Новосибирский государственный университет
Факультет естественных наук
Кафедра аналитической химии
Научно-учебно-методический центр "Хроматография"

Курсовая работа

Применение ВЭЖХ для криминалистических исследований чернил рукописных текстов

Выполнила студентка
гр. 0407
Протасова Лидия Николаевна

Научный руководитель
к.х.н., Людмила Алексеевна Кожанова

Новосибирск-2004

Содержание.

Обзор литературы

Введение……...…3

Хроматографические методы…….5

Бумажная хроматография и бумажный электрофорез……5

Тонкослойная хроматография……6

Высокоэффективная жидкостная хроматография……8

Газовая хроматография……...11

Другие методы анализа.....……..11

Методики установления давности выполнения штрихов рукописных текстов…12

Методика №1……..12

Методика №2……..13.

Экспериментальная часть

Оборудование и реактивы……..15

Условия хроматографирования……15

Подготовка пробы……....15

Результаты и обсуждение……...

Литературный обзор.
Методы исследования чернил для шариковых ручек.

Уже более сорока лет при исследовании документов проводят исследования и идентификацию чернил. Правительственные структуры и другие различные юридические и секретные подразделения используют исследование чернил как основной способ определения подлинности сомнительных документов [1].

Записи, выполненные пастами для шариковых ручек, относятся к часто встречающимся объектам судебно-технической экспертизы документов (СТЭД). Необходимость их исследования возникает при выяснении обстоятельств изготовления документа, установлении факта и способа внесения изменений в его содержание, установлении принадлежности частей одному документу, идентификации пишущего прибора (стержня).

Основными задачами исследования штрихов паст для шариковых ручек являются:

1) определение давности выполнения записей
2) идентификация пишущего прибора по штрихам.

Для их решения необходимо:

- знание закономерностей формирования признаков, обусловленных процессом изготовления пасты, временными изменениями в составе и свойствах пасты с момента нанесения штриха, изменениями в составе и свойствах пасты, вызванными агрессивным воздействием окружающей среды;
- наличие методик исследования состава и свойств паст, позволяющих выявить эти признаки в процессе экспертного исследования.

Пасты представляют собой сложные смеси органических соединений, основными компонентами которых являются красители, синтетические смолы и высококипящие растворители. Ввиду малых количеств вещества в штрихах (в штрихе средней интенсивности протяжённостью около 10 мм содержится 10^{-6}-10^{-7} г пасты), методика исследования состава паст должна включать комплекс методов, позволяющих определить химическую природу каждого компонента и оценить его количественное содержание, с пределом обнаружения не ниже 10^{-7}г. [2]

Такие методы, как бумажная хроматография и электрофорез, ТСХ, ВЭЖХ, ГХ, гель-электрофорез, а также новые методы капиллярного электрофореза используются как наиболее пригодные для разделения чернил на составляющие компоненты.

Состав определённых чернил зависит от их назначения и заданных функций. Изменение компонентов чернил в процессе производства меняет такие свойства чернил, как липкость, характеристики высыхания, цвет, текучесть, устойчивость на свету, при нагревании, при смачивании и другие. Что касается письменных принадлежностей, различные виды, такие, как шариковые ручки, фломастеры, гелевые ручки, имеют разные механизмы нанесения на бумагу, поэтому имеют различные требования к свойствам чернил, применяемых в этих ручках.

Например, шариковые ручки толстые и, в основном, содержат более высокие концентрации органических красителей в пасте, чем другие ручки, такие как маркеры, которые характеризуются более высокой текучестью. Естественно, различия в составах некоторых классов письменных принадлежностях могут быть довольно заметными как у разных производителей, так и у одного. Основные категории материалов, используемых в чернилах, показаны в таблице 1.

Компоненты чернил классифицируются по их функциям. Жидкие компоненты делятся на растворители, масла и смолы, которые определяют характеристики текучести, времени высыхания, полярности и др.. Цветной материал может быть добавлен в чернила в качестве комбинации красителей и пигментов. Красители различаются по их растворимости в растворителях, тогда как пигменты включают тонкодисперсные нерастворимые компоненты. Также в чернила могут быть добавлены другие компоненты, такие как воски, пластилины,

осушители. Ознакомление с используемыми материалами и процессами изготовления чернил помогает химикам-криминалистам в выборе наиболее подходящего метода для анализа чернил.

Таблица 1 Основные категории материалов, используемых в чернилах

Компоненты чернил	*Характеристики компонентов*	*Отвечает за следующие свойства*
<u>Окрашивающие материалы:</u> Красители Пигменты	 Кислотные, основные, растворимы в растворителях Мультимолекулярные гранулы, нерастворимые в растворителе	 Проявление
<u>Растворители:</u> Масла Растворители Смолы	Может быть соевое, льняное и др. типы. Различные органические растворители или вода, анализируются при датировке надписей. Некристаллический высокомолекулярный материал, может быть натуральными или синтетическими.	 Характеристики текучести и высыхания
Другие добавки: Осушители Пластилины Поверхностно-активные вещества Воски	 Катализируют окисление сухих масел, многие неорганические соли. Контролируют яркость чернил, содержат растворители с низкой текучестью. Изменяют поверхностное натяжение чернил, обычно содержат мыла или моющие средства Увеличение гибкости и уменьшение ломкости. Могут быть гидрокарбонатные воски, жиры, такие как нефтяное желе	 Характеристики высыхания Стабильность надписи Способность к намоканию Твёрдость/гибкость

Методы определения поддельных документов развивались медленно вплоть до начала 50-х годов. При исследовании документов не рассматривались методы, при которых документ терял свой первоначальный вид. Исследователи документов, за некоторым исключением, не имели достаточной научной базы для определения физических и химических свойств чернил.

До 50-х годов, чернила на документах первоначально исследовались с помощью фотографирования с использованием фильтров для повышения контрастности. Также документы дополнительно исследовались с помощью наблюдения за цветом чернил при различном излучении - от УФ до ИК. Использовались химические реакции для определения меди, ванадия и хрома в жидких чернилах. Эти процедуры помогали различить разные виды чернил. Но это не обеспечивало информацию об индивидуальном составе чернил. [3]

Хроматографические методы.

Бумажная хроматография и бумажный электрофорез.

Начиная с 1950-х годов, для анализа чернил использовали метод бумажной хроматографии. Такие попытки были сделаны благодаря увеличению производства чернил с большим содержанием органических красителей, для определения которых этот метод является наиболее подходящим. Среди первых опубликованных статей по этой теме были методы разделения на компоненты жидких и высохших чернил на полосках фильтровальной бумаги с помощью дистиллированной воды или органических растворителей. В 1954 году метод был разработан для анализа жидких и высохших чернил шариковых ручек с помощью горизонтальной бумажной хроматографии, в которой разделение идёт на круге из фильтровальной бумаги с каплей чернил в центре круга. Подвижная фаза наносится с помощью капилляра в центр фильтровальной бумаги, затем она радиально растекается, и происходит разделение красящих компонентов. В дальнейшем при анализе чернил шариковых ручек горизонтальной бумажной хроматографией были применены органические растворители для того, чтобы попытаться разделить индивидуальные красящие компоненты в жидких чернилах. С помощью горизонтальной бумажной хроматографии можно анализировать различные виды жидких и сухих чернил.

В 1954 году профессор Kirk [4] исследовал электрофорез на бумаге и сравнивал эту технику с бумажной хроматографией.

В 1961 году Crown [5] занимался методом бумажной хроматографии. В качестве растворителей использовались либо чистые вещества, либо смеси растворителей, такие как этилацетат, этанол или нитроэтан и этанол. Но в результате исследователи получили, что ни чистыми растворителями, ни смесями невозможно разделить все красители чернил. Красители были сгруппированы по их цвету или химическим свойствам. Некоторые красители можно группировать по их химическим реакциям с некоторыми химическими реагентами. Например, фталоцианины дают зелёное окрашивание с соляной и серной кислотами, при воспламенении чернил, нанесённых на бумагу, появляется зелёное окрашивание, что говорит о присутствии меди. Голубой краситель "Виктория" окрашивается в коричневый цвет при реакции с кислотами и основаниями, тогда как Родамин Б не реагирует с гидроксидом натрия и окрашивается в оранжевый цвет с соляной кислотой. Также красители дают ярко-розовую флуоресценцию в коротко- и длинноволновом УФ. Эозины окрашиваются в оранжевый цвет с гидроксидом натрия и в жёлтый цвет с соляной кислотой. Подведя итог, исследователи создали схему анализа чернил шариковых ручек:

а) пятно чернил обрабатывается соляной кислотой с использованием пипетки и исследуется изменение цвета;

б) если необходимо, соляная кислота нейтрализуется бикарбонатом натрия и исследуется получившийся в результате цвет;

в) вторичное пятно обрабатывается N,N-диметилформамидом и результат реакции исследуется в коротко- и длинноволновом УФ.

Согласно приведённой схеме нефталоцианиновые чернила можно отделить от фталоцианиновых. Также можно определить наличие или отсутствие Родамина Б.

Метод бумажной хроматографии оставался популярным при анализе чернил до 1960-х годов, но потом был вытеснен более эффективной тонкослойной хроматографией (ТСХ) [3].

Тонкослойная хроматография (ТСХ).

С развитием науки, тонкие слои силикагеля, целлюлозы и других материалов постепенно заняли место фильтровальной бумаги как стационарной фазы. Один «предшественник» современной ТСХ – это дисковая хроматография, которая развивалась в начале 1950-х годов. Требующие проверки образцы чернил экстрагировались подходящим растворителем и помещались в центр круглого диска на сухую подложку из талька и жидкого раствора под микрослайд. Растворитель по каплям постепенно добавлялся в центр подложки, образуя круговую хроматограмму, когда растворитель растекался и вытекал наружу. С тех пор техника ТСХ значительно изменилась. ТСХ - один из наиболее простых и широко распространённых хроматографических методов. В ТСХ неподвижной фазой является слой порошкообразного материала, прикреплённый к гладкой подложке, такой как стеклянная пластина, алюминиевый или пластиковый лист.

