



**TEKNIikka JA LIIKENNE**

**Laboratorioalan koulutusohjelma**

**OPINNÄYTETYÖ**

**KUULAKÄRRIKYNÄMUSTEIDEN ANALYTIikka KAPILLAARIELEKTROFOREESILLA**

**Työn tekijä: Elina Hakola  
Työn ohjaaja: Jukka Niiranen  
Työn ohjaaja: Jari Pukkila**

**Työ hyväksytty: \_\_. \_\_. 2008**

**Jukka Niiranen  
yliopettaja**



## **ALKULAUSE**

Tämä opinnäytetyö tehtiin Keskusrikospoliisin Rikosteknisen laboratorion kemian osastolle.

Haluan kiittää rikoskemisti Jari Pukkilaa hyvästä ja asiantuntevasta ohjaamisesta opinnäytetyöprosessin aikana. Lisäksi haluan kiittää tutkimusavustaja Merja Itkosta kärsivällisyydestä ja käytännön työhön opastamisesta sekä koko kemian osaston henkilökuntaa, joka ystävällisellä ilmapiirillä teki työharjoitteluajastani erityisen mukavaa.

Eryteisesti haluan kiittää opinnäytetyötäni ohjannutta opettajaa, yliopettaja Jukka Niirasta, hyvistä neuvoista ja ohjeista opinnäytetyön kirjoitusprosessin aikana.

Kiitokset kuuluvat myös isälleni Vesa Hakolalle, äidilleni Maire Hakolalle ja veljelleni Antti Hakolalle, jotka ovat omalla panoksellaan tukeneet minua opintojeni ja opinnäytetyöni aikana.

Lopuksi haluan kiittää avomiestäni Teemu Hokkasta, joka on tukenut minua monin tavoin koko opintojeni ajan.

Espoossa 6.11.2008

Elina Hakola

## OPINNÄYTETYÖN TIIVISTELMÄ

<b>Työn tekijä:</b> Elina Hakola	
<b>Työn nimi:</b> Kuulakärkikynämusteiden analytiikka kapillaarielektroforeesilla	
<b>Päivämäärä:</b> 6.11.2008	<b>Sivumäärä:</b> 32 s. + 3 liitettä
<b>Koulutusohjelma:</b>  Laboratorioala	
<b>Työn ohjaaja:</b> Yliopettaja Jukka Niiranen  <b>Työn ohjaaja:</b> Rikoskemisti Jari Pukkila	
<p>Tämä opinnäytetyö tehtiin Keskusrikospoliisin Rikostekniselle laboratoriolle. Työn tavoitteena oli selvittää, voiko sinisiä kuulakärkikynämuste jälkiä erottaa toisistaan koostumuksellisesti kapillaarielektroforeesianalytiikan avulla.</p> <p>Kapillaarielektroforeesianalytiikan käytettävyyttä kuulakärkikynämusteisiin liittyvässä toimeksiantotyössä tutkittiin kolmen erilaisen kaupallisen elektrolyyttikitin avulla, joita muokattiin lisäämällä joukkoon eri pitoisuuksia asetonitriliä ja metanolia. Näytteinä käytettiin 11 eri kuulakärkikynällä paperiin piirrettyä mustejälkeä, jotka liuotettiin paperista liuottimella ja ajopuskurilla tai liuottimella ja vedellä. Vertailunäytteinä oli myös kolme puhdasta väriainetta, joita käytetään yleisesti sinisissä kuulakärkikynämusteissa. Ruiskusuodatuksen jälkeen näytteet analysoitiin kapillaarielektroforeesilla.</p> <p>Siniset kuulakärkikynämusteet saatiin erottumaan hyvin. Näytteiden erottelu perustui piikkihienorakenteen tarkasteluun. Piikkien joukossa oli muitakin yhdisteitä kuin väriaineita. Parhaimmat tulokset saatiin, kun paperinäytteet liuotettiin asetonitriliin ja veteen ja käytettiin 50 % asetonitriliajopuskuria (pH 4,3). Näytteet mitattiin 20 kV:n jännitteellä ja 20 °C:n lämpötilassa.</p> <p>Tutkimusmenetelmää kehitetään edelleen näytteenkäsittelyn, ajopuskurin ja näytteen-syötön osalta.</p>	
<b>Avainsanat:</b> kapillaarielektroforeesi, kuulakärkikynämuste, asiakirjatutkimus	

## ABSTRACT

**Name:** Elina Hakola

**Title:** Analysis of Ballpoint Pen Inks by Capillary Electrophoresis

**Date:** 6 November 2008

**Number of pages:** 32

**Department:**  
Laboratory Sciences

**Instructor:** Jukka Niiranen, Principal Lecturer

**Supervisor:** Jari Pukkila, Forensic Chemist

This thesis was carried out for the forensic laboratory of the National Bureau of Investigation. The aim of this thesis was to find out whether blue ballpoint pen markings could be distinguished from one another by capillary electrophoresis.

The usability of capillary electrophoresis in relation to ballpoint pen inks was investigated in this assignment by three commercial electrolyte kits. The kits were modified by adding different concentrations of acetonitrile and methanol. Eleven different markings made using a ballpoint pen were used as samples. They were dissolved from the paper with solvent and run buffer or with solvent and water. Also three pure colors commonly used in ballpoint pen inks were included in this analysis as comparison samples. After syringe filtration the samples were analysed by capillary electrophoresis.

The investigations showed that it was possible to successfully distinguish between the blue ballpoint pen inks. The differentiation of the samples was based on the observation of fine structure of peaks. Among the peaks there were also other compounds than colorants. The best results were generated when the paper samples were dissolved in acetonitrile and water while using 50 % acetonitrile run buffer (pH 4,3). The samples were measured using 20 kV voltage at a temperature of 20°C.

The research method is further perfected in terms of improving the sample handling, the use of the run buffer and sampling.

**Keywords:** Capillary electrophoresis, ballpoint pen ink, document investigation

# SISÄLLYS

## ALKULAUSE

## TIIVISTELMÄ

## ABSTRACT

<b>1</b>	<b>JOHDANTO</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>KUULAKÄRKIKYNIEN SINISET MUSTEET</b>	<b>2</b>
<b>3</b>	<b>KAPILLAARIELEKTROMIGRAATIOTEKNIIKAT</b>	<b>4</b>
3.1	Kapillaarielektroforeesi	4
3.2	Misellinen elektrokineettinen kapillaarikromatografia	5
3.3	Erotukseen vaikuttavat tekijät	7
3.3.1	<i>Elektro-osmoottinen virtaus</i>	7
3.3.2	<i>Joule-lämpö</i>	9
3.4	Laitteisto	10
3.5	Elektrolyyttipuskurit	11
3.6	Näytteensyöttö	12
3.7	Näytevyöhykkeiden konsentrointi näytteensyötön yhteydessä	13
3.8	Erotuskapillaarit	13
3.9	Detektorit	14
3.9.1	<i>UV/VIS-detektori</i>	14
3.9.2	<i>Fluoresenssidetektori</i>	14
3.9.3	<i>Diodirividetektori</i>	14
<b>4</b>	<b>TYÖSSÄ KÄYTETYT ANALYYSILAITTEET JA MATERIAALIT</b>	<b>15</b>
4.1	Ajoliuokset	15
4.2	Näytteet	16
4.3	Kapillaarielektroforeesin käyttö	17
<b>5</b>	<b>TYÖN SUORITUS</b>	<b>18</b>
5.1	Alkumittaukset	18
5.2	Mittaukset mustenäytteistä	19
5.3	Paperinäytteiden valmistus	20
5.4	Mittaukset väriainestandeista ajopuskurilla pH 4,3	21
5.5	Mittaukset paperinäytteistä ajopuskurilla pH 4,3	21

