

高效液相色谱法分析签字墨水条件的选择

许英健 王彦吉^{##} 李心情 史晓凡 王景翰

(中国刑警学院 沈阳 110035 [#] 中国人民公安大学 北京 100038)

摘 要 采用正交设计法对高效液相色谱法分析签字笔色痕提取液的色谱条件的选择进行了探讨。优选出黑色签字笔色痕提取液用反相离子对色谱进行分析的最佳色谱条件为: 流动相为甲醇/水 (60/40) 含 0.039mol/L 四丁基氢氧化铵、柱温 30℃、检测波长 580nm, 并在此条件下对 25 种不同产地、不同牌号的黑色签字笔的色痕提取液进行了种类分析, 获得了较好的分析结果。结果表明, 高效液相色谱法是分离黑色签字笔色痕提取液的一种简便、准确的分析方法。

关键词 正交设计 高效液相色谱法 反相离子对色谱 签字笔色痕提取液

The Selection of Analytical Condition of High Performance Liquid Chromatography for Water-Based Pen Ink

Xu Yingjian, Wang Yanji[#], Li Xinqian, Shi Xiaofan, Wang Jinghan

(China Criminal Police College, Shenyang 110035 [#] Chinese People's Public Security University, Beijing 100038)

Abstracts The orthogonal design method is used to select analytical condition of high performance liquid chromatography for the extraction of black water-based pen ink. The optimal conditions of reverse phase ion-pair Chromatography is chosen, Solvent is methanol/water 60/40, (contained 0.039mol/L tetrabutyl ammonium hydroxide), column temperature is at 30℃, detection wavelength is 580nm. Under this condition, twenty five black water-based pen inks of different manufacturer and different brand were analyzed. The results showed that high performance liquid chromatography is a simple and accurate method for the analysis of black water-based pen ink.

Key words Orthogonal design, High performance liquid chromatography, Reverse phase ion-pair chromatography, Extraction of black water-based pen ink

签字笔是近年来新出现的一种书写工具, 因其书写流畅、携带方便、字迹不易褪色而越来越被人们所喜爱。因此, 在许多刑事及民事案件中, 经常会遇到关于签字笔形成的字迹色痕的鉴定。此时除需对其书写笔迹特征进行检验外, 还需要对检材和比对样品的色痕种类、书写时间的异同进行检验, 以确定可疑文件的真伪。当前随着市场经济的繁荣, 各类经济案件和财产纠纷案件逐渐增多, 对签字笔色痕的分析也越来越重要。因而建立一种系统的、有效的鉴别签字笔色痕种类及形成时间的最佳分析方法显得尤为重要。

目前, 国内外的文件检验和法化学工作者对一些人们所常用的书写工具, 如圆珠笔、钢笔等形成的色痕种类、书写时间的鉴定开展了大量的研究工作, 采取了多种方法和技术, 其中应

许英健 女, 31 岁, 实验师。

国家高技术应用部门发展项目(20019300007)

2003-04-15 收稿, 2004-02-12 接受

用较多的是色谱法^[1-6], 关于签字笔色痕的分析也已有报道^[7-9]。在各种分析方法中, 高效液相色谱法具有分离效能高、检测灵敏度高、检材用量小等特点, 但应用高效液相色谱法进行签字笔色痕的分析尚未见报道。

本文采用正交设计法优选出黑色签字笔色痕提取液的高效液相色谱最佳分析条件, 并在此条件下对 25 种不同产地、不同牌号的黑色签字笔的色痕提取液进行了种类分析, 获得了较好的分析结果。实验表明, 采用高效液相色谱法分离黑色签字笔色痕提取液, 是一种简便、准确的分析方法, 分析条件中流动相比及离子对试剂含量是影响分析结果的重要因素。

1 实验部分

1.1 仪器、试剂与样品

仪器: 日立 L-7100 液相色谱仪, L-7420 紫外检测器, L-7300 柱温箱, D-7000 型 HPLC 管理系统, KQ-250B 超声波清洗器 (昆山市超声波仪器厂)。

试剂: 甲醇、四丁基氢氧化铵(均为分析纯), 二次蒸馏水。所有溶液在使用前均经过 0.45 μ m 滤膜过滤并超声脱气。

样品: 中国、韩国、日本、德国、美国等不同产地、不同牌号的签字笔 25 种。

1.2 色谱条件

色谱柱: ODS C18 5 μ m (4.6mm \times 25cm); 检测波长: 580nm; 流动相: 甲醇/四丁基氢氧化铵的水溶液, 流速 1.0mL/min。