Большое количество исследований посвящено оптимизации системы растворителей и стационарных фаз при использовании ТСХ для анализа чернил. Одновременно с уменьшением требуемых для анализа образцов чернил, усовершенствовались методы разделения красителей с помощью экстракции и др. методов. Более того, были получены хорошие результаты при использовании высокоэффективной тонкослойной хроматографии, при которой размеры проб значительно меньше, чем для обычной ТСХ. ТСХ – эффективный метод при анализе чернил шариковых ручек, чувствительных маркеров, чернил для фломастеров и других типов чернил. Однако системы растворителей для письменных чернил часто не подходят для анализа индийских чернил, потому что они содержат большое количество нерастворимых пигментов, которые плохо разделяются с помощью ТСХ с использованием разнообразных систем растворителей, каждая их которых применима лишь к определённым комбинациям пигментов. Более современным способом является применение сразу трёх систем растворителей, последовательно наносимых на поверхность через определённые промежутки времени. Также с помощью ТСХ можно разделить только окрашенные компоненты, а неокрашенные остаются невидимыми и требуют дополнительных процедур по проявлению. Хотя спектральные методы применяют чаще всего перед экстракцией чернил с бумаги, некоторые исследователи нашли эффективным использовать альтернативные источники света, инфракрасную люминесценцию или микроспектрофотометрию для характеристики компонентов, уже разделённых методом ТСХ. [3]

В 1974 Kuranz [6] предложил технику для разделения красителей чернил со сходными Rf. Обычная процедура включает помещение пластины с нанесённым образцом (10 см * 1,6 см) в резервуар с растворителем и удаление её оттуда после элюции.

После высыхания "пятен", определённые части слоя силикагеля и целлюлозы аккуратно удаляются с подложки. Когда активный слой удалён, пластина помещается в проявительную камеру, а затем ещё раз хроматографируется.

После удаления активного слоя хроматографирование проводится другим элюентом, и получается, соответственно, другой результат. Несмотря на частичное совпадение "пятен", чернила различных производителей можно отличить. Эта техника является наиболее эффективной для разделения красителей чернил, в тех случаях, когда невозможно разделить их обычным методом.

В 1976 году Crown [7] предложил свою методику для анализа чернил методом ТСХ. Образцы чернил растворяются в пиридине и наносятся на пластину с силикагелем. В качестве элюента была взята смесь растворителей: этилацетата, этанола и дистиллированной воды (70:35:30 по объёму). Исследователи доказали, что эта система растворителей подходит для разделения большинства видов чернил, но если необходимо, можно использовать другую систему с элюентом н-бутанол / этанол / дистиллированная вода (50:10:50 по объёму). При помощи этой методики исследователи провели довольно успешное и эффективное разделение 720 разных видов чернил.

В 1982 году Tappolet [8] изучал применение Высокоэффективной Тонкослойной Хроматографии (ВЭТСХ) для изучения состава чернил. Он пытался подобрать наиболее подходящие подвижную и неподвижную фазы для разделения чернил разных типов и разных цветов. В эксперименте использовались пластины с Merck-силикагелем, которые помещались в эксикатор на 60 минут для удаления воды с сорбента. В отношении применения ВЭТСХ для анализа жидких чернил исследователи выяснили, что для анализа необходимо разбавление их 1:5 по объёму. Для каждого вида и цвета чернил была подобрана подходящая смесь растворителей для лучшего разделения и приемлемой воспроизводимости результатов анализа: для синих и красных чернил - этилацетат /этанол / дистиллированная вода (75:35:30 по объёму), для чёрных и тёмно-синих - изобутанол / этанол / 99%-ная уксусная кислота / дистиллированная вода (20:5:5:10 по объёму). Также исследователи сделали сравнительную оценку методам ТСХ и ВЭТСХ. ВЭТСХ имеет ряд преимуществ перед ТСХ: скорость разделения, лучшая чувствительность (для анализа нужны меньшие образцы), лучшее качество разделения с лучшей воспроизводимостью.

В 1983 году Blackledge разработал методику разделения и определения компонентов чернил с помощь люминесцентной фотографии их хроматограмм, полученных методом ТСХ. Были протестированы три различных вида пластин и четыре комбинации растворителей, которые представлены в таблице:

№	*Элюент*
1	Этилацетат / этанол / вода (70:35:30 по объёму)
2	Бутан-1-ол/ этанол / вода (50:10:15 по объёму)
3	Ацетон / вода (2:1 по объёму)
4	Бутан-1-ол/ этанол / вода /уксусная кислота (18:2:2:1 по объёму)

Согласно своим исследованиям группа Blackledge [9] сделала вывод, что все четыре элюента подходят для удовлетворительного разделения видимых компонентов чернил, но ни один из элюентов не подходит для разделения чернил, состав которых отличается не качественно, а количественно. После этого исследователями был применён метод ИК-люминесцентной фотографии. Эта методика показала лучшие результаты и оказалась намного чувствительнее, чем предыдущая методика. Следовательно, методики с применением ТСХ показывают блестящие результаты для разделения видимых компонентов чернил, но не подходят для разделения компонентов, которые "видны" только в ИК-люминесценции.

В 1993 году Агинский [10] использовал ТСХ для анализа пигментов, плохо растворимых в различных растворителях. Он выбрал 120 синтетических пигментов, красителей, тонеров для копиров, чернил для письма и чернил для принтеров. Были взяты образцы чернил размером приблизительно 2 - 3 мм^2 . Чернила были удалены с бумаги царапаньем с помощью безопасной бритвы. Образцы были помещены в небольшие сосуды для экстракции. Большинство образцов растворились в очень полярном растворителе, диметилформамиде (ДМФ), а те, которые не растворились в ДМФ, были растворены в концентрированной серной кислоте. Разделение методом ТСХ проводится многоступенчато. С помощью хлороформа (как элюента) можно разделить основные и кислотные красители, но красители на масляной и спиртовой основе нельзя разделить. С помощью элюента: этилацетат / изопропанол / вода /

уксусная кислота (20:15:10:1 по объёму) можно разделить основные, кислотные чернила, чернила на масляной, водной и спиртовой основе. Концентрированная серная кислота подходит для растворения фталоцианинов и других плохо растворимых органических пигментов. В итоге был сделан вывод, что трёхступенчатое разделение методом ТСХ подходит для разделения красящих компонентов большинства чернил, производимых в России.

Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ).

Несмотря на то, что ТСХ остаётся наиболее распространённым методом анализа чернил благодаря его простоте и низкой стоимости, этот метод имеет существенные ограничения. С его помощью невозможно разделить на компоненты различные виды чернил с одинаковым основным составом. Более того, ТСХ не позволяет зарегистрировать бесцветные компоненты чернил. В таких случаях ВЭЖХ может предоставить качественные и количественные данные о цветных и бесцветных компонентах. С помощью ВЭЖХ можно успешно разделить образцы чернил, не разделяемых методом ТСХ. Но ВЭЖХ требует более сложного технического оборудования, больших по размеру образцов чернил и больших денежных затрат, чем ТСХ. В результате, метод ВЭЖХ менее популярен, чем рутинные анализы ТСХ.

В самой первой публикации об анализе чернил методом ВЭЖХ Lyter [11] писал о применении нормально-фазовой колонки для разделения чернил шариковых ручек с использованием смеси дихлорэтан:этанол:формамид (89:10:1) в качестве подвижной фазы. Затем большинство исследователей начали применять обращённо-фазовые системы. Позже Lyter разделил десять видов чернил для шариковых ручек, которые невозможно было разделить методом ТСХ. Он писал, что с помощью ВЭЖХ можно увидеть тонкие различия между чернилами одного производителя. При разделении используется колонка с обращённой фазой С-18 с подвижной фазой ацетонитрил : вода (80:20) с 5мМ реагентом Pic B-7 (гептилсульфонат натрия). Keto представил метод анализа щелочного голубого красителя в чернилах для принтеров, одного из экстрагируемых компонентов таких чернил. Он использовал градиентное элюирование с системой растворителей метанол : вода и колонкой С-18. Во всех экспериментах использовалась одно- или двухволновое детектирование.

Другие исследователи использовали многоволновое детектирование, которое особенно необходимо, потому что с его помощью генерируются как хроматографические, так и спектральные данные, что помогает лучше идентифицировать компоненты. При анализе чернил для шариковых ручек White и Wheal's [1] использовали детектор с вращающимся диском, который быстро сканирует четыре длины волны, что даёт дополнительную спектральную информацию. Они протестировали три обращённо-фазовых колонки и оптимизировали состав элюента – ацетонитрил : тетрагидрофуран : вода (924:432:644). Tebbett и др. показали, что использование детектора, сканирующего на длинах волн в диапазоне от 200 до 800 нм, подходит для разделения близких по составу чернил. Они попробовали пять комбинаций подвижной и неподвижной фаз и показали, что наиболее эффективным оказалось использование колонки Spherisorb 5 μm ODS и подвижной фазы ацетонитрил : вода (80:20) с 0.005 М гептансульфоновой кислотой при pH=4.7. Такая методика позволяет использовать меньшие количества чернил (до пикограммов). В 1993 году, Lofgren и Andrasko сообщили, что при анализе на обращённой фазе можно использовать тройное детектирование: в видимом диапазоне, в УФ-диапазоне и флуоресценцию. Кроме того, они описали последующую экстракцию чернил с бумаги.

В 1977 году Colwell [12] исследовал чернила для шариковых ручек с применением ВЭЖХ. Надпись была экстрагирована с бумаги с помощью шприца. Разделение проводилось на колонке (25 см длиной) с силикагелем с 2% формамидом в метаноле в качестве элюента. Различие в чернилах для шариковых ручек основаны на содержании в них различных красителей. Colwell также упомянул о такой возможности метода ВЭЖХ, как определение растворителя (смол, регуляторов вязкости и т.д.). Для определения компонентов растворителя

в чернилах была использована элюция 2%-ым изопропанолом в гептане при детектировании на длине волны 254 нм. Также было сделано предположение, что различия в бумаге, на которую наносились те или иные чернила, являются препятствием для определения, если бумага содержит поглощающие в УФ компоненты.

Для дальнейшего исследования чернила были удалены с бумаги с помощью шприца экстракцией в 2%-ый формамид в метаноле. В результате было выяснено, что бумага не содержит мешающих компонентов, следовательно различия в бумаге не мешают анализу. Если использовать слабый растворитель 2%-ый изопропанол в гептане, результат получался тот же. Затем три пробы чернил были по отдельности экстрагированы и далее хроматографированы для проверки воспроизводимости.

В 1982 году Lyter [12] анализировал чернила для шариковых ручек методом ВЭЖХ. На ватман были нанесены 10 разных чернил для шариковых ручек, которые невозможно было разделить методом ТСХ. С бумаги было взято по три образца каждого вида чернил с помощью иглы (количественно это составило приблизительно по 0.5 μг чернил каждого вида). Все образцы были проэкстрагированы 20 μл пиридина, были отобраны аликвоты по 10 μл, и экстракты были проанализированы с помощью ВЭЖХ. В качестве подвижной фазы была использована смесь растворителей (ацетонитрил / 0.005 М водный раствор реагента Pic B-7 (гептилсульфонат натрия) (80:20 по объёму)), поток составлял 2 мл/мин, колонка μ Bondapak C-18. Детектирование проводилось на двух длинах волн (УФ/ видимая области) - 254 и 546 нм.