5.6	Orgaanisen liuottimen vaihdon vaikutus mittauksiin	22
5.7	Väriainestandardien ajonaikainen näytevyöhykkeen fokusointi	22
5.8	Paperinäytteiden ajonaikainen näytevyöhykkeen fokusointi	24
5.9	Näytejoukon erottelu kapillaarielektroforeesilla	24
6	TULOKSET JA PÄÄTELMÄT	27
7	YHTEENVETO	29
	VIITELUETTELO	31
	LIITTEET	
	LIITE 1	Kapillaarielektroforeesin ajoparametrit
	LIITE 2	Elektrolyyttikittien valmistaja ja maahantuoja
	LIITE 3	Näytekohtainen piikkiaineisto aallonpituudella 214 nm ja 580 nm

## 1 JOHDANTO

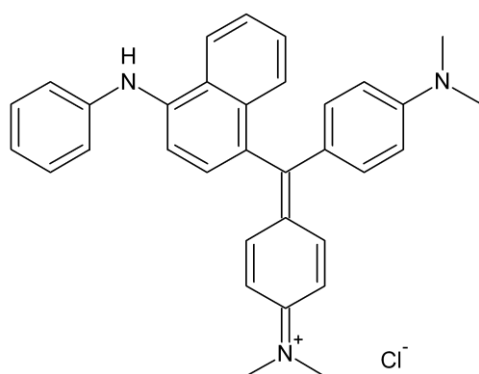
Asiakirjoissa käytettyjen musteiden kemiallinen luonnehdinta on vakiintunutta kulttuuria monissa forensisissä laboratorioissa. Keskusrikospoliisin rikosteknisen laboratorion teknisen osaston asiakirjatoiminnon tutkimista asiakirjoista osa on osittain tai jopa kokonaan kuulakärkikynällä yksilöityjä. Tällaisia asiakirjoja ovat esimerkiksi vähemmän kehittyneiden maiden ajokortit, henkilökortit ja passit (esimerkiksi Irak). Edellä mainittujen asiakirjojen kohdalla näytettä näkyvästi vahingoittavien tutkimusmenetelmien käyttö ei yleensä tule kysymykseen. Varsinaisten turvapainotuotteiden lisäksi asiakirjatoiminnossa tutkitaan jonkin verran asiakirjoja, joilla ei ole enää myöhempää käyttöä kiistatilanteen ratkettua. Tällaisia asiakirjoja ovat kahden osapuolen väliset sopimuspaperit, testamentit ja lääkemääräykset. Tämän ryhmän näytteisiin on luvan kanssa mahdollista käyttää dokumenttia hieman vahingoittavia tutkimusmenetelmiä.

Rikosteknisen laboratorion asiakirjatoiminto on tutkinut musteita pääasiassa mikroskopiaan ja visuaalisiin tarkasteluihin perustuen. Lisäksi käytössä on ollut myös ohutkerroskromatografinen (thin layer chromatography, TLC) menetelmä, mutta sen käyttö on edellyttänyt asiakirjan osittaista vahingoittamista.

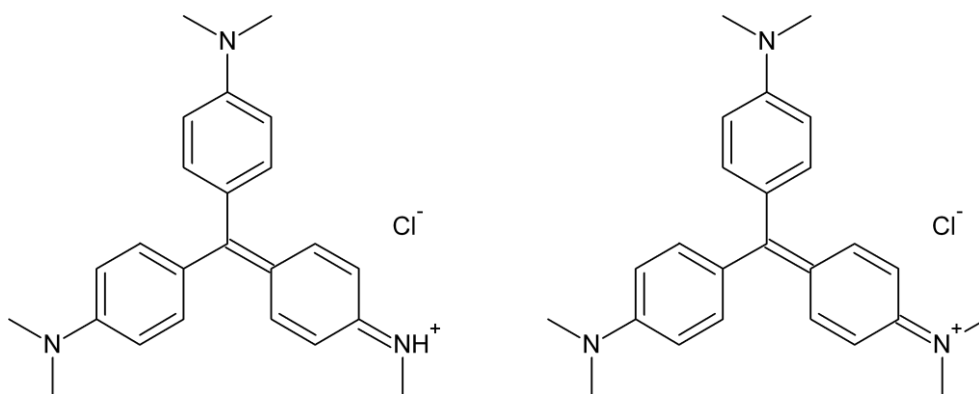
Kemiallisilla väritutkimuksilla selvitetään kahden värijäljen keskinäinen samanlaisuus tai tunnistetaan väri joksikin nimenomaiseksi tuotteeksi. Tässä tarkoituksessa on mielekästä käyttää niitä analyysimenetelmiä, jotka erottelevat mustenäytteitä tehokkaimmin laadullisesti. Rikosteknisessä laboratoriossa jo olemassa olevan laitekannan pohjalta päädyttiin selvittämään kapillaarielektroforeesin erotteluvoimaa musteiden laadullisessa luonnehdinnassa. Tutkimuksen tavoitteena on myös selvittää kapillaarielektroforeesianalytiikan yleinen käytettävyyys kuulakärkikynämusteisiin liittyvässä toimeksiantotyössä. Tämä tutkimus kohdistuu sinisiin kuulakärkikynämusteisiin. Näiden siniset väriaineet ovat pääasiassa aromaattisia amiiniyhdisteitä ja siten helposti varautuneiksi saatavissa tai varautuneita jo neutraalissa pH:ssa. Kapillaarielektroforeesilla tähdätään juuri väriaineiden toteamiseen.

## 2 KUULAKÄRKIKYNIEN SINISET MUSTEET

Kuulakärkikynien siniset musteet koostuvat useimmiten useasta eri väriaineesta. Ne ovat siis väriaineseoksia. Väriaineet voidaan jakaa positiivisesti ja negatiivisesti varautuneisiin, eli kationisiin ja anionisiin väriaineisiin. Kationisia väriaineita käytetään esimerkiksi sinisävyisissä kuulakärkikynämusteissa ja anionisia väriaineita mustissa kuulakärkikynämusteissa [1; 2]. Kuulakärkikynämusteissa käytettäviä väriaineita ovat muun muassa viktoriasininen (victoria blue), metyyllivioletti (methyl violet) ja kristallivioletti (crystal violet). Väriaineiden rakennekaavoja on esitetty kuvissa 1 ja 2.



Kuva 1. Viktoriasininen B [3]



Kuva 2. Metyyllivioletti 6B ja kristallivioletti [4; 5]

Kuulakärkikynämusteiden väriaineet ovat konjugoituneita orgaanisia yhdisteitä, jotka sisältävät aromaattisia aminoryhmiä. Aromaattisten ryhmien vuoksi väriaineilla on absorptiota UV-alueella. Molekyyli absorboi sitä pidemmällä aallonpituudella, mitä enemmän aromaattisia renkaita molekyyliässä on. Kuulakärkikynämusteiden sininen väri havaitaan, kun konjugoituneiden kaksoissidosten (kaksoissidosten välissä yksöissidos) ketju on tarpeeksi pitkä. Tällöin väriaineet absorboivat näkyvän valon alueella. [6, s. 54.]





### 3 KAPILLAARIELEKTROMIGRAATIOTEKNIIKAT

Kapillaarielektromigraatiotekniikat ovat tehokkaita, nopeita ja selektiivisiä erotusmenetelmiä pienille ja suurille molekyyleille. Kapillaarielektromigraatiotekniikoiden etuja ovat pieni reagenssien kulutus, lyhyet analyysiajat ja hyvä erotuskyky. Kapillaarielektromigraatiotekniikoilla voidaan analysoida varauksellisia yhdisteitä, neutraaleja molekyylejä, epäorgaanisia ja orgaanisia yhdisteitä sekä monia biologisia yhdisteitä. Kapillaarielektromigraatiotekniikat jaetaan erotusperiaatteen perusteella kuvan 5 mukaisesti. [6, s. 178.]