1.3 实验方法

挑选不同产地、不同牌号具有代表性的四种黑色签字笔作为正交设计法选择色谱分析条件的待分析样品(见表 1)。

表 1 四种牌号的黑色签字笔
Tab.1 Four numbers of black water-based pen pen

样品	牌号	产地
1	PARKER	英国
2	SABONIS	台湾
3	CROCODILE	新加坡·上海
4	STAEDTLER	德国

分别将上述 4 种黑色签字笔在纸张上制样, 1h 内剪取其色痕 5cm, 加入甲醇/水(60/40)提取剂 200 μ L, 振荡 5min 后, 移出色痕提取液, 待分析。

在甲醇体积百分含量分别为 20%、40%、60%、70%、80%, 四丁基氢氧化铵水溶液浓度分别为 0.02、0.05、0.06 mol/L, 柱温分别为 25、30、35、40、45 $^{\circ}$ C 对样品进行分析, 得出甲醇体积百分含量在 60%~70%、四丁基氢氧化铵水溶液浓度在 0.03~0.04 mol/L、柱温在 30~40 $^{\circ}$ C 进行分析时分离效果较好, 分离时间适中, 柱压较低。

在此基础上, 以甲醇体积百分含量、四丁基氢氧化铵水溶液浓度、柱温为三因素, 每个因素选三水平, 应用正交设计进行优选, 按 $L_9(3^4)$ 组合出 9 种分析条件, 见表 2、3。将上述四种黑色签字笔色痕提取液分别在 9 种分析条件中进行分析。

表 2 $L_9(3^4)$ 正交实验设计表
Tab.2 The design of $L_9(3^4)$ orthogonal experiment

水平/因素	甲醇/%	四丁基氢氧化铵的水溶液浓度/(mol/L)	柱温/℃
1	66	0.046	30
2	63	0.039	34
3	60	0.031	38

表 3 正交实验数据计算表
Tab.3 The date of $L_9(3^4)$ orthogonal experiment

水平因素	甲醇/%	四丁基氢氧化铵的水溶液浓度/(mol/L)	柱温/℃	峰数*	分离度**
1	66 (1)	0.046 (1)	30 (1)	32	48.477
2	66 (1)	0.039 (2)	34 (2)	30	51.136
3	66 (1)	0.031 (3)	38 (3)	30	52.289
4	63 (2)	0.046 (1)	34 (2)	40	74.715
5	63 (2)	0.039 (2)	38 (3)	42	75.789
6	63 (2)	0.031 (3)	30 (1)	39	91.278
7	60 (3)	0.046 (1)	38 (3)	43	107.606
8	60 (3)	0.039 (2)	30 (1)	45	136.764
9	60 (3)	0.031 (3)	34 (2)	42	131.945
K1	50.634	76.933	92.173		
K2	80.594	87.896	85.932		
K3	125.438	91.837	78.561		
$\Delta K = K_{\max} - K_{\min}$	74.804	14.905	6.241		

* 为 4 种实验样品在相同的条件下所得到的峰数之和;

**为 4 种实验样品在相同的条件下所得到的相邻峰间分离度和。分离度是指相邻两色谱峰保留值之差与两组分色谱峰底宽度平均值之比。

ΔK 为分离度的级差值

然后, 在正交设计法确定的色谱条件下将 25 种黑色签字笔照前所述制样、提取、分析。

另外, 用甲醇/水(60/40)提取剂在与上述相同的条件下提取空白纸, 将所得提取剂在上述色谱条件下进行测定, 以考察纸张因素的影响。

分别照前所述提取不同位置的 1 号样品的字迹色痕 3 次, 在表 3 的条件 8 下进行测定; 再分别照前所述提取字迹形成时间为 0(1h 内)、1、3、5、7d 的 1 号样品的字迹色痕在表 3 的条件 8 下进行测定。

2 结果与讨论

在选择签字笔色痕分析的色谱条件时, 如何科学地设计试验, 选择次数尽可能少而又有代表性的试验, 从大量的试验点中挑选出适量的具有代表性和典型性的点, 以获得高可靠性的试验数据, 是实验技术人员在试验设计中首先需要解决的问题。通过反复对比, 笔者选用正交设计法。