По результатам работы был сделан вывод о том, что данная ВЭЖХ-система пригодна не только для качественного, но и для количественного анализа чернил для шариковых ручек.

В 1984 году Keto [13] изучал характеристики щелочного синего пигмента в поддельной валюте с использованием ВЭЖХ. Щелочной синий пигмент (пигмент синий 19, Cl N.42750:1) является синтетическим органическим пигментом, который часто используется в книгопечатании, добавляется в офсетные чернила для уменьшения интенсивности коричневого оттенка.

Были взяты 10 образцов пигмента разных производителей и растворены в метаноле. Для анализа была использована колонка Bondapak с обращённой фазой C-18 (30 см * 4 мм Ø), элюенты: метанол / вода (1:2 по объёму) – A, 100%-ый метанол – B, градиент 10% - 100% B за 15 минут.

Исходными реагентами при изготовлении щелочного синего являются анилин и формальдегид, синтез проходит в 5 стадий. В итоге получается продукт, состоящий из смеси различных веществ, относительное содержание которых зависит от степени превращения. Изготовители стараются контролировать процесс при помощи регулировки температуры и с использованием катализаторов.

В итоге Keto выяснил, что красители типа щелочного синего трёх разных производителей значительно отличаются по составу.

В 1988 году Griffin [14] разработал методику с использованием ВЭЖХ для разделения основных красителей. Стандартные образцы красителей были приобретены у Ciba Geigy Company, колонка Phase Sep Spherisorb (5 μм). Для анализа был использован детектор с фотодиодом, а в качестве одного из элюентов был взят ацетат аммония (pH = 9,76), приготовленный смешением 94 мл концентрированного аммиака и 21,6 мл концентрированной уксусной кислоты с 884 мл дистиллированной воды. Также было выяснено, что при использовании смеси метанол – вода (pH = 9,7) как второго элюента, происходит приемлемое разделение 21-го основного красителя.

В 1989 году White [15] предложил оптимальную ВЭЖХ-систему для разделения кислотных красителей и их идентификации с использованием многоволнового детектирования и величин спектральных отношений. Были подобраны оптимальные условия разделения: колонка с полистирол-дивинилбензоловым сорбентом (5 μм), элюент ацетонитрил/вода (50:50 по объёму) с pH=9,0 , содержащий лимонную кислоту (0,7 г/л) и гидросульфат тетрабутиламмония (3,396 г/л; 0,01М). White отметил, что существует большая

группа красителей, для которых различие во временах удерживания разных компонентов мало. А результаты экспериментов White показали, что с помощью многоволнового детектирования и использования значений спектральных отношений можно добиться значительно лучшего разделения компонентов с близкими значениями времён удерживания. Чтобы использовать в анализе спектральные отношения, необходимо одновременное детектирования на нескольких длинах волн. Среди выбранных длин волн выбирается «основная», значение которой различно для красителей разных цветов: жёлтый или зелёный – 400нм; оранжевый, розовый или красный – 500нм; пурпурный – 590нм. Далее рассчитываются спектральные отношения. Например, для «основной» длины волны 500 нм рассчитываются отношения A_{500}/A_{590}, A_{500}/A_{550}, A_{500}/A_{540} и т. д.. В результате было получено, что 52 вида красителей можно успешно разделить и идентифицировать с помощью многоволнового детектирования и спектральных отношений, даже если времена удерживания почти совпадают.

Tebbet [16] упомянул, что существуют две основные проблемы, связанные с использованием ВЭЖХ для анализа чернил: недостаточная чувствительность (необходимо анализировать штрихи длиной 1 см) и необходимость использования многоволнового детектирования.

Для начала 113 разных образцов чернил были разделены на 17 подгрупп на основании ТСХ-анализов. Затем образцы чернил в каждой группе были разделены с помощью ТСХ и ВЭЖХ. Для экстракции была использована та же смесь, что и для элюции. При анализе использовалась колонка Spherisorb 5μм C-18, детектирование проводилось между 200 и 800 нм для компонентов, поглощающих в видимой и УФ-области. Также для лучшего разделения были применены различные элюенты, которые представлены в таблице:

№	*Элюенты*
1	Ацетонитрил / вода (80:20 по объёму) с 0,005 М гептан сульфокислотой и 0,02% уксусной кислотой
2	Дихлорэтан / этанол / формамид (89:10:1 по объёму)
3	Ацетонитрил / тетрогидрофуран / вода (924:432:644 по объёму) с лимонной кислотой (1,75 г/л) и гексан сульфокислотой (0,75 г/л)
4	Метанол / вода (60:40 по объёму) с 0,0058 М фосфатом тетра-n-бутил-аммония с pH = 7,2
5	Метанол / раствор ацетата аммония (pH = 9,7) (9:1 по объёму)

Хроматограмма каждого вида чернил была получена на разных длинах волн от 200 до 800 нм, идентификация пиков была проведена по УФ-спектрам. Далее было проведено сравнение пиков с одинаковыми значениями времён удерживания на разных хроматограммах с помощью сравнения УФ-спектров пиков и их первых и вторых производных. Исследователи заключили, что оптимального разделения можно добиться при использовании следующих условий: колонка Spherisorb 5μм ODS, подвижная фаза ацетонитрил / вода (80:20 по объёму) с 0,005М гептан сульфокислотой с pH = 4,7, поток – 1мл/мин, длины волн – от видимой до УФ-области спектра. 108 из 113 образцов чернил были разделены и идентифицированы в данных условиях. Большим преимуществом является то, что можно одновременно получать и спектральные, и хроматографические данные при небольших размерах образцов (для анализа достаточно штриха длиной 0,5 мм).

В 1993 году Lofgren [17] разработал метод анализа чернил для принтеров с помощью ВЭЖХ. Экстракция была проведена при нагревании образца несколько минут в дихлорметане, и далее проводилась реэкстракция 2%-й HCl в метаноле. Было показано, что большинство образцов удовлетворительно перевелось в раствор с помощью этих двух ступеней (экстракции и реэкстракции). Остаток чернил удалялся с бумаги нагреванием образца до 80^0C в пиридине в течение 5 минут. Использование пиридина оказалось необходимым только для синих чернил для принтеров. Но некоторые тёмно-синие чернила не

удалялись полностью с бумаги даже в таких условиях. Неэкстрагируемый остаток на бумаге – это различные фталоцианиновые красители, нерастворимые в растворителях, устойчивые к нагреванию и к свету. Были опробованы 4 разных элюента для разделения образцов на компоненты. И только один оказался непригодным для данного анализа. Комбинация низкого pH и использования ион-парного реагента $LiClO_4$ в качестве элюента обеспечивает отличное разделение и приемлемые времена удерживания. Использование ацетонитрила вместо метанола улучшает эффективность разделения, а также базовую линию при градиентной элюции. Наилучшее разделение было достигнуто при использовании в качестве элюентов: А – 30% ацетонитрила + 70% воды с 10мМ $KClO_4$ (pH = 3,0) с $HClO_4$ и Б – 100% ацетонитрил в градиенте. Были использованы 2 детектор: фотодиодный (254 – 350 нм) и флуоресцентный (550 нм). Мощность этих детекторов позволяет достичь хороших результатов разделения и определения. Эта методика была применена к анализу поддельных счетов оплаты страховых полисов. Анализ был сделан при помощи сравнения поддельных документов с настоящими. Состав чернил для принтеров в поддельных и подлинных документах отличался и качественно, и количественно.

Газовая хроматография (ГХ).

Т.к. большинство видимых компонентов чернил являются нелетучими, ГХ обычно применяется при датировании, при котором анализируются летучие компоненты, растворимые в подходящем растворителе.[1] По мере старения паст шариковых ручек в штрихах содержание летучих компонентов паст постепенно уменьшается в течение определённого промежутка времени, зависящего от состава пасты и условий хранения исследуемого документа. Также при анализе используется комбинация ГХ и спектрофотометрии (или количественной ТСХ) для количественного определения соотношений концентраций любого летучего и любого окрашенного компонентов исследуемой пасты: по мере старения пасты величины этих соотношений уменьшаются. Также применяется газохроматографическое определение степени экстракции летучих компонентов паст «слабым» растворителем: чем старее паста, тем меньше степень экстракции. [18]

Другие методы анализа.

Перспективными методами исследования неокрашенных компонентов являются ИК-Фурье-спектроскопия, ГЖХ с использованием термодесорбции летучих компонентов из штриха, хромато-масс-спектрометрия. Благодаря высокой чувствительности хромато-масс-спектрометрического метода, он применяется при исследовании единичных штрихов протяжённостью около 10 мм. [2]

ИК-Фурье спектроскопия.

При старении ряда паст шариковых ручек в штрихах наблюдается уменьшение соотношения интенсивностей полос поглощения, соответствующих гидроксильной и метильной группам. При исследовании методом ИК-Фурье-спектроскопии получают суммарные характеристики структурно-группового состава основных компонентов паст, содержание которых не изменяется во времени (смол, красителей). По ИК-спектру можно дифференцировать пасты, имеющие одинаковый состав красителей, но различающиеся по виду смолы, а также пасты с одинаковым качественным составом, но с различным относительным содержанием смол и красителей. Методика анализа штрихов при этом

включает экстракцию пасты из штриха, получение микроплёнки на солевом окне и регистрацию спектра с помощью ИК-Фурье-спектрофотометра, соединённого с ИК-микроскопом. [2]

Методики установления давности выполнения штрихов рукописных текстов.

По результатам исследования состава паст отечественного и зарубежного производства определены классификационные признаки для паст фиолетового, синего и чёрного цветов, что позволяет в пределах каждого цвета провести многоуровневую дифференциацию паст по составу как основных, так и примесных компонентов.

В основе решения идентификационных задач в отношении штрихов одного цвета лежит их дифференциация на группы, выделяемые по специфике состава паст. [2]

Анализ экспертной практики показал, что при решении задач по установлению подлинности документа объектами исследования нередко становятся записи, выполненные пастами зарубежного производства фиолетового, синего и чёрного цветов, не содержащих фталоцианинового красителя. Основным растворителем в них является фенилгликоль. К этой группе относятся пасты фирм Италии, Франции, Германии, Турции, Венгрии и т.д.. Они содержат, как правило, один из триарилметановых красителей: типа либо Жирорастворимого Фиолетового К (ЖФК), либо Кристаллического Фиолетового (КФ), либо Виктории F4 R (BF4R) в сочетании с другими красителями, например, с триарилметановым красителем Гектосиним В (ГС). [19]

Определение относительного содержания фенилгликоля в штрихах паст для шариковых ручек.