Kuva 5. Kapillaarielektromigraatiotekniikoiden jaottelu [8, s. 221]

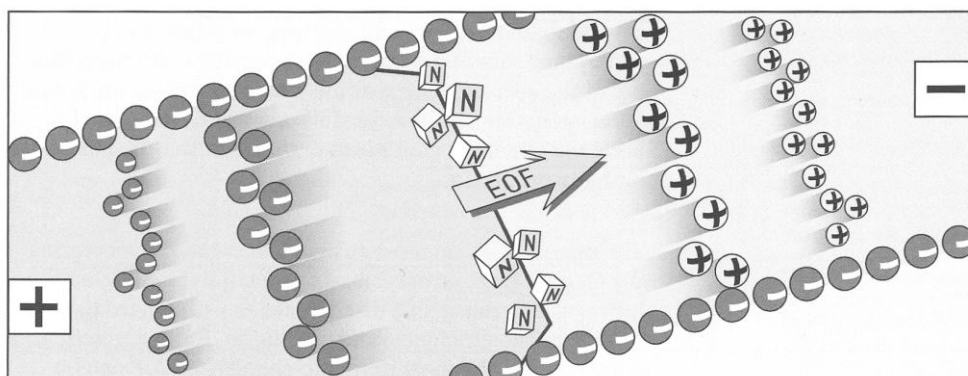
Perusmenetelmää kutsutaan kapillaarielektroforeesiksi (capillary zone electrophoresis, CZE). Laajalti käytössä on myös isellinen elektrokineettinen kapillaarikromatografia.

#### 3.1 Kapillaarielektroforeesi

Kapillaarielektroforeesi soveltuu vain varauksellisten, anionien ja kationien, erottamiseen, koska erottuminen perustuu yhdisteiden erilaiseen liikkuvuuteen elektrolyyttiliuoksessa. Kapillaarielektroforeesissa elektrolyyttiliuoksen johtokyvyssä ja sähkökentän voimakkuudessa ei tapahdu suuria muutoksia erotuksen aikana ja liuos pysyy muuttumattomana koko erottumisen ajan. Taustaelektrolyyttiliuokset voivat olla vesipohjaisia, täysin orgaanisia liuoksia tai näiden yhdistelmiä. [8, s. 248.]

Elektro-osmoottinen virtaus syntyy, kun kapillaarin päiden välille kytketään sähköjännite. Tällöin neste lähellä kapillaarin sisäreunaa alkaa liikkua ja saa

aikaan virtauksen. Kationianalysissä laitteen napaisuus on normaali, jolloin elektro-osmoottinen virtaus kulkee anodilta katodille. Kationien liikkeeseen vaikuttaa nyt elektro-osmoottinen virtaus ja katodin vetovoima samansuuntaisesti, joten kationit kulkeutuvat ensimmäiseksi ilmaisimelle. Elektro-osmoottisen virtauksen mukana tulevat neutraalit yhdisteet ja anionit migroivat viimeisenä, koska ne pyrkivät vastavirtaan anodia kohti. Kaikki anionit eivät välttämättä saavuta detektoria erottelun aikana. Anionianalysissä laitteen napaisuus käännetään vastakkaiseksi, jolloin näyte kulkee elektro-osmoottisen virtauksen avulla katodilta anodille. Tällöin anionit detektoituvat ensimmäiseksi ja osa kationeista vastaavasti viimeisenä, koska katodi vetää niitä puoleensa elektro-osmoottista virtaa vastaan. Kuvassa 6 on esitetty eri varauksisten yhdisteiden liikkumista kapillaarissa kationianalysissä.



Kuva 6. Varautuneiden yhdisteiden liikkuminen kapillaarissa kationianalysissä [9, s. 23]

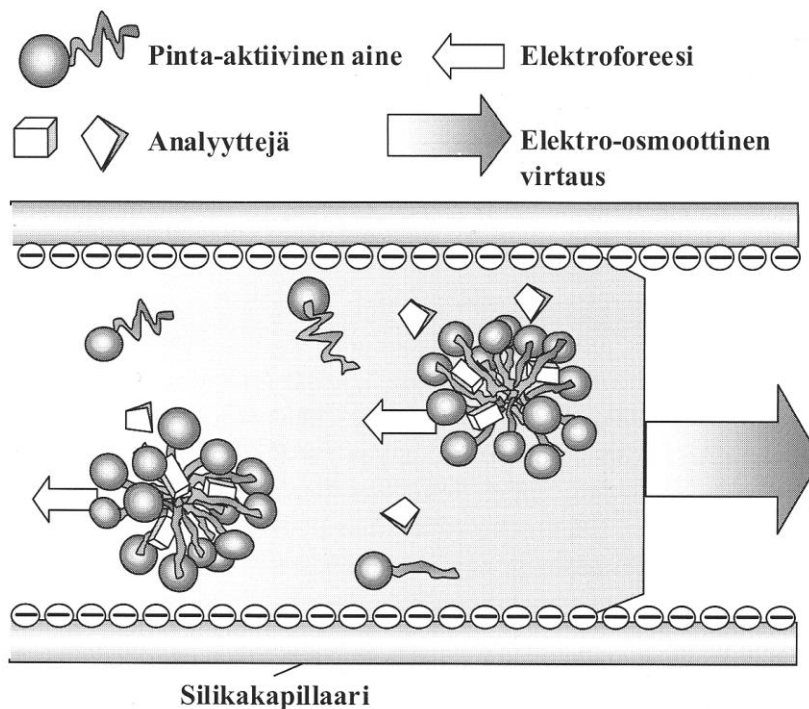
### 3.2 Misellinen elektrokineettinen kapillaarikromatografia

Misellisellä elektrokineettisellä kapillaarikromatografialla (Micellar electrokinetic chromatography, MEKC) voidaan analysoida varauksellisia ja neutraaleja yhdisteitä. Elektrolyyttiliuokseen lisätään pinta-aktiivisia aineita, jotka muodostavat misellejä. Pinta-aktiiviset aineet ovat amfifiilisiä molekyyliä eli niissä on hydrofobinen ja hydrofiilinen osa. Kun pinta-aktiivisen aineen konsentraatio on tarpeeksi suuri eli se ylittää niin sanotun kriittisen misellikonsentraation, muodostuu misellejä. Misellit muodostavat elektrolyyttiliuokseen dispersiostationäärifaasin. Näytekomponenttien erottuminen perustuu niiden jakaantumiseen misellifaasin ja elektrolyyttiliuoksen välillä. Erottuminen perustuu myös näytekomponenttien vuorovaikutuksiin misellien kanssa. Yhdisteiden hydrofobisuus vaikuttaa vuorovaikutusten voimakkuuteen: mitä hydro-

fobisempi yhdiste on, sitä voimakkaammin se pidätty misellifaasiin, jolloin sen liikkuvuus hidastuu hydrofiilisempiin yhdisteisiin verrattuna.

Pinta-aktiivisina aineina voidaan käyttää anionisia ja kationisia yhdisteitä, yleensä kuitenkin anionisia yhdisteitä (esimerkiksi natriumdodekyylisulfaatti, SDS). Anionien muodostamissa miselleissä molekyylien hydrofobiset päät suuntautuvat misellin keskustaa kohti ja varaukselliset (hydrofiiliset) päät suuntautuvat misellin pintaan vesiliuoksissa. Erotussysteemin selektiivisyyteen voidaan vaikuttaa vaihtamalla tai käyttämällä kahta tai useampaa eri pinta-aktiivista ainetta.

Anionisten pinta-aktiivisten aineiden muodostamilla miselleillä on suuri negatiivinen nettovaraus, jolloin ne kulkevat sähkökentässä kohti anodia. Elektroosmoottinen virtaus on kuitenkin voimakkaampaa, kuin misellien elektroforeettinen liikkuvuus, jolloin myös misellit kulkeutuvat hitaasti kohti katodia. Ensimmäisenä migroituu elektro-osmoottinen virtaus ja heti sen jälkeen neutraalit hydrofiiliset yhdisteet. Neutraalit hydrofobiset yhdisteet migroituvat ennen misellejä. Analyyttien erottumista misellisessä elektrokineettisessä kapillaarikromatografiassa on esitetty kuvassa 7. [8, s. 225 - 227.]



