификация и определение ароматических красителей в составе чернил шариковых ручек методом ВЭЖХ со спектрофотометрическим и масс-спектральным детектированием // *Аналитика и контроль*. 2012. Т. 16, № 3. С. 232–239.
22. Classification of ballpoint pen inks based on selective extraction and subsequent digital color and cluster analyses / Kalinichev A. V. [et al.] // *Analyst*. 2022. V. 147. P. 3055–3064.
- REFERENCES**
1. Ezcurra M., Góngora J. M.G., Maguregui I., R. Alonso R. Analytical methods for dating modern writing instrument inks on paper. *Forensic Sci. Int.*, 2010, vol. 197, pp. 1–20. doi: 10.1016/j.forsciint.2009.11.013.
2. Weyermann C., Marquis R., Mazzella W., Spengler B. Differentiation of Blue Ballpoint Pen Inks by Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry and High-Performance Thin-Layer Chromatography. *J. Forensic Sci.*, 2007, vol. 52, pp. 216–220. doi: 10.1111/j.1556-4029.2006.00303.x.
3. Bügler J., Buchner H., Dallmayer A. Age Determination of Ballpoint Pen Ink by Thermal Desorption and Gas Chromatography–Mass Spectrometry. *J. Forensic Sci.*, 2008, vol. 53, pp. 982–988. Doi: 10.1111/j.1556-4029.2008.00745.x.
4. Senior S., Hamed E., Masoud M., Shehata E. Characterization and dating of blue ballpoint pen inks using principal component analysis of UV-Vis absorption spectra, IR spectroscopy, and HPTLC. *J. Forensic Sci.*, 2012, vol. 57, pp. 1087–1093. Doi: 10.1111/j.1556-4029.2012.02091.x.
5. Causin V., Casamassima R., Marega C., Maida P., Schiavone S., Marigo A., Villari A. The discrimination potential of ultraviolet-visible spectrophotometry, thin layer chromatography, and Fourier transform infrared spectroscopy for the forensic analysis of black and blue ballpoint inks. *J. Forensic Sci.*, 2008, vol. 53, pp. 1468–1473. Doi: 10.1111/j.1556-4029.2008.00867.x.
6. de Souza Lins Borba F., Saldanha Honorato R., de Juan A. Use of Raman spectroscopy and chemometrics to distinguish blue ballpoint pen inks. *Forensic Sci. Int.*, 2015, vol. 249, pp. 73–82. Doi: 10.1016/j.forsciint.2015.01.027.
7. Williams M. R., Moody C., Arceneaux L.A., Rinke C., White K., Sigman M. E. Analysis of black writing ink by electrospray ionization mass spectrometry. *Forensic Sci. Int.*, 2009, vol. 191, pp. 97–103. Doi: 10.1016/j.forsciint.2009.07.003.
8. da Silva Ferreira P., Fernandes de Abreu e Silva D., Augusti R., Piccin E. Forensic analysis of ballpoint pen inks using paper spray mass spectrometry. *Analyst*, 2015, vol. 140, pp. 811 – 819. Doi: 10.1039/C4AN01617C.
9. Jones R. W., McClelland J. F. Analysis of writing inks on paper using direct analysis in real time mass spectrometry. *Forensic Sci. Int.*, 2013, vol. 231, pp. 73–81. Doi: 10.1016/j.forsciint.2013.04.016.
10. Almeida C. M., Sales D. D., Tosato F., dos Santos N. A., Allochio Filho J. F., Macrino C. J., Pinto F. E., Filgueiras P. R., Romão W. Study of chemical profile and of lines crossing using blue and black ink pens by LDI (+) MS and LDI (+) imaging. *Microchemical J.*, 2019, vol. 148, pp. 220–229. Doi: 10.1016/j.microc.2019.05.002.
11. Kher A., Mulholland M., Green E., Reedy B. Forensic classification of ballpoint pen inks using high performance liquid chromatography and infrared spectroscopy with principal components analysis and linear discriminant analysis. *Vib. Spectrosc.*, 2006, vol. 40, pp. 270–277. Doi: 10.1016/j.vibspec.2005.11.002.
12. Andrasko J. HPLC Analysis of Ballpoint Pen Inks Stored at Different Light Conditions. *J. Forensic Sci.*, 2001, vol. 46, pp. 21–30. Doi: 10.1520/JFS14907J.
13. Samanidou V. F., Nikolaidou K. I., Papadoyannis I. N. Development and Validation of a Gradient-HPLC-PDAD Method for the Identification of Ballpoint Pen Ink Components: Study of Their Decomposition on Aging for Forensic Science Applications. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*, 2004, vol. 27, pp. 215–235. Doi: 10.1081/JLC-120027097.
14. Díaz-Santana O., Conde-Hardisson F., Vega-Moreno D. Comparison of the main dating methods for six ball-point pen inks. *Microchemical J.*, 2018, vol. 138, pp. 550–561. Doi: 10.1016/j.microc.2018.01.045.
15. Fakhari A. R., Breadmore M. C., Macka M., Haddad P. R. Non-aqueous capillary electrophoresis with red light emitting diode absorbance detection for the analysis of basic dyes. *Anal. Chim. Acta*, 2006, vol. 580, pp. 188–193. Doi: 10.1016/j.aca.2006.07.066.
16. Copper C., Erbach T., McDonough M., Drury N., Moini M., Analysis of ballpoint pen inks directly from paper using capillary electrophoresis. *Forensic Chem.*, 2019, vol. 13, article 100145. doi: 10.1016/j.forc.2019.100145.
17. Liu Y.Z., Yu J., Xie M.X., Chen Y., Jiang G.Y., Gao Y. Studies on the degradation of blue gel pen dyes by ion-pairing high performance liquid chromatography and electrospray tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 2006, vol. 1125, pp. 95–103. Doi: 10.1016/j.chroma.2006.05.034.
18. Baygildieva D.I., Krylova A.S., Baygildiev T.M. et al. Studying of Handwritten Strokes Aging Kinetics by High-Performance Liquid Chromatography–Mass Spectrometry. *J. Anal. Chem.*, 2019, vol. 74, pp. 1263–1270. Doi: 10.1134/S1061934819130033.
19. Akhmerova D., Krylova A., Stavrianidi A., et al. Forensic Identification of Dyes in Ballpoint Pen Inks Using LC–ESI–MS. *Chromatographia*, 2017, vol. 80, pp. 1701–1709. Doi: 10.1007/s10337-017-3404-1.
20. Djozan D., Baheri T., Karimian G., Shahidi M. Forensic discrimination of blue ballpoint pen inks based on thin layer chromatography and image analysis. *Forensic Sci. Int.*, 2008, vol. 179, pp. 199–205. Doi: 10.1016/j.forsciint.2008.05.013.
21. Shevchenko T.N., Temerdashev Z.A., Kiseleva N.V. Identification and determination of aromatic dyes in ballpoint pen inks by HPLC with spectrophotometric and mass spectrometric detection. *Аналитика и контроль [Analytics and Control]*, 2012, vol.16, no. 3, pp. 232–239. (in Russian).
22. Kalinichev A.V., Kravchenko A.V., Gryazev I.P., Kechin A.A., Karpukhin O.R., Khairullina E. M., Kartsova L. A., Golovkina A. G., Kozynchenko V. A., Peshkova M. A., Tumkin I. I. Classification of ballpoint pen inks based on selective extraction and subsequent digital color and cluster analyses. *Analyst*, 2022, vol. 147, pp. 3055–3064. Doi: 10.1021/acs.analchem.0c05334.