Предлагается методика определения относительного содержания фенилгликоля в штрихах паст, содержащих фталоцианиновые красители. Методика является результатом экспериментальных исследований паст отечественного производства синего и фиолетового цветов, содержащих красители Жирорастворимый фиолетовый К и Спирторастворимый голубой фталоцианиновый. Её основа - определение фенилгликоля в штрихе методом газожидкостной хроматографии (ГЖХ) с использованием термодесорбции летучих компонентов из штриха с последующим определением относительного содержания фталоцианинового красителя по спектру поглощения экстракта пасты из этого штриха в диметилформамиде (ДМФА).

В состав паст для шариковых ручек, выпускаемых в России и некоторыми зарубежными фирмами, в качестве растворителя вводится фенилгликоль. Испарение фенилгликоля из пасты с момента нанесения штрихов происходит медленно (в течение 2 -5 лет), поэтому относительное содержание фенилгликоля в пасте может служить объективной характеристикой возраста штрихов в документе. Для оценки содержания фенилгликоля в пасте внутренним стандартом выбран краситель (композиция красителей), содержание которого в пасте практически не меняется во времени и, следовательно, пропорционально количеству пасты в штрихах.

Исследование пасты осуществляется по следующей схеме:

1. Определение композиции основных устойчивых (по времени) компонентов пасты: красителей и смолы. Если композиция красителей соответствует стандартной отечественной рецептуре, то проводят определение в пастах смолы типа ФЛ-326 с помощью качественной реакции азосочетания с диазобензолсульфокислотой.

По результатам исследования композиции красителей и типа смолы делается вывод о соответствии (несоответствии) паст в исследуемых штрихах стандартным отечественным рецептурам, образцам паст зарубежного производства конкретных фирм.

2. Определение фенилгликоля в штрихах паст проводится методом ГЖХ. Экспериментально установлено, сто при 200^0С может произойти термодеструкция бумаги. Образующиеся летучие продукты имеют время удерживания, близкое к времени удерживания фенилгликоля, поэтому параллельно с анализом вырезок из штрихов проводят ГЖХ-анализ вырезок из свободных участков бумаги изучаемых объектов и фиксируют на хроматограмме высоту пика с временем удерживания, близким к фенилгликолю. Далее рассчитывается, есть ли в данном образце фенилгликоль.

Экспериментально получено, что фенилгликоль достоверно может быть определён в штрихах отечественных паст синего и фиолетового цветов давностью заполнения до 4-х лет (на момент измерения).

3) Далее проводят расчёт относительного содержания фенилгликоля в пасте. Содержание фенилгликоля в анализируемом объёме пасты относят к содержанию в нём фталоцианинового красителя. Содержание фталоцианинового красителя в пасте определяют по спектру поглощения экстрактов пасты в ДМФА.

Рассмотренная методика позволяет категорически решать вопросы определения абсолютной давности записей в отношении документов, выполненных незадолго до назначения экспертизы и датированных более ранним временем. [2]

Методика №2.

В ЭКЦ МВД России в течение ряда лет также проводились исследования в рамках данной проблемы. В результате установлено, что для определения возраста записей, выполненных пастами шариковых ручек, могут быть применимы следующие подходы:

- определение возрастных изменений бесцветных нелетучих компонентов паст методом ТСХ: изменение компонентного состава паст при их старении обнаруживается при осмотре результирующих тонкослойных хроматограмм в УФ-свете (при использовании хроматографических пластин с УФ-добавкой) и оценивается количественно с помощью специально разработанной методики, позволяющей корректно использовать метод сканирующей денситометрии для оценки относительного содержания разделённых компонентов;
- газохроматографическое определение степени экстракции летучих компонентов паст «слабым» растворителем: чем старее паста, тем меньше степень экстракции;
- также при анализе используется комбинация ГХ и спектрофотометрии (или количественной ТСХ) для количественного определения соотношений концентраций любого летучего и любого окрашенного компонентов исследуемой пасты: по мере старения пасты величины этих соотношений уменьшаются;
- определение скорости изменения цвета пасты при взаимодействии с парами реагентов (используя методы микроспектрофотометрии и микроденситометрии): чем старее паста, тем меньше скорость реакции с реагентом;
- микроспектрофотометрическое определение изменений массового соотношения сравнительно нестабильного и стабильного компонентов красителей в поверхностном слое исследуемых штрихов паст путём сравнения соответствующих этим компонентам спектральных коэффициентов отражения, измеренных при нормальном (неполяризованном) освещении и в поляризованном свете: чем больше давность выполнения исследуемого штриха, тем меньше значение указанного массового соотношения.

Одно из перечисленных направлений исследования, базирующегося на определении степени экстракции летучих компонентов паст «слабым» растворителем, оказалось наиболее эффективным с точки зрения надёжности и достоверности получаемых результатов.

Разработанная в ходе денного исследования методика описывается определённой последовательностью операций. [1]

Таким образом, ВЭЖХ имеет ряд преимуществ перед другими методами исследования чернил для шариковых ручек:

- с помощью ВЭЖХ можно различать чернила с близким основным составом;
- в ВЭЖХ есть возможность регистрировать одновременно и краситель, и растворитель в чернилах;
- ВЭЖХ имеет большую чувствительность по сравнени с ТСХ
- достоинством ВЭЖХ с УФ-детекцией является возможность одновременного разделения и определения компонентов по спектральным данным;

Экспериментальная часть.

I. Оборудование и реактивы.

Все анализы были проведены на микроколоночном высокоэффективной жидкостном хроматографе "Милихром А-02".

В качестве объектов анализа были взяты 12 образцов чернил и несколько индикаторов:
образец № 1 - фиолетовые чернила E 02/03;
образец № 2 - сине-фиолетовые чернила Stabilo 0800 F 93;
образец № 3 - фиолетовые чернила Universal INOX 02 03;
образец № 4 - чёрные чернила PX-6;
образец № 5 - чёрные чернила LD 12.01;
образец № 6 - чёрные чернила*;
образец № 7 - красные чернила*;
образец № 8 - чёрные чернила Zebra H-077 02.06 Japan;
образец № 9 - сине-фиолетовые чернила*;
образец № 10 - фиолетовые чернила PX-11;
образец № 11 - синие чернила*;
образец №12 – зелёные чернила*;
образец №13 – фиолетовые чернила на бумаге (штрих выполнен в 2001 году)*.

** - чернила неизвестного производства*

Индикаторы: кристаллический фиолетовый (чда), малахитовый зелёный (чда), тимоловый синий (чда), бромтимоловый синий (чда), Нильский синий Б, бромфеноловый синий (чда).
Реактивы: метанол (чда), вода бидистиллированная, ацетат натрия.

II. Условия хроматографирования.

λ = 250, 260, 270, 280, 300, 350 нм; **t** = 35^0C; **пост. времени** = 0,1 сек; **колонка** prontoSIL-120-5-C18 AQ#80303 (Бишоф, Германия) 2x75мм, dp = 5 мкм; **элюенты**: А – 2 мл 1М раствора ацетата натрия (pH 5) + 100мл бидистиллированной воды; Б - 2 мл 1М раствора ацетата натрия (pH=5) + 98 мл абсолютного метанола (чда); **метод** однолучевой; **объём пробы** 3 мкл; **элюция** 12 мин линейный градиент Б от 40 до 100%, 2,7 мин изократический режим 100%Б; $\mathbf{V_{общ}}$ = 2200 мкл; **регенерация** 600 мкл; **поток** 150 мкл/мин, **максимальное давление** 3,5 МПа.

III. Подготовка пробы.

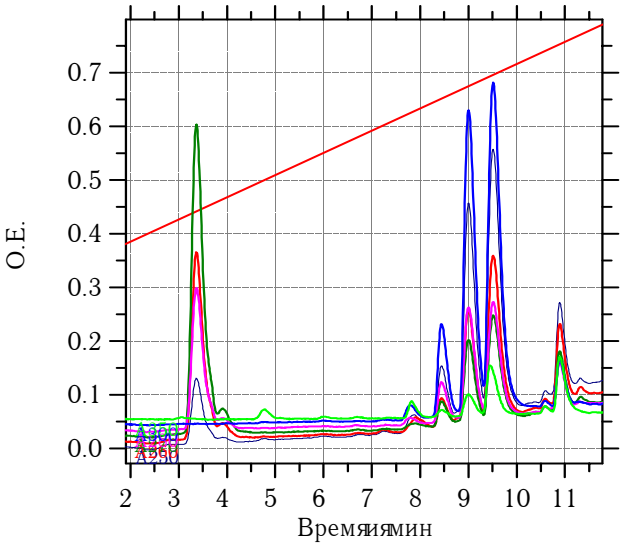
Небольшое количество чернил всех образцов, кроме №13, было извлечено из стержней с помощью медицинской иглы. Все образцы были растворены в 50 мкл абсолютного метанола, отцентрифугированы (15 мин, 13400 об/мин) и далее хроматографированы.

IV. Результаты и обсуждение.

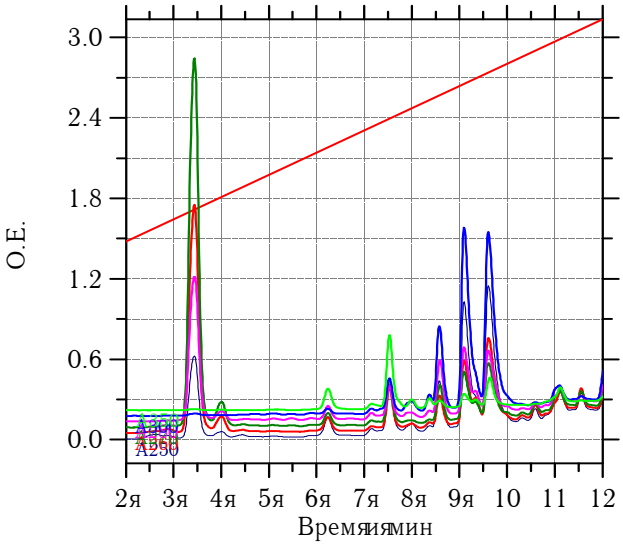
1. Получены хроматографические профили различных чернил: фиолетовых, чёрных, синих, зелёных, красных (рис 1).