Kuva 7. Analyyttien erottuminen misellisessä elektrokineettisessä kapillaarikromatografiassa [8, s. 256]

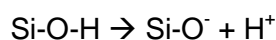
Varauksellisia yhdisteitä eroteltaessa analyytit migroituvat vasta misellien jälkeen. Anionisia pinta-aktiivisia aineita käytettäessä misellien jälkeen migroituu mahdollisesti vielä osa anionisista yhdisteistä. Kationeja eroteltaessa käytetään kationisia pinta-aktiivisia aineita (esimerkiksi dodekyylitrimetyyliammoniumkloridi, DTAC) ja laitteen napaisuus käännetään vastakkaiseksi. Näissä olosuhteissa osa kationeista migroituu elektro-osmoottisen virtauksen ja misellien jälkeen.

### 3.3 Erotukseen vaikuttavat tekijät

Kapillaarielektroforeesilla tehtäviin erotuksiin vaikuttavat analyyttien diffuusio ja liikkuvuudet, analyyttien vuorovaikutukset kapillaarin seinämän kanssa, elektro-osmoosi sekä Joule-lämpö.

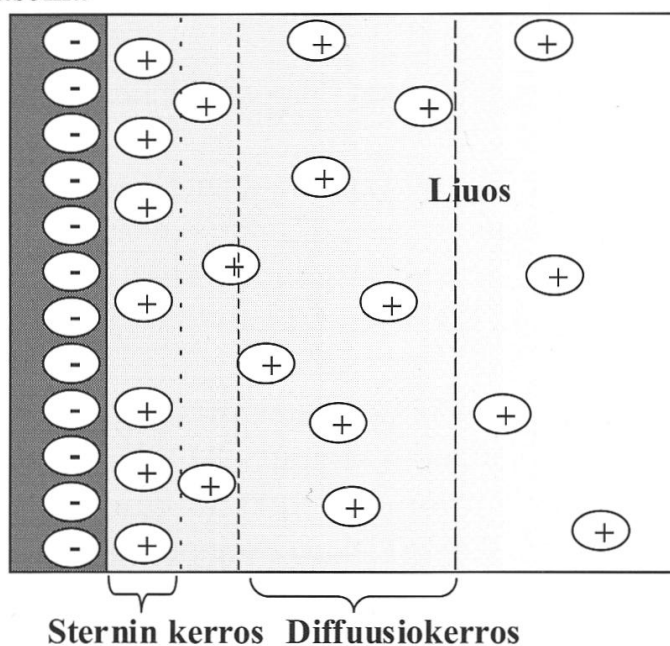
#### 3.3.1 Elektro-osmoottinen virtaus

Päälystämättömissä synteettisistä piioksidista valmistetuissa silikakapillaareissa kapillaarin sisäseinämä koostuu vapaista silanoliryhmistä Si-O-H, jotka ionisoituvat, kun pH on riittävän korkea, > 2-3:



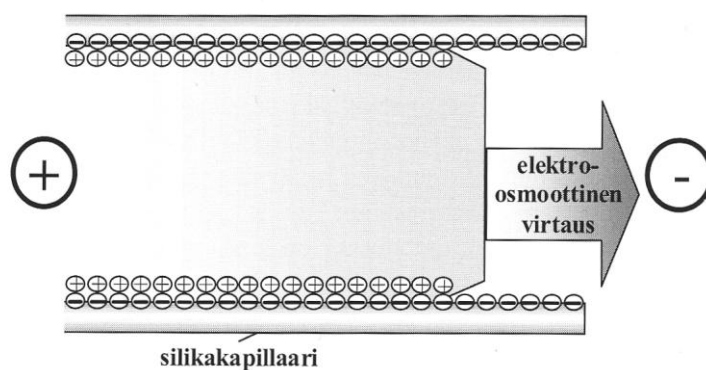
Negatiivisesti varautuneeseen silikaseinämään muodostuu kaksoiskerros, kun kapillaarin sisällä olevassa elektrolyyttiliuoksessa olevat positiiviset ionit (kationit) kulkevat seinämän lähelle sähköisen vetovoiman vuoksi. Osa kationeista jää pysyvästi negatiivisesti varautuneen seinämän pintaan muodostaen niin sanotun Sternin kerroksen, ja osa jakautuu seinämän lähelle muodostaen diffuusiokerroksen. Näiden kahden kerroksen välistä potentiaalia kutsutaan zeta-potentiaaliksi ( $\zeta$ ). Kuvassa 8 on esitetty sähköinen kaksoiskerros.

### Silikaseinä



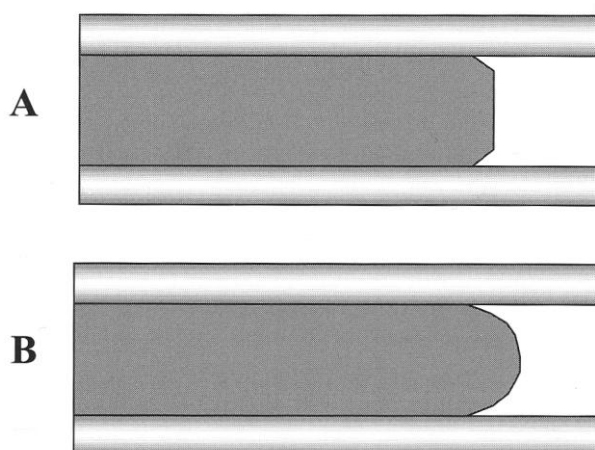
Kuva 8. Sähköinen kaksoiskerros [10, s. 219]

Kun elektrolyyttiliuoksella täytettyyn kapillaariin kytketään sähkökenttä, alkaa diffuusiokerros liikkua kohti katodia. Tätä diffuusiokerroksen liikkumista kutsutaan elektro-osmoottiseksi virtaukseksi (electro-osmotic flow, EOF). Elektro-osmoottisen virtauksen muodostuminen kapillaariin on esitetty kuvassa 9.



Kuva 9. Elektro-osmoottisen virtauksen muodostuminen kapillaariin [8, s. 224]

Sähköisen kaksoiskerroksen paksuuden vuoksi (< 10 nm) virtausprofiili on muodoltaan tylppä. Juuri virtausprofiilista johtuen piikit ovat hyvin teräviä verrattuna kromatografisiin erotuksiin, joissa liikkuvan faasin virtausprofiili on parabolinen. Virtausprofiileja on esitetty kuvassa 10.



Kuva 10. Elektro-osmoottisen virtauksen tylppä virtausprofiili kapillaarissa (A) ja pumppauksen aiheuttama parabolinen virtausprofiili kromatografiassa (B) [8, s. 224]

Elektro-osmoottisen virtauksen kontrollointi on tärkeää, koska silikakapillaarin sisäpinnalla tapahtuvat muutokset vaikuttavat suoraan elektro-osmoottisen virtauksen toistettavuuteen ja samalla analyyttien migraatioaikojen toistettavuuteen. Zeta-potentiaaliin, viskositeettiin ja dielektrisyysvakioon ja samalla siis elektro-osmoottiseen virtaukseen voidaan vaikuttaa muuttamalla elektrolyyttiliuoksen koostumusta. pH:n laskeminen alentaa zeta-potentiaalia ja samalla elektro-osmoottisen virtauksen nopeutta, koska happamissa liuoksissa kapillaarin sisäpinnan silanoliryhmien dissosiaatioaste vähenee.

Elektro-osmoottiseen virtaukseen voidaan vaikuttaa myös elektrolyyttiliuoksen ionivahvuudella ja liuokseen lisättävillä lisäaineilla (muun muassa orgaaniset modifioijat). [8, s. 225.]