2.1 分离黑色签字笔的最佳分析条件

黑色签字笔油墨中的有色成分常常是由 2 种或 2 种以上的酸性染料混合组成^[10], 所以黑色签字笔色痕提取液是一个组成比较复杂的混合物, 在确定最佳分析条件时, 需要综合考虑峰数、分离度和保留时间。色谱峰数越多, 相邻峰间分离度之和越大, 最大保留时间越小, 分离条件越佳。从上述 4 种黑色签字笔色痕提取液在 9 种条件下分离的结果(表 3)可知, 条件 8 中 4 个样品的峰数之和及分离度之和最大, 分离效果最好, 所以确定它为黑色签字笔色痕提取液的分析

条件, 即: 甲醇/水(60/40 含 0.039mol/L 四丁基氢氧化铵), 柱温 30℃。任选的 4 种黑色签字笔色痕提取液在此条件下得到了较好的分离, 见图 1。用此优选的色谱条件对市售的 25 种不同国家和地区生产的不同牌号的黑色签字笔油墨的色痕提取液进行了 HPLC 分析, 并进行了分类。根据色谱图中的峰数、峰形及峰高比之间的差别可将其分为 4 大类, 分类图见图 2。

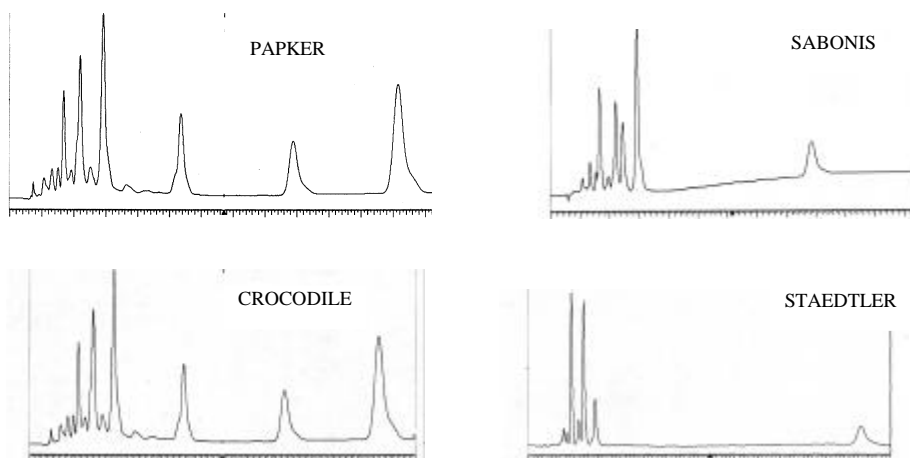


图 1 四种黑色签字笔色痕提取液在表 3 的条件 8 下的 HPLC 图

Fig.1 High performance liquid chromatography of four samples of black water-based pen ink on the 8th condition of Table 3

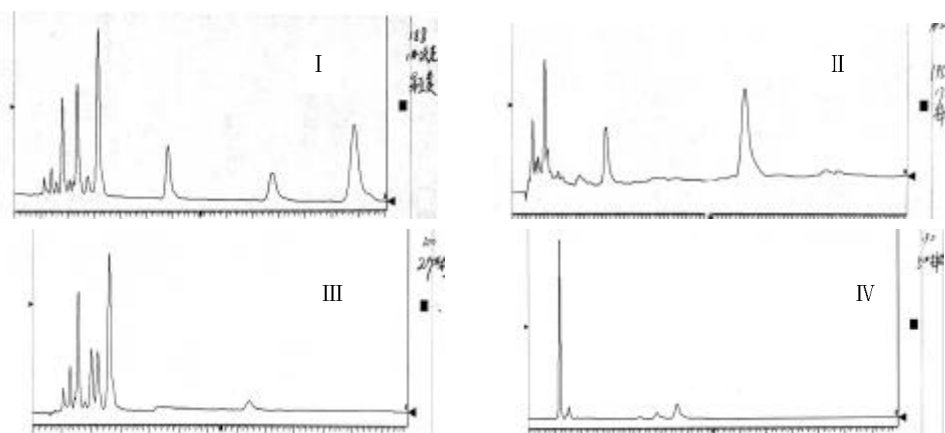


图 2 4 类黑色签字笔油墨色痕提取液的 HPLC 图

Fig.2 High performance liquid chromatography of four kinds of black water-based pen ink