РИСУНОК 1

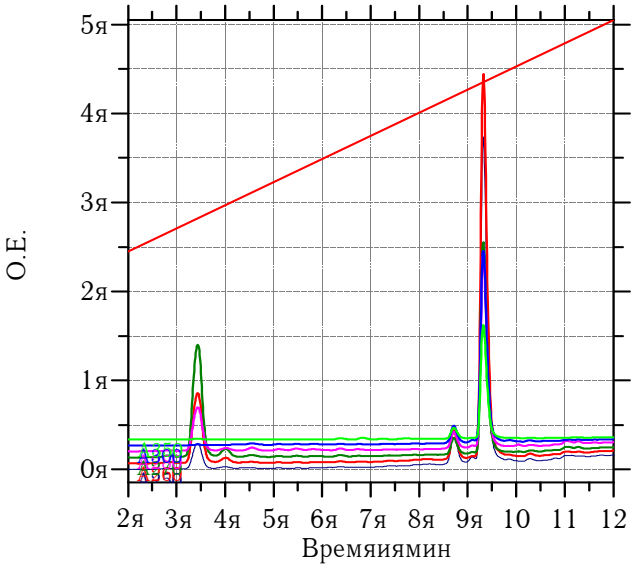
Образец 1, фиолетовые чернила



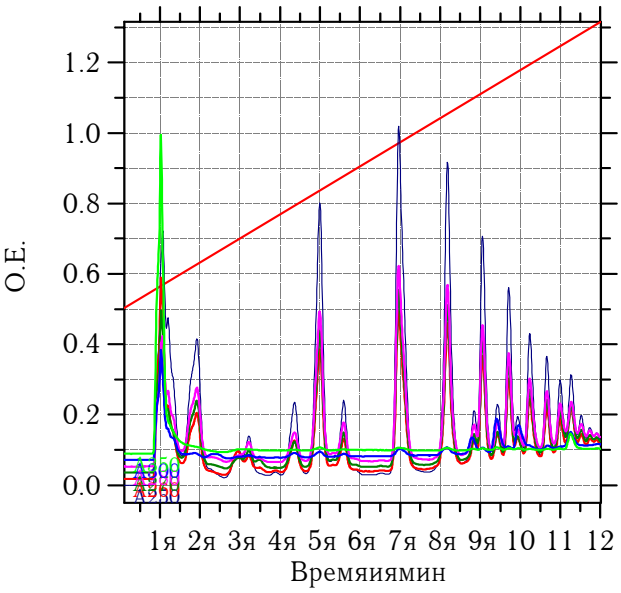
Образец 6, чёрные чернила



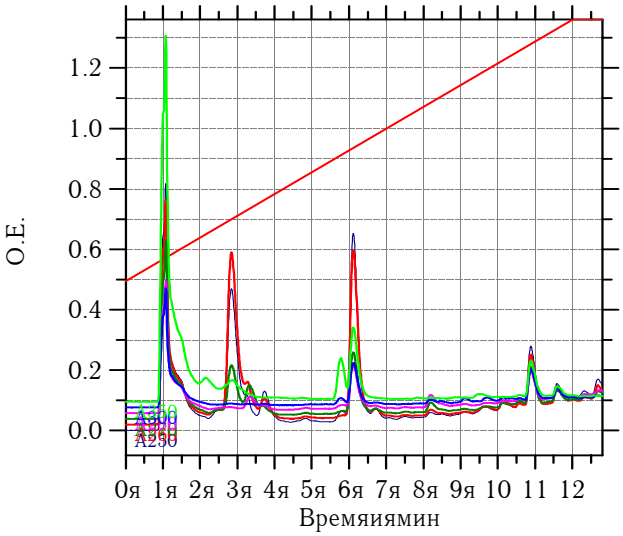
Образец 7, красные чернила



Образец 11, синие чернила



Образец 12, зелёные чернила



Было показано, что:

а) все образцы чернил имеют разные пики с различными спектральными характеристиками (рис.2).

б) фиолетовые и чёрные чернила имеют одинаковые группы пиков с одинаковыми спектральными характеристиками (рис.3, табл. 1).

РИСУНОК 2

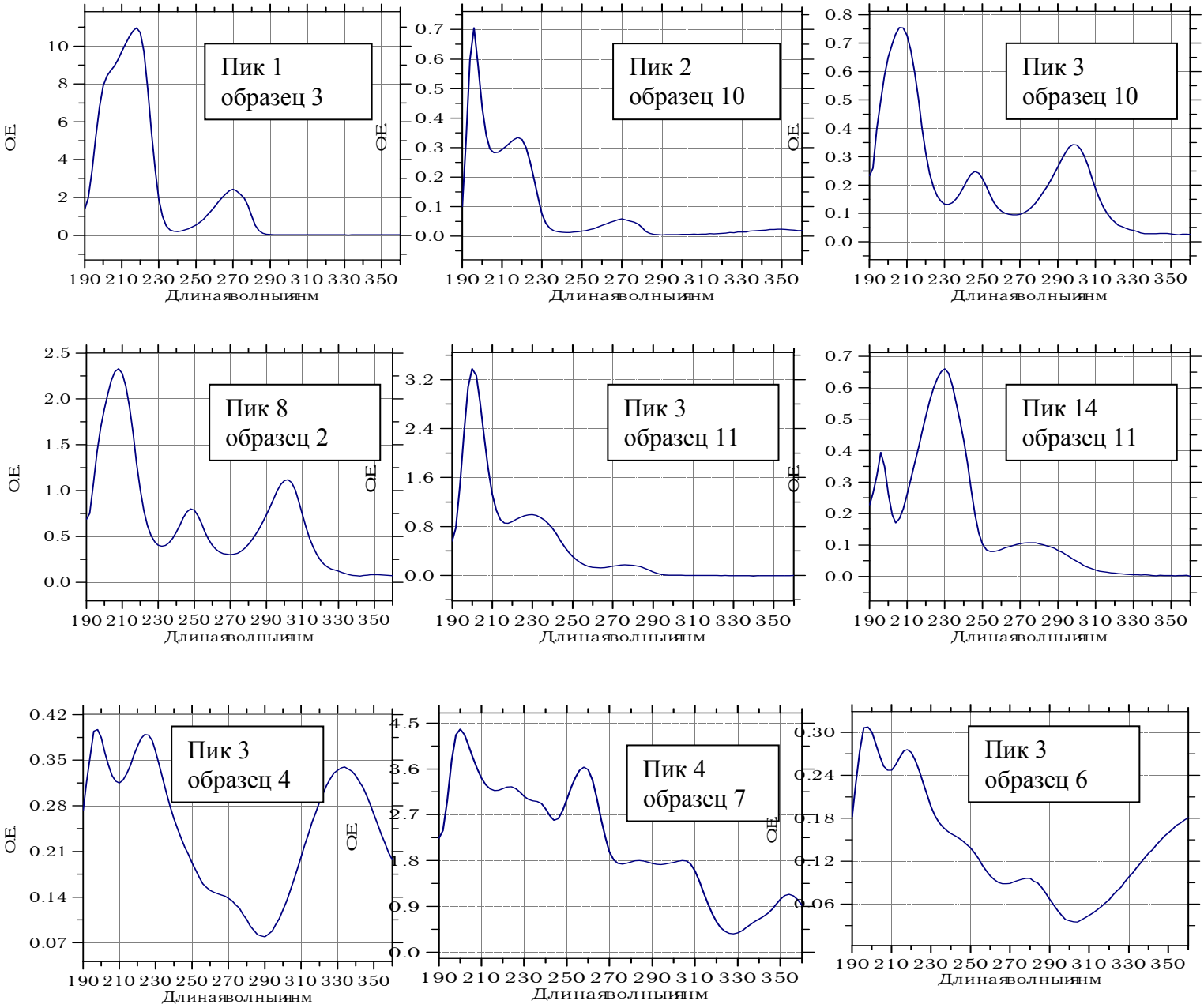
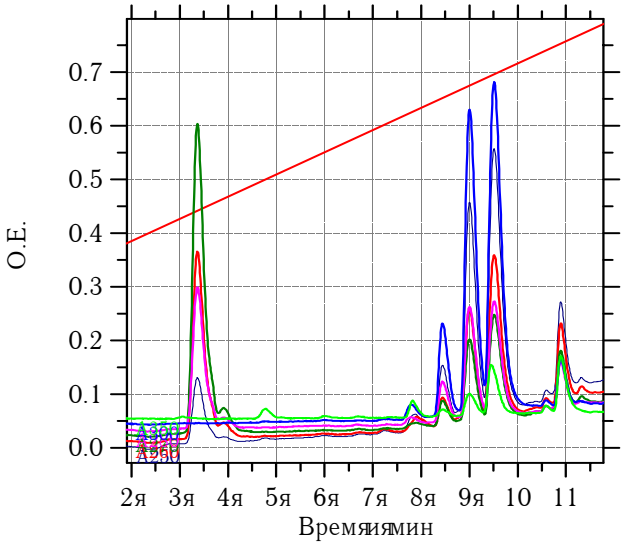
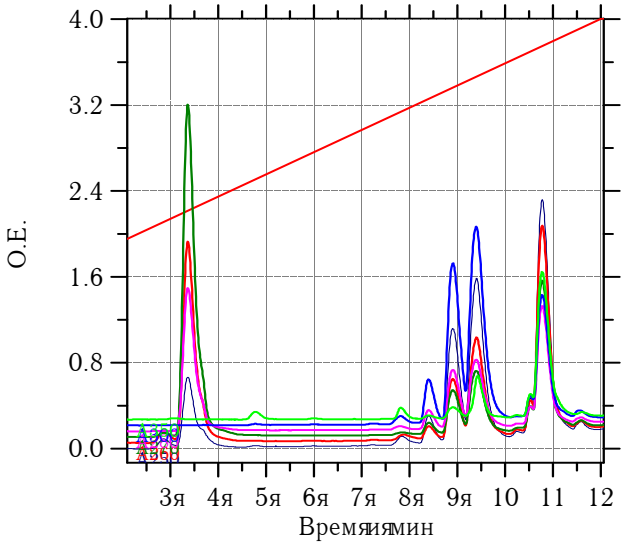