### 3.3.2 Joule-lämpö

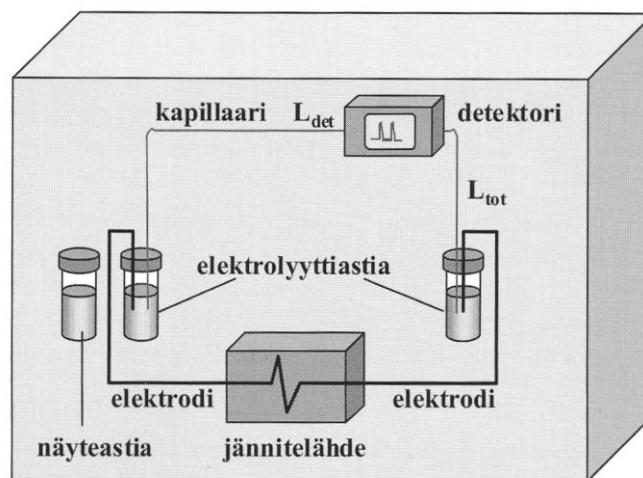
Erotuskapillaarissa kulkevan sähkövirran johdosta kapillaarin sisällä muodostuu lämpöä. Tätä muodostunutta lämpöä kutsutaan Joule-lämmöksi, joka syntyy, kun sähkökentän vaikutuksesta elektrolyyttiliuoksessa liikkuvat ionit luovuttavat ympäristöönsä energiaa. Virran voimakkuudella on fysiikan lain mukaan suora vaikutus Joule-lämpöön: mitä suurempi virta, sitä suurempi lämmön nousu.

$$P = U \cdot I \quad (1)$$

Joule-lämmön vaikutuksesta kapillaarin sisään muodostuu kapillaarin säteen suuntainen lämpötilagradientti: keskellä kapillaaria lämpötila on korkeampi kuin laidoilla. Lämpötila vaikuttaa suoraan näytteen ja elektrolyyttiliuoksen viskositeettiin; keskellä kapillaaria viskositeetti on alhaisempi kuin laidoilla, jolloin virtausprofiili muuttuu paraboliseksi. Lämpötilagradientti vaikuttaa lisäksi lämpöherkkien yhdisteiden pysyvyyteen, kapillaarin zeta-potentiaaliin, yhdisteiden  $pK_a$ -arvoihin, dissosiaatiovakioihin ja elektroforeettisiin liikkuvuuksiin. [8, s. 222 - 226.]

### 3.4 Laitteisto

Kapillaarielektroforeesi koostuu jännitelähteestä, näyte- ja puskuriastioista, kapillaarista ja detektorista. Laitteistoon voidaan lisätä erilaisia lisälaitteita, kuten esimerkiksi automaattinen näytteensyöttäjä, kapillaarin ja näyte- ja puskuriastioiden termostointiyksikkö sekä fraktion keräyssysteemi. Kapillaarielektroforeesilaitteen kaaviokuva on esitetty kuvassa 11.



Kuva 11. Kaaviokuva kapillaarielektroforeesilaitteistosta [8, s. 227]

Tärkeimmät erotukseen vaikuttavat tekijät ovat kapillaarin pituus, kapillaarin sisähalkaisija, elektro-osmoottinen virtaus, sähkökentän voimakkuus, lämpötila, viskositeetti, sähkövirta, elektrolyytin ionivahvuus ja pH.

Kapillaarin sisähalkaisijan kasvattaminen lisää näytekapasiteettia ja parantaa detektointiherkkyyttä, mutta toisaalta lisää Joule-lämmön muodostumis-



ta. Kapillaarin pidentäminen puolestaan kasvattaa pohjalukua ja migraatioaikoja, pienentää virtaa ja parantaa resoluutiota.

Jännitteen kasvattaminen parantaa resoluutiota, erotustehokkuutta ja lyhentää analyysiaikaa. Toisaalta Joule-lämmön muodostuminen lisääntyy, jolloin lämpötilaa on syytä kontrolloida varsinkin korkeilla jännitteillä.

Lämpötilan kasvattaminen lyhentää analyysiaikaa, alentaa elektrolyyttiliuoksen viskositeettia ja kasvattaa siten sähkövirtaa. Lisäksi se voi vaikuttaa erotustehokkuuteen, piikkien muotoon, resoluutioon, puskurin pH-arvoon sekä yhdisteiden  $pK_a$ -arvoihin ja siten niiden ionisoitumisasteeseen. Muodostuva Joule-lämpö heikentää erotustehokkuutta ja leventää piikkejä.

Ionivahvuuden kasvattaminen alentaa kapillaarin seinämän zeta-potentiaalia, jolloin elektro-osmoottinen virtaus hidastuu ja migraatioajat kasvavat. Ionivahvuuden kasvattaminen myös lisää virtaa, parantaa resoluutiota ja piikkien muotoa. [8, s. 227 - 228.]

### 3.5 Elektrolyyttipuskurit

Elektrolyyttiliuoksella on keskeinen merkitys kapillaarielektroforeesitekniikoissa, koska se vaikuttaa ensisijaisesti näytekomponenttien migraatioominaisuuksiin. Elektrolyyttiliuoksina käytetään tavallisimmin erilaisia vesipohjaisia puskuriliuoksia. Elektrolyytin puskurointitehokkuus käytettävällä pH-alueella vaikuttaa analyysien toistettavuuteen. Sopivaa elektrolyyttiä valittaessa täytyy ottaa huomioon sen ionivahvuus ja elektrolyytin absorptio UV-detektoria käytettäessä.

Puskurin ionivahvuus on suoraan verrannollinen muodostuvaan virtaan eli mitä suurempi ionivahvuus, sitä suurempi virta kapillaariin muodostuu. Ionivahvuudella on merkitystä myös elektro-osmoottiseen virtaukseen: ionivahvuuden kasvaessa elektro-osmoottinen virta pienenee. Yleensä sopiva elektrolyyttiliuoksen ionivahvuus on 25 - 50 mM, mutta sitä voidaan kasvattaa lisäämällä elektrolyyttiliuokseen jotakin sopivaa suolaa.

Elektrolyyttiliuoksen pH vaikuttaa elektro-osmoottiseen virtaukseen, näytekomponenttien dissosioitumiseen ja siten niiden elektroforeettiseen liikkuvuuteen. Zeta-potentiaali on negatiivinen päällystämättömillä kapillaareilla ja elektro-osmoottinen virtaus suuntautuu kohti katodia. Happamien yhdistei-

den erotuksissa elektrolyyttiliuoksen pH-arvoksi valitaan yleensä 1 - 2 pH-yksikköä korkeampi pH-arvo kuin näytteiden  $pK_a$ -arvot, koska tällöin yhdisteet ovat anioneina. Vastaavasti emäksisten yhdisteiden erotuksissa pH-arvoiksi valitaan noin 1 - 2 pH-yksikköä alhaisempi pH-arvo kuin näytteiden  $pK_a$ -arvot, koska tällöin yhdisteet ovat kationeina.

Elektrolyyttiliuokseen voidaan myös lisätä aineita, jotka vaikuttavat muun muassa selektiivisyyteen ja liukoisuuteen. Orgaanisia liuottimia (esimerkiksi metanoli) käytetään usein lisäämään hydrofobisten näytekomponenttien liukoisuutta, alentamaan virtoja sekä parantamaan selektiivisyyttä ja resoluutiota. Elektrolyyttiliuoksen viskositeetin muuttuessa modifioidaan analyttien elektroforeettista liikkuvuutta ja elektro-osmoottista virtausta. Orgaaniset liuottimet vaikuttavat myös zeta-potentiaaliin, koska liuoksen dielektrisyysvakio muuttuu. Orgaanisen liuottimen osuuden kasvaessa puskuriliuoksessa zeta-potentiaali yleensä laskee. Mitä korkeampi puskurin pH on, sitä voimakkaampi vaikutus on. [8, s. 229 - 231.]