2.2 流动相中三因素对黑色签字笔色痕提取液分离作用的影响

从 4 种黑色签字笔色痕提取液在 9 种分析条件下的分离所得的正交实验数据计算表(表 3)中的数据分析可知, 柱温的 ΔK 最小仅为 6.241, 所以它对分离效果的影响最小。甲醇的 ΔK 最大为 74.804, 表明甲醇与水的比例对字迹色痕提取液的分离影响最大, 甲醇的比例越小, 峰的分离度越大, 但保留时间较长; 反之, 甲醇的比例太大, 有色组分不能完全分离, 因此, 甲醇与水的最佳配比为 60/40。离子对试剂四丁基氢氧化铵的浓度直接影响被分离有色物质的保留时间, 离子对试剂浓度越大, 酸性染料与之形成的中性分子与固定相的缔合能力越大, 保留时间越长; 但浓度太大, 在流动相中不易完全溶解, 易使色谱柱堵塞, 并且柱压偏高, 柱效降低;

浓度太低,被分离的有色组分不能完全与其结合,形成中性分子,分离效果不好。

2.3 反相离子对色谱法分析黑色签字笔色痕提取液的依据

反相离子对色谱是把离子对加入极性流动相中,被分析的离子在流动相中与离子对试剂结合,生成不带电的中性离子对,从而增加了与非极性固定相的疏水缔合作用,使分配系数增大,改善了分离效果。黑色签字笔油墨中的有色成分是由一些酸性染料组成的,而酸性染料的分子结构中含有羧基或磺酸基,是一些极性有机化合物,在非极性的 C_{18} 色谱柱上基本无保留,因而无法进行分离,所以需要在流动相中加入离子对试剂。由于黑色签字笔油墨中的有色成分是一些酸性染料,是阴离子型化合物,当加入阳离子 $[N(C_4H_9)_4]^+$ 与其配对生成中性离子对,则可以在 C_{18} 柱上保留。不同产地生产的不同牌号的黑色签字笔油墨中所用的染料不同,其结构和性能必然不同,因而与离子对试剂的阳离子结合生成的中性离子对与固定相的缔合能力及在流动相中的解缔能力均不相同,从而在高效液相色谱图中的峰数、峰形、峰的保留时间也不相同,达到分离鉴别的目的。

实验中所用的检测波长是 580nm,纸张上的增白物质在该波长下无吸收,所以纸张在此分析条件下无干扰。

字迹色痕的深浅常常受到书写力度、笔尖粗细等因素的影响,分别提取不同位置 1 号样品的字迹色痕 3 次,在优选条件下进行测定,其色谱峰数、峰的保留时间 T_r 值、相对峰面积基本一致。由第二大峰面积与最大峰面积的相对比来计算的相对标准偏差 RSD 值为 3.89%。从 0~7d 的字迹色痕提取液的重现性实验的分析结果可知,黑色签字笔油墨中的染料比较稳定,0~7d 基本不变,1 号样品的色谱峰数、峰的保留时间 T_r 值、相对峰面积基本一致,由第二大峰面积与最大峰面积的相对比来计算的相对标准偏差 RSD 值为 4.23%。

参考文献

- [1] A Jane, M F S Lewies. Journal of Forensic Sciences, 1996, 41 (5): 874~877.
- [2] R O Keto. Journal of Forensic Sciences, 1984, 29(1): 198~208.
- [3] V N Aginsky. Journal of Forensic Sciences, 1993, 38(5): 1111~1130.
- [4] A Lyter. Proceedings of 13th Meeting of the International Association of Forensic Sciences, 1993, 3: 260~262.
- [5] H S Chen. Forensic Science Journal, 2002, 1(1): 1~14.
- [6] P White, B Weals. Journal of Chromatography, 1984, 303: 211~216.
- [7] 李淑英. 中国刑警学院学报, 1999, 增刊: 65~66.
- [8] 黄建同. 文件检验中的书写色料与显现技术. 北京. 警官教育出版社, 1999: 72~87.
- [9] K Tsutsumi, K Ohga. Analytical Sciences, 1998, 14: 269~274.
- [10] 张红鸣, 徐 建. 工业产品着色与配色技术. 北京. 中国轻工业出版社, 1999: 555~562.