РИСУНОК 3

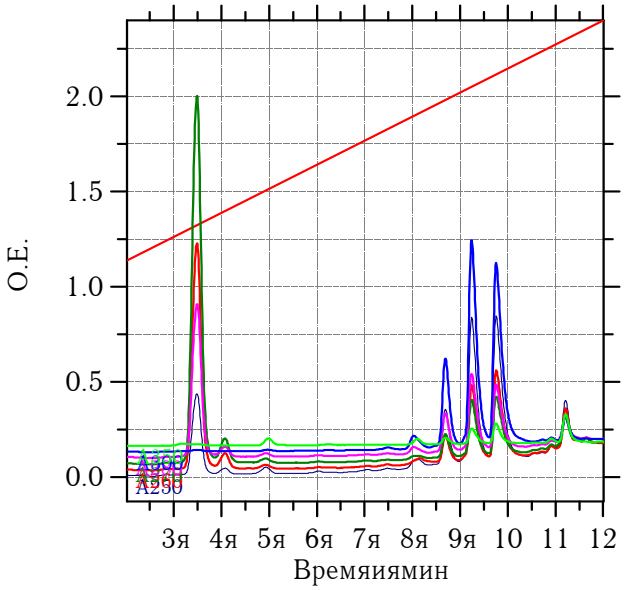
Образец 1, фиолетовые чернила



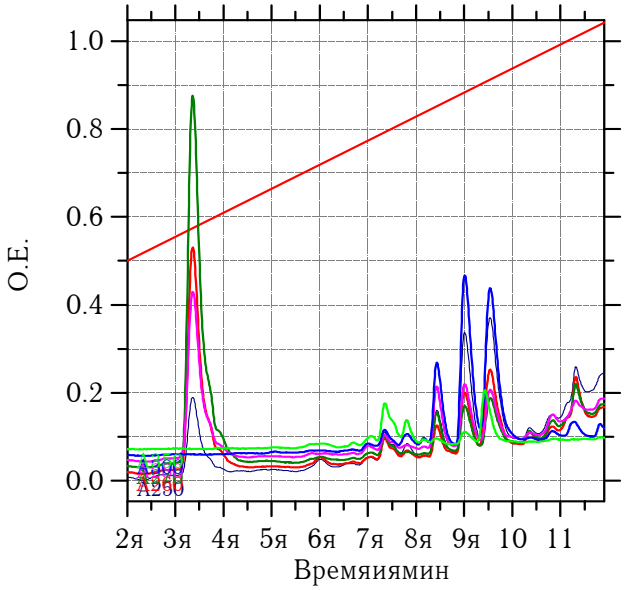
Образец 2, фиолетовые чернила



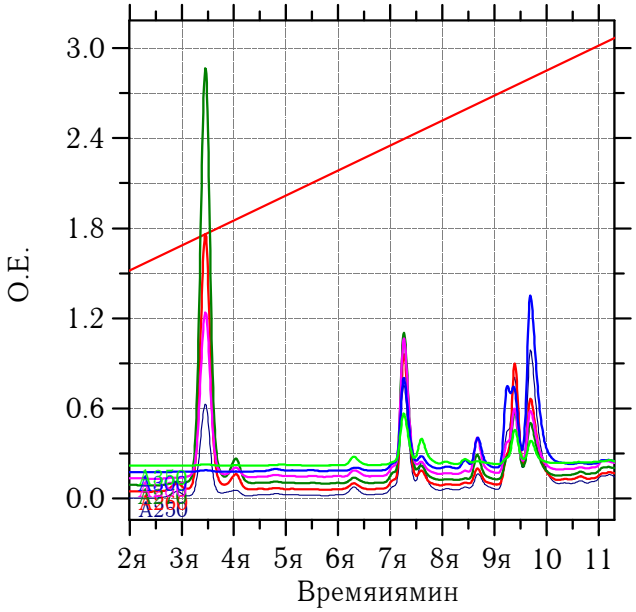
Образец 3, фиолетовые чернила



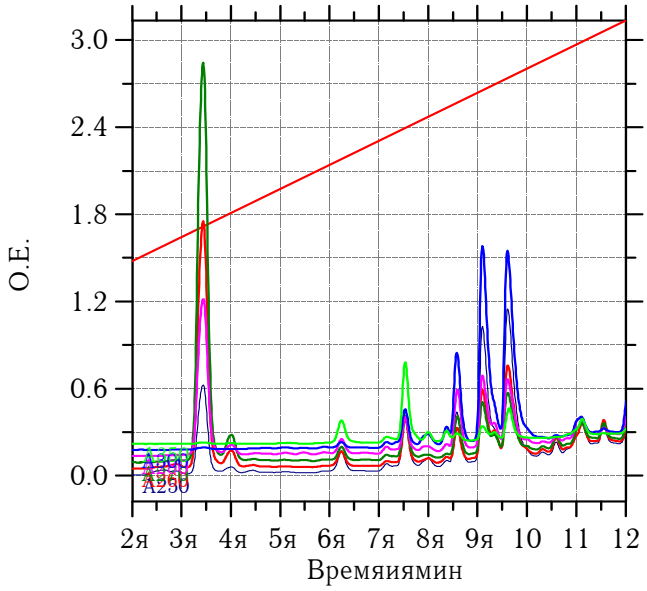
Образец 4, чёрные чернила



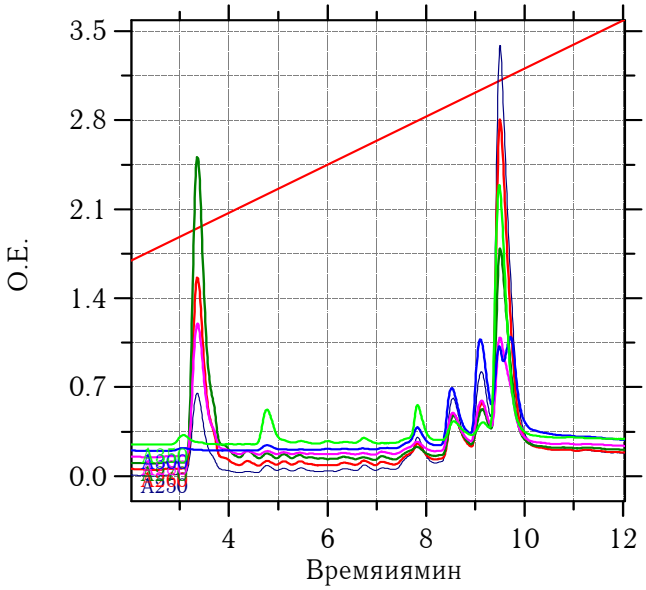
Образец 5, чёрные чернила



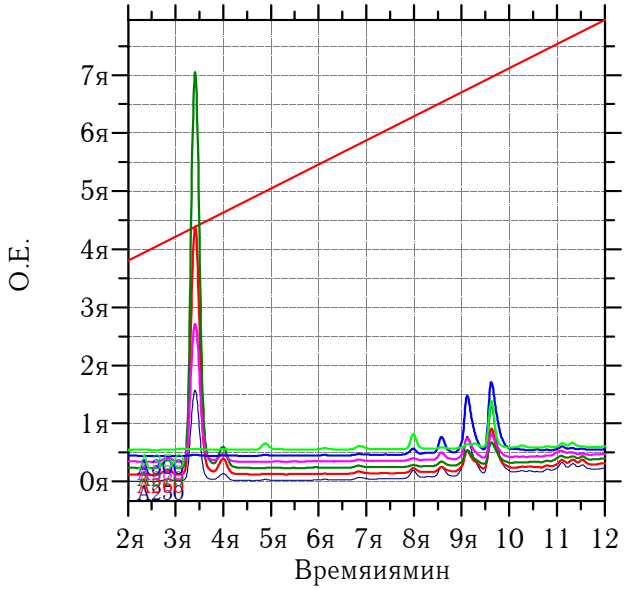
Образец 6, чёрные чернила



Образец 8, чёрные чернила



Образец 9, фиолетовые чернила



Образец 10, фиолетовые чернила

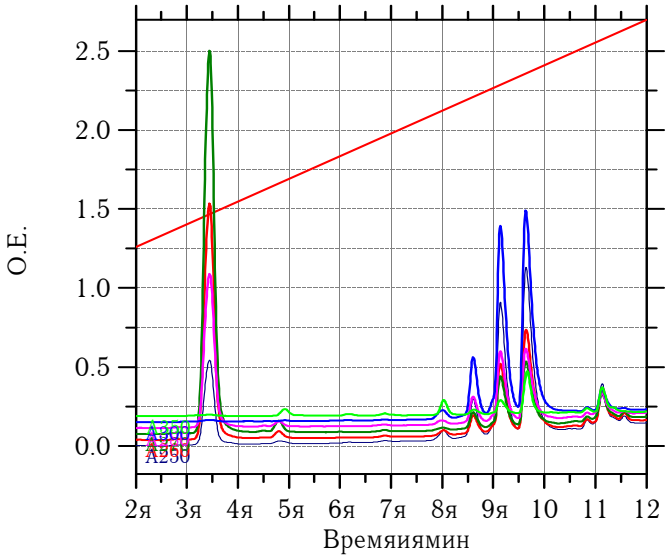


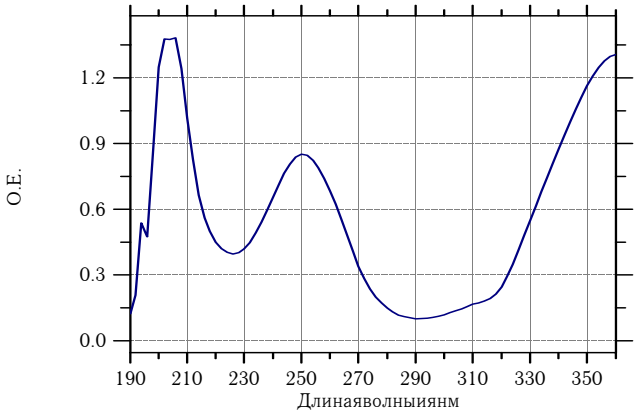
ТАБЛИЦА 1

λ, нм	Пик 1 из серии пиков			Пик 2 из серии пиков			Пик 3 из серии пиков		
	Обр 2	Обр 6	Обр 9	Обр 2	Обр 6	Обр 9	Обр 2	Обр 6	Обр 9
250	0,639978	0,598417	0,66129	0,718389	0,725227	0,674668	0,80084	0,829758	0,711882
260	0,304395	0,338739	0,326613	0,373185	0,3906	0,337079	0,489348	0,521332	0,36962
300	1	1	1	1	1	1	1	1	1
310	0,571052	0,556231	0,546554	0,693651	0,660885	0,655669	0,892779	0,861993	0,872619
330	0,115034	0,112173	0,11327	0,110567	0,098848	0,114913	0,116677	0,137177	0,106914
340	0,075947	0,07578	0,075147	0,060943	0,052456	0,050184	0,060235	0,09155	0,060325
350	0,07777	0,073656	0,076246	0,073386	0,077738	0,075802	0,066745	0,11223	0,074061

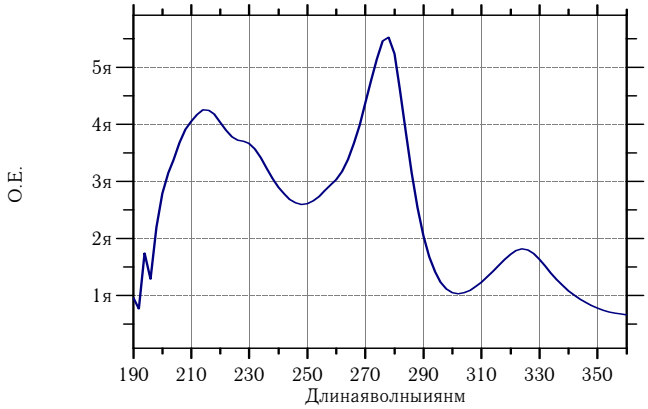
2. С целью идентификации красителей, входящих в состав чернил были проанализированы литературные спектры из библиотеки спектров НИОХ СО РАН. Также были записаны спектры поглощения доступных триарилметановых и некоторых других красителей (табл. 2, рис.5).