### 3.6 Näytteensyöttö

Kapillaarien pienien tilavuuksien vuoksi injektoidavat näytemäärät ovat pieniä, muutamia nanolitroja. Yleensä näyte syötetään suoraan kapillaarin alkusaan paineen tai jännitteen avulla.

#### *Lapponäytteensyöttö*

Näytteensyöttöön tarvittava paine-ero muodostetaan nostamalla näyteastia, jolloin näyte virtaa kapillaariin nestepintojen korkeuseron aiheuttaman paine-eron vuoksi.

#### *Keräysastian alipaineistaminen tai näyteastian ylipaineistaminen*

Keräysastia voidaan alipaineistaa, tai näyteastia ylipaineistaa, näytteensyötön ajaksi, jolloin näyte virtaa kapillaariin. Paine poistetaan näytteensyötön jälkeen. [8, s. 231 - 233.]

#### *Elektrokineettinen näytteensyöttö*

Elektrokineettisessä näytteensyötössä toisen puolen kapillaari ja elektrodi siirretään näyteastiaan injektoinnin ajaksi. Näyte siirtyy kapillaariin, kun elektrodien välille kytketään lyhyeksi ajaksi jännite. Kapillaariin kulkeutuvat

anionit, kationit ja neutraalit yhdisteet. Anionien ja kationien määrä kapillaarissa riippuu kytketyn jännitteen suunnasta. [6, s. 181.]

### 3.7 Näytevyöhykkeiden konsentroidi näytteensyötön yhteydessä

Kapillaarielektroforeesitekniikoissa injektoidavat näytemäärät ovat pieniä ja pitoisuudeltaan laimeita. Näytteet vaativat usein konsentroidia ja se voidaan tehdä joko näytteen esikäsittelyn yhteydessä tai näytteensyötön yhteydessä.

#### *Ajon aikainen näytevyöhykkeen fokusointi*

Ajon aikainen näytevyöhykkeen fokusointi (stacking) syntyy, kun näytevyöhykkeen ionivahvuus on oleellisesti pienempi kuin puskuriliuoksen. Tällöin näytevyöhyke väkevöityy kulkusuunnassa kapeammaksi vyöhykkeeksi, mikä ilmenee piikin korkeuden kasvuna. Fokusointilähtökohdat saavutetaan helposti liuottamalla näytteet vesiliuoksiin. [11, s. 665 - 666.]

### 3.8 Erotuskapillaarit

Kapillaarielektroforeesitekniikoissa käytetään ulkopinnalta polyimidillä päällystettyjä silikakapillaareja, joiden sisähalkaisija on 25 - 100  $\mu\text{m}$ . Kapillaarin sisäseinämä voidaan päällystää dynaamisesti tai sitomalla päällystemateriaali kapillaarin pinnan silanoliryhmiin. Kapillaarin päällystämällä pyritään kontrolloimaan elektro-osmoottista virtausta ja vähentämään näytteen adsorptiota kapillaarin seinämään.

Kapillaarin pintaa voidaan modifioida lisäämällä elektrolyyttiin sopivia yhdisteitä, jolloin puhutaan kapillaarin pinnan dynaamisesta päällystämisestä. Dynaaminen päällystäminen voidaan toteuttaa ajo- tai huuhtelupuskurin sisältämällä päällystemolekyyleillä. Yleisimmin käytettäviä lisäaineita ovat kationiset pinta-aktiiviset aineet ja amiinit. Amfoteeristen pinta-aktiivisten aineiden avulla voidaan muuttaa elektro-osmoottisen virtauksen suuntaa muuttamalla liuoksen pH-arvoa. Lisäaineet vuorovaikuttavat kapillaarin sisäpinnan kanssa muuttaen sen varausta ja hydrofobisuutta. Dynaamisen päällystykseen etuna on sen stabiilisuus, koska päällystys uusiutuu jatkuvasti. Modifiointiaineet saattavat muodostaa erilaisia komplekseja näytekomponenttien kanssa, mikä hankaloittaa niiden käyttöä. Lisäksi ne saattavat häiritä detektointia tai vaikuttavat liuoksen johtokykyyn. [8, s. 238 - 240.]

### 3.9 Detektorit

Kapillaarielektroforeesitekniikoissa näytetilavuudet ovat hyvin pieniä. Tavallisin kapillaarielektroforeesissa käytettävä detektointimenetelmä on suoraan kapillaarista mitattava absorptio tai fluoresenssi. Kapillaarielektroforeesi on myös mahdollista liittää massaspektrometriin.

#### 3.9.1 UV/VIS-detektorit

Kapillaarielektroforeesissa suoraan kapillaarin läpi tehtävien absorptiomittauksen herkkyyttä heikentää lyhyt kapillaarinsisäinen valotie. Valotien lyhyttä voidaan kuitenkin kompensoida käyttämällä lamppua, jolla on suuri intensiteetti, mikä parantaa signaali-kohinasuhdetta. Lisäksi kapillaari täytyy asentaa oikein säteeseen nähden sekä valita hilan asetukset oikein. Detektointiherkkyttä voidaan parantaa kasvattamalla valotien pituutta.

Käänteistä UV-detektointia käytetään erityisesti pienten ionisten yhdisteiden detektoinissa, koska niiden UV-absorptio on hyvin heikko. Tällöin elektrolyyttiin lisätään jotakin voimakkaasti UV-absorboivaa yhdistettä, mikä aiheuttaa taustasignaalin. Epäaktiivisen analyytin kulkeutuessa detektorille, havaitaan yhdiste taustasignaalin alenemana eli negatiivisina piikkeinä. Suorassa UV-detektoinnissa elektrolyytistä puuttuu absorboivat yhdisteet. [11, 667 - 668.]

#### 3.9.2 Fluoresenssidetektorit

Fluoresenssidetektoria käytetään kapillaarielektroforeesitekniikoissa fluoresoivien yhdisteiden analytiikassa. Se on selektiivisempi ja herkempi kuin UV/VIS-detektorit. Yhdisteiden detektointiherkkyttä voidaan parantaa kasvattamalla viritysvalon intensiteettiä. [8, s. 241 - 243.]

#### 3.9.3 Diodirividetektorit

Diodirividetektorilla (Diode-array detector, DAD) voidaan detektoida yhtä tai useampaa aallonpituutta samalla mittauskerralla. Diodirividetektorissa akromaattinen linssi ohjaa valon kapillaariin ja valosäde hajotetaan hilan avulla. Hajonneet eri aallonpituiset valosäteet osuvat eri diodeihin, joista kukin mittaa itsenäisesti siihen tulevaa valoa. Yhteen diodiin osuvan aallonpituuskais-tan leveys riippuu diodien määrästä ja käytettävästä kokonaisuallonpituus-alueesta.

Diodirividetektorin merkittävä etu on sen nopeus, koska sillä pystyy mittaamaan koko aallonpituusalueen (esimerkiksi 190 nm - 600 nm) yhdellä mittauskerralla. Tällöin kaikki kyseisellä aallonpituusalueella absorboivat yhdisteet detektoidaan. Mittauksen jälkeen voi määrittää, millä aallonpituuksilla näyte absorboi eniten ja valita ne aallonpituudet seuraaviin mittauksiin. [9, s. 105 - 106.]

## 4 TYÖSSÄ KÄYTETYT ANALYYSILAITTEET JA MATERIAALIT

Kuulakärkikynämustenäytteiden analysoiminen suoritettiin Rikosteknisen laboratorion jo olemassa olevalla kapillaarielektroforeesilla. Joitakin ajoliuoksia ja väriaineita hankittiin mittauksia varten.