РИСУНОК 5

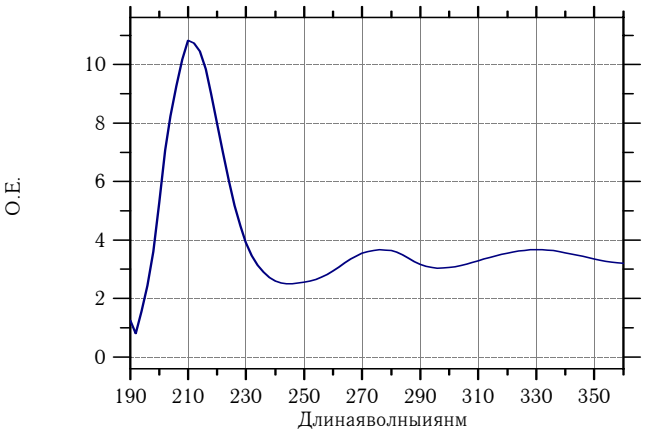
Малахитовый зелёный



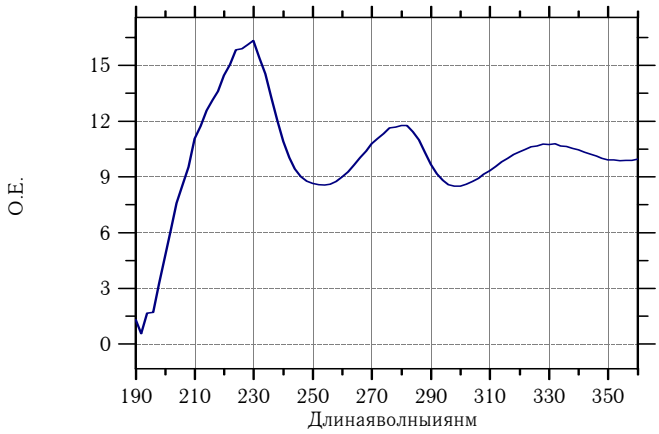
Нильский синий Б



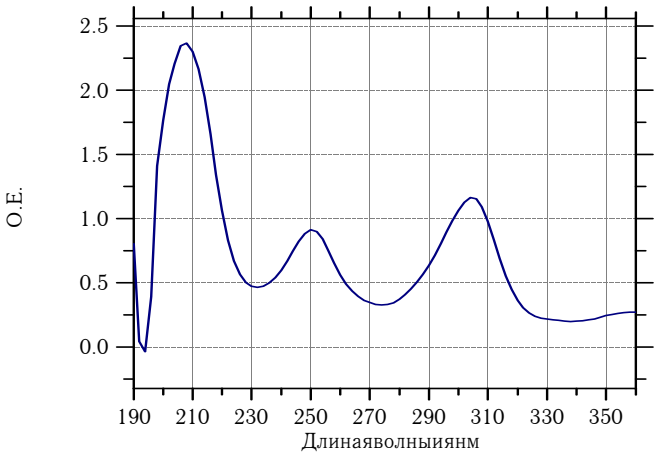
Тимоловый синий



Бромтимоловый синий



Кристаллический фиолетовый



Бромфеноловый синий

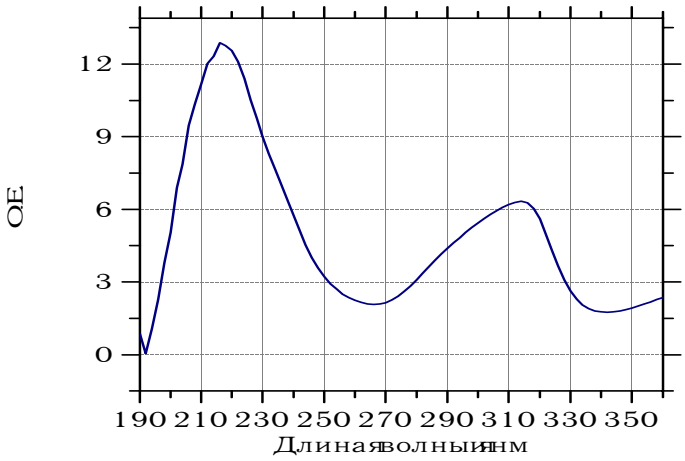
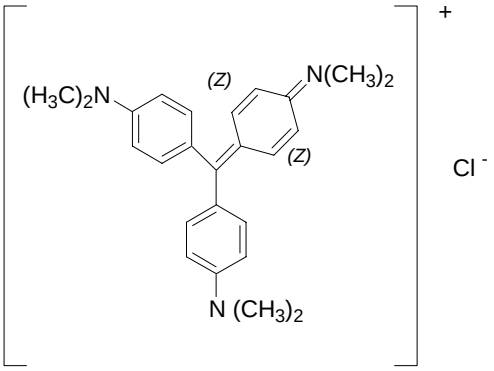
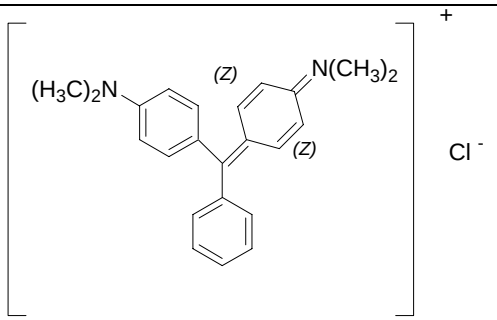
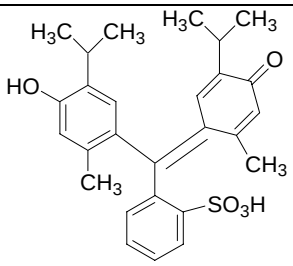
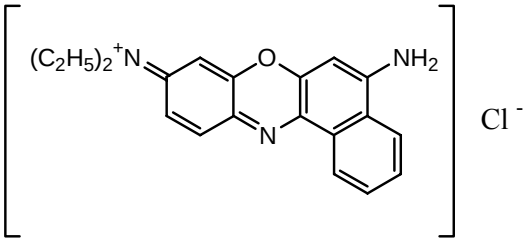
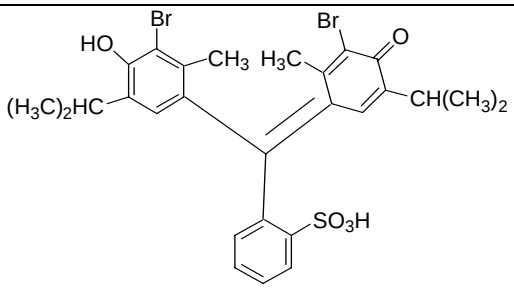
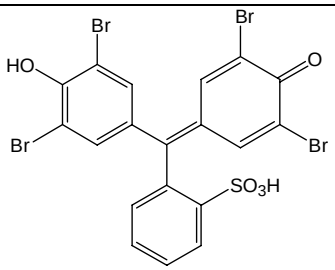


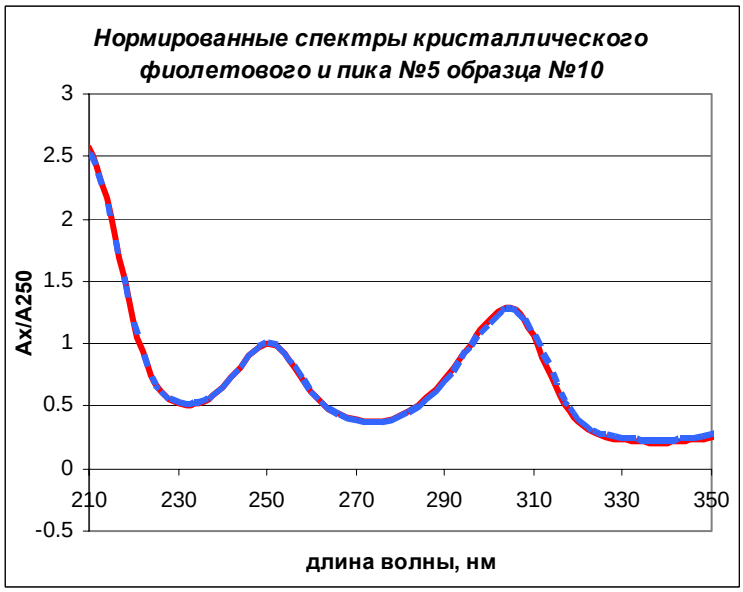
ТАБЛИЦА 2

название	*структурная формула*	*к какому классу относится*
Кристаллический фиолетовый		Трифенилметановый краситель
Малахитовый зелёный		Трифенилметановый краситель
Тимоловый синий		Сульфофталеиновый краситель
Нильский синий Б		Оксазиновый краситель
Бромтимоловый синий		Сульфофталеиновый краситель
Бромфеноловый синий		Сульфофталеиновый краситель

3. Удалось идентифицировать пик №3 из группы пиков – кристаллический фиолетовый Кристаллический фиолетовый был обнаружен в образце №5 (пик 8), в образце №8 (пик 5), в образце №2 (пик 6), в образце №6 (пик 7), в образце №1 (пик 6), в образце №4 (пик 6), в образце №3 (пик 5), в образце №9 (пик 5), в образце №10 (пик 5).

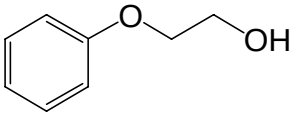
В качестве примеров на рисунке 6 приведены спектры пика №5 образца №10, пика №6 образца №1, пика №6 образца №4.

РИСУНОК 6



4. На всех хроматограммах обнаружен пик с максимумом поглощения на длине волны 270 нм и временем удерживания $t_{средн.} \approx 3{,}42$ минуты. Было сделано предположение, что это феноксиэтанол (фенилгликоль). (рис. 7)

РИСУНОК 7

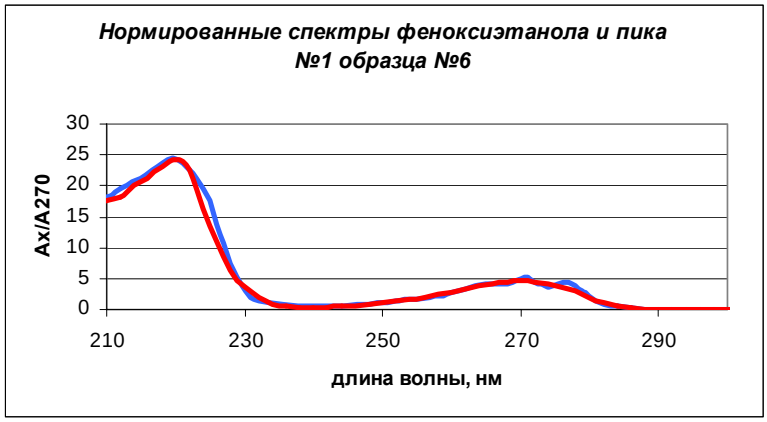


Пик №1 у образцов №1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 был идентифицирован как феноксиэтанол по литературным данным библиотеки спектров НИОХ СО РАН [21] (табл. 3). В качестве примера на рисунке 8 приведён спектр пика №1 образца №6.

ТАБЛИЦА 3

λ, нм	Ax/A270				
	Феноксиэтанол (литературные данные)	Образец № 6, пик № 1	Образец № 3, пик № 1	Образец № 8, пик № 1	Образец № 5, пик № 1
210	3,65	3,72	4,17	4,01	3,52
218	4,75	4,65	4,81	4,53	4,17
240	0,09	0,08	0,07	0,18	0,07
250	0,21	0,21	0,22	0,26	0,21
270	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
272	0,90	0,95	0,95	0,95	0,95
274	0,70	0,88	0,88	0,88	0,88
300	0,08	0,08	0,08	0,07	0,07
320	0,04	0,05	0,02	0,06	0,05
330	0,04	0,03	0,01	0,02	0,02

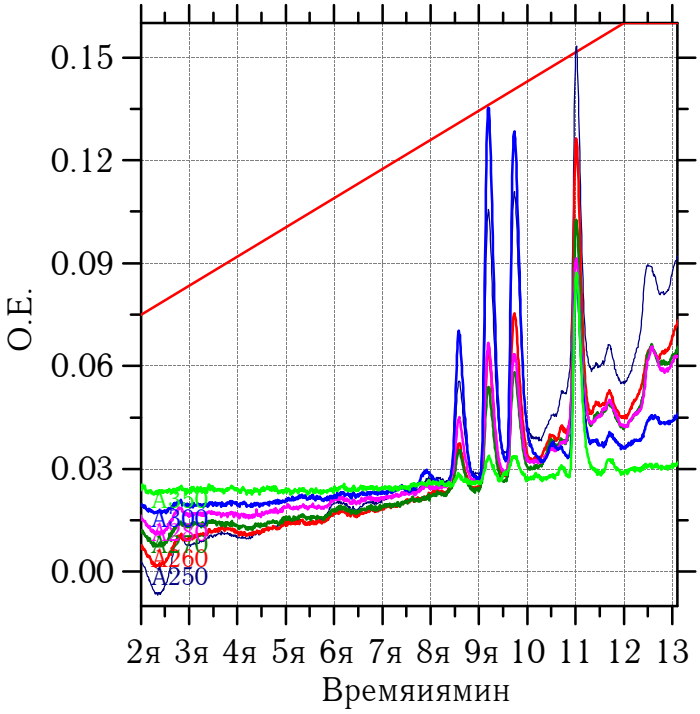
РИСУНОК 8

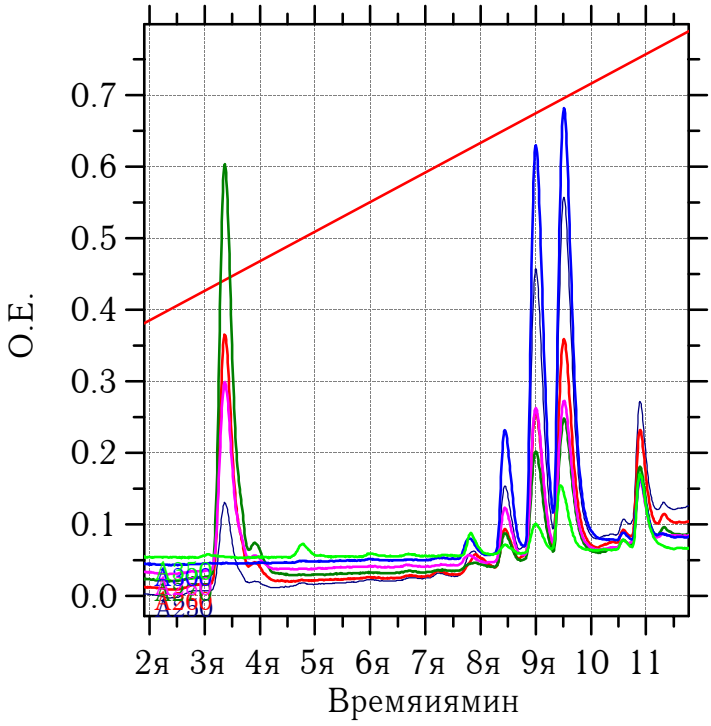


На рисунке видно, что на литературном спектре есть три максимума (на 219.5, 277 и 270.5 нм), а на полученном экспериментально спектре только два. Это объясняется тем, что
а) ширина спектральной щели спектрофотометра, используемого в [21] меньше, чем в спектрофотометрическом детекторе хроматографа "Милихром А-02", вследствие чего происходит "сглаживание" спектра;
б) при записи спектра в [21] был использован другой растворитель, что также может оказывать существенное влияние

5. Был проведён анализ образца №13: образец (кусочек бумаги с надписью размером ≈ 5 мм^2) был помещён в пробирку с 50 мкл абсолютного метанола и выдержан там около часа. Далее в выше приведённых условиях было проведено хроматографирование. Было показано, что со временем происходит уменьшение пика феноксиэтанола (рис. 9).

РИСУНОК 9





Выводы:

1. Показана возможность идентификации чернил по основным и примесным компонентам с помощью ВЭЖХ.
2. Показана возможность определения давности выполнения надписей по относительному содержанию феноксиэтанола как отношение площади его пика к сумме площадей всех пиков (или группы пиков основных красителей) на хроматограмме.

Используемая литература.

1) J.A. Zlotnick, F.P. Smith, "Chromatographic and electrophoretic approaches in ink analysis", Journal of Chromatography, 1999, p. 265-272

2) Э.А. Тросман, Г.С. Бежанишвили, Н.А. Батыгина, В.И. Тимофеева, Т.Ф. Панферова, Н.Д. Каграманов, РФЦСЭ, "Современные возможности криминалистического исследования паст для шариковых авторучек", Реферативная информация, выпуск 2, научные сообщения на теоретическом семинаре, Москва, 1995 год.

3) Hu-Sheng Chen, Ph.D; Hsien-Hui Meng, Ph.D; Kun-Chi Cheng, M.Sc., "A survey of methods used for the identification and characterization of inks", Forensic Science Journal, 2002

4) Brown C., Kirk P., “Paper electrophoresis in the identification of inks”, Journal of Criminal Law, Criminology, and Police Science, 1954;45: 473-480

5) Crown D., Conway J., Kirk P., “ Differentiation of blue ballpoint inks using chemical spot tests”, Journal of Criminal Law, 1961, 52;338-343

6) Kuranz R., “Technique for transferring ink from a written line to thin layer chromatographic sheet”, Journal of Forensic Science, 1986, 31:2:655-657

7) Crown D., Brunelle R., Cantu A., “The parameters of ballpoint ink examination”, Journal of Forensic Science, 1976;21:917-922

8) Tappolet G., “Application of HPTLC to the examination of writing inks”, Forensic Science International, 1983;22:99-109

9) Blackledge R., Iwan M., “Differentiate between inks of the same brand by infrared luminescence photography of their thin layer chromatograms”, Forensic Science International, 1983;21:165-173

10) Aginsky V., “Forensic examination of ‘slightly soluble’ ink pigments using thin layer chromatography”, Journal of Forensic Science, 1993;38:1131-1133

11) Lyter A., “Examination of ballpoint ink by HPLC”, Journal of Forensic Science, 1982;27:154-160

12) Colwell L., Kager B., “Ballpoint pen examination by HPLC”, journal of the Association of Official Analytical Chemists, 1977;60:613-618

13) Keto R., “Characterization of alkali blue pigment in counterferit currency by HPLC”, Journal of Forensic Science, 1984;29:198-208

14) Griffin R., Kee T., Adams R., “HPLC-system for the separation of basic dyes”, Journal of Chromatography, 1988;445:441-448

15) White P., Harbin A., “HPLC of acidic dyes on a dynamically modified polystyrene-divinylbenzene packing material with multi-wavelength detection and absorbance ratio characterization”, Analyst, 1989;114:877-881

16) Tebbet I., Chen C., Fitgerald M., Olsen L., “The use of HPLC with multi-wavelength detection for the differentiate of non-ball pen inks”, Journal of Forensic Science, 1992;37:4:1149-1157

17) Lofgren B., Andrasko J., “HPLC analysis of printing inks”, Journal of Forensic Science, 1993;38:1151-1154

18) В.Н. Агинский, "Установление давности выполнения штрихов рукописных текстов", Методические рекомендации, Москва, 1997 год..

19) Э.А. Тросман, Г.С. Бежанишвили, Н.А. Батыгина, ВНИИСЭ, "Определение относительного содержания фенилгликоля в штрихах паст для шариковых ручек, не содержащих фталоцианиновый краситель", Экспертная техника, 1996 год.

20) Э.А. Тросман, Г.С. Бежанишвили, П.Б. Далласян, Т.Ф. Панферова, Г.П. Воскерчян, ВНИИСЭ, "Определение относительного содержания фенилгликоля в штрихах паст для шариковых ручек", серия: Экспертная практика и новые методы исследования, выпуск 12, Москва, 1989 год.

21) The Sadtler standard spectra: Ultraviolet spectra. 1966. № 99 UV. – Phyladelphia: Sadtler research lab.