Mittaukset suoritettiin Beckman Coulter P/ACE MDQ kapillaarielektroforeesilla, jossa ilmaisimena oli diodirividetektori (DAD,  $\lambda = 190 - 600$  nm). Käytössä oli pakkaamaton silikakapillaari, jonka kokonaispituus oli 60 cm ja pituus detektorille (=tehollinen pituus) 50 cm. Kapillaarin sisähalkaisija oli 75  $\mu\text{m}$ .

Työn mittaukset suoritettiin suurimmaksi osaksi 25 kV:n jännitteellä ja kapillaarin termostointiyksikön ollessa 30 °C:n lämpötilassa. Ilmaisimessa käytettiin aallonpituutta 214 nm.

Lopulliset mittaukset suoritettiin kevyemmällä olosuhteilla, 20 kV jännitteellä, 20 °C:n lämpötilassa ja aallonpituuksilla 214 nm ja 580 nm. Lopullisten mitausten tarkemmat mittausolosuhteet ovat liitteenä.

### 4.1 Ajoliuokset

Ajoelektrolyytteinä käytettiin kaupallisia ionianalyysiin tarkoitettuja kittejä. Kitien käyttöön päädyttiin, koska niiden käyttö kapillaarielektroforeesilla hallittiin jo ennestään. Kitit ovat laitevalmistajan suosittelemia ja maahantuomia (liite 2). Työssä käytettiin kolmea erilaista elektrolyyttikitteä, CEofix Kit pH 9,2, CEofix Kit pH 4,3 ja CEofix Cations HR Kit.

CEofix Kit pH 9,2 on tarkoitettu pienten orgaanisten happoluonnetta omaavien molekyylien erotteluun kapillaarielektroforeesilla. Kitti sisältää 80 ml fosfaattipuskuria (pH 2,5), joka toimii kapillaarin sisäpinnan pinnoittajana. Kitti sisältää myös 240 ml 150 mM boraattipuskuria (pH 9,2), joka toimii erottelevana elektrolyyttiliuoksena ja kapillaarin sisäpinnan uusijana.

CEofix Kit pH 4,3 on vastaavanlainen kitti kuin CEofix Kit pH 9,2, mutta elektrolyyttiliuoksena on 60 mM omenahappopuskuri (pH 4,3). Kitti on tarkoitettu emäsluonnetta omaavien orgaanisten yhdisteiden ja epäorgaanisten kationien toteamiseen.

CEofix Cations HR Kit on tarkoitettu alkalien, maa-alkalimetallien sekä alifaattisten amiinien analysointiin. Kitti sisältää 9 ml 4-aminopyridiinipuskuria (pH 4,2), joka toimii kapillaarin sisäpinnan muodostajana. Kitti sisältää myös 7 ml 4-aminopyridiiniä (pH 4,2), joka uusii mittausten välissä kapillaarin pinnoituksen. Kitissä on lisäksi 28 ml 4-aminopyridiiniä (pH 4,3), joka toimii elektrolyyttipuskurina. Elektrolyyttipuskuri sisältää UV-aktiivista ainetta, joten se on tarkoitettu ioneille, joilla ei ole omaa UV-vastetta.

## 4.2 Näytteet

Tutkimuksen näytemateriaaliksi valittiin satunnaisesti 11 sinimusteista kuu-lakärkikynää. Kyniä keräiltiin rikosteknisenlaboratorion tiloista ja kotoa. Valintaperusteena oli pääasiassa kynän ulkonäkö ja kynään painettu teksti, jotta kynät voitiin jotenkin nimetä. Näytekyntien musteiden valmistajista tai niiden määristä ei ollut mitään tietoa. Näytekyntä on lueteltu taulukossa 1.

*Taulukko 1. Näytekyntä lajiteltuna valmistajan ja mainostekstin mukaan*

<b>Näyte valmistajan mukaan</b>	<b>Näyte mainostekstin mukaan</b>
Parat	Vip Vescor Oy
Bic Soft feel	Stop Rust Oy
Bic (perus)	AI
Staedtler Stick 430 M	NBC – laitton laboratorio
Pilot	Mikropaino Oy (valkoinen kuori)
	Mikropaino Oy (punainen kuori)

Näytekyntien lisäksi mittauksia varten hankittiin yksittäisiä väriaineita. Väriaineet, valmistajat ja CAS-numerot on lueteltu taulukossa 2.

Taulukko 2. Hankitut väriaineet, niiden valmistajat ja CAS-numerot

Väriaine	CAS-numero	Valmistaja
Metyylivioletti	8004-87-3	Fluka
Kristallivioletti	548-62-9	Riedel-de Haën
Viktoriasininen B	2580-56-5	Fluka

### 4.3 Kapillaarielektroforeesin käyttö

Kapillaarielektroforeesin käyttöönotto mittauspäivinä on hidasta. Ensimmäiseksi käynnistetään laitteen UV-lamppu, koska lampun on lämmitettävä vähintään 30 minuuttia ennen mittauksia. Laitteen kapillaaria huuhdellaan ajo-päivinä 20 minuuttia 0,1 M natriumhydroksidilla ja vielä 10 minuuttia vedellä. Kapillaari huuhdellaan, jotta kapillaarin pinta puhdistuu ja sisäpinta varautuu negatiivisesti vastaanottamaan uuden kaksoispinnoitteen. Yhteensä 30 minuutin kapillaarin huuhtelun jälkeen laite on valmis käytettäväksi. Laitteen näytetarjottimille asetetaan tarvittavat liuokset puskurikittien ja metodien ohjeiden mukaisesti. Mittausten alussa ja lopussa on lyhyitä huuhteluja. Mittauksen alussa kapillaarin kaksoispinnoite uusitaan ja mittausten lopussa kapillaariin mahdollisesti jääneet näytepartikkelit huuhdotaan jäteastiaan. Mittaussarjojen lopuksi kapillaaria huuhdellaan esimerkiksi kahden minuutin ajan vedellä ja UV-lamppu sammutetaan. Kosteana kapillaari säilyy muutaman päivän käyttämättä, mutta pitempää säilytystä varten kapillaari täytyy kuivata. Kuivaus tapahtuu puhaltamalla ilmaa kapillaarin läpi muutaman minuutin ajan.

## 5 TYÖN SUORITUS

Tutkimuksen mittauksissa on käytetty ajo-olosuhteina 25 kV:n jännitettä, 30 °C:n lämpötilaa ja aallonpituutta 214 nm, ellei toisin mainita.

### 5.1 Alkumittaukset

Kuulakärkikynämusteet olivat niukkaliukoisia veteen sideainekomponenttien osalta [12]. Tämän vuoksi näytteet tuli liuottaa orgaaniseen liuottimeen. Aluksi siis selvitettiin, kuinka paljon orgaaninen liuotin hidastaa elektroosmoottista virtausta ja seuraako suuresta orgaanisesta osuudesta kapillaarin kaksoispinnoituksen hajaantuminen.

Työhön lähdettiin olemassa olevalla Cations HR -puskurikitillä. Näytteenä käytettiin kitin mukana tullutta testiliuosta, joka sisältää kuusi pientä epäorgaanista kationia. Näyte mitattiin ajopuskureilla, joissa oli kahta eri orgaanista liuotinta, metanolia ja asetonitriliä [13]. Ajopuskureiden liuotinpitoisuudet olivat 30 % ja 50 %. Ajot suoritettiin 30 kV:n jännitteellä ja kapillaari oli termostoitu 20 °C:n lämpötilaan.

Kaksoispinnoituksen hajoamisesta orgaanisilla puskurisysteemeillä ei ollut merkkejä. Kaikki testiliuoksen kuusi piikkiä saatiin detektoitua, mutta migraatioajan pitenivät oletetusti. Metanolilla migraatioajat pitenivät enemmän kuin asetonitrilillä. Suurempi orgaaninen osuus johti pitempään migraatioaikaan.

Aluksi näytteinä käytettiin märkämusteita, vaikka tämä ei vastaa todellista, paperinäytteisiin kohdistuvaa analyysitilannetta.

Bic Soft -kynän mustesäiliöstä otettiin märkämustetta ja liuotettiin 2 ml:aan metanolia. Tästä tehtiin noin 1:10 laimennos 30 % asetonitriliajopuskuriin ja näyte ruiskusuodatettiin. Näyte mitattiin samoilla laiteasetuksilla kuin edellä ja ajopuskurilla, jossa oli 30 % asetonitriliä. Aallonpituudella 214 nm detektoitiin vain muutama pieni piikki, eikä tulos muuttunut näkyvän alueen aallonpituuksilla (400 - 600 nm). Cations HR -kitin puskurin oli tehty käänteiseen UV-ilmaisuun, joten tuloksen heikkoutta pidettiin sen syynä.

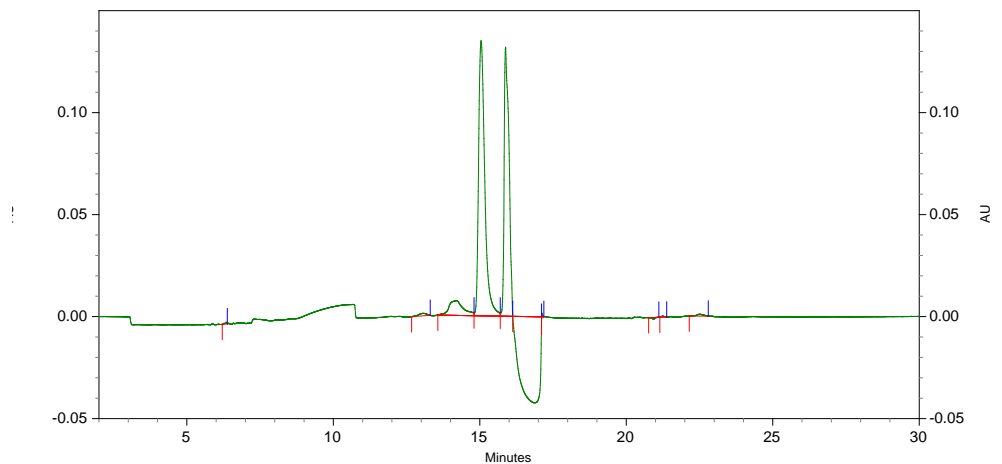


## 5.2 Mittaukset mustenäytteistä

Seuraavia mittauksia varten hankittiin suoraan ilmaisuun tarkoitetut CEofix Kit pH 4,3 ja CEofix Kit pH 9,2 -puskurikitit. Kitit eivät sisältäneet UV-aktiivista ainesosaa, joka oli Cations HR -kitin ajopuskurissa.

Aluksi selvitettiin elektro-osmoottisen virtauksen paikka pH 4,3-ajopuskurilla, johon oli sekoitettu 30 % metanolia. Elektro-osmoottisen virtauksen paikka selvitettiin, koska kationiset yhdisteet (musteet) migroituvat ennen elektro-osmoottisen virtauksen piikkiä. 30 % metanolilla elektro-osmoottinen virtaus oli jo 24 minuuttia.

Bic Soft -märkämustenäyte laimennettiin 1:10 30 % metanoli-pH 4,3 -ajopuskurilla. Mittaukset suoritettiin pH 4,3 -ajopuskureilla, joissa oli 30 % metanolia. Bic Soft -näytteestä todettiin selkeitä piikkejä, joten loput 10 mustenäytettä valmistettiin ja mitattiin kuten edellä. Kuvassa 12 on esitetty Vip Vescor -märkämustenäytteen elektroferogrammi.



Kuva 12. Vip Vescor -märkämustenäytteen elektroferogrammi

Märkämustenäytteet muodostivat erilaisten elektroferogrammien perusteella aallonpituudella 214 nm neljä ryhmää, jotka on esitetty taulukossa 3.

Taulukko 3. Märkämustenäytteiden muodostamat ryhmät

Ryhmä 1	NBC, Mikropaino punainen, Mikropaino valkoinen, AI, Staedtler, Stop Rust, Vip Vescor, Bic Soft
Ryhmä 2	Bic perus
Ryhmä 3	Pilot
Ryhmä 4	Parat

Lisäksi selvitettiin, tuleeko näkyvän alueen ilmaisulla enemmän ja isompia piikkejä. Keltaisen värin aallonpituus (noin 580 nm) ei kuitenkaan kasvattanut piikkejä, vaikka kohdeyhdisteet olivat sinisiä; absorboivat siis keltaista aallonpituutta. Tästä seurasi se, ettei tiedetty, mitkä piikit olivat itse väriainneiden aiheuttamia piikkejä. Märkämusteilla ei tehty enää mittauksia.

### 5.3 Paperinäytteiden valmistus

Kopiopaperille piirrettiin näytekynillä mustejälkiä. Parat-mustenäytteestä puhkaistiin nahkapaskalilla kaksi palaa kahteen pieneen putkeen. Toinen mustenäyte liuotettiin pyridiiniin ja toinen pyridiinipuskurisysteemiin. Pyridiiniä kokeiltiin, koska se on suosittu uuttoluotin paperinäytteiden musteille.

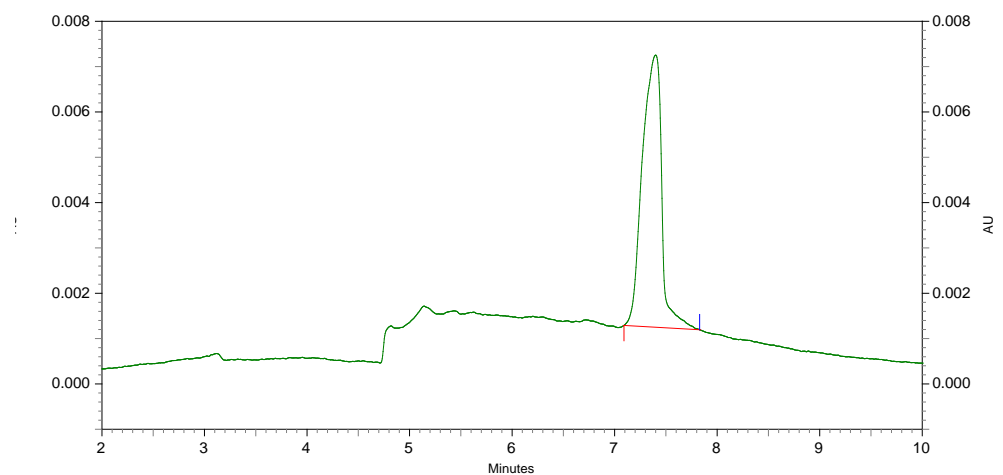
Pyridiiniuutetta ei voitu syöttää sellaisenaan laitteeseen, koska pelkkää orgaanista liuotinta sisältävä näytevyöhyke kapillaarissa katkaisi virrankulun ja tuloksena oli vain kohinaa. Mukana oli oltava vesi- tai puskurikomponentti.

Paperinäytteen valmistus ja uutto oli muutoin helppoa ja suoraviivaista. Näytteen kokonaistilavuutena oli noin 50 µl. Aluksi annosteltiin orgaaninen liuotin (50 % kokonaisuudesta) ja tämän jälkeen vesi- tai puskuriosa. Tällä tavoin ei havaittu musteen liukoisuusongelmia ja suodatettuna näyte oli valmis syötettäväksi laitteeseen.

#### 5.4 Mittaukset väriainestandeista ajopuskurilla pH 4,3

Metyylivioletti-, kristallivioletti- ja viktoriasininenyhdisteistä valmistettiin standardiliuokset väriaineiden migraatioaikojen selvittämiseksi. Väriaineita sekoitettiin metanolipuskuriliuokseen. Liuosten pitoisuuksia ei tunnettu, koska tarkoituksena oli saada vain piikit näkymään. Kolme standardiliuosta mitattiin 30 % metanoliajopuskureilla ja 25 kV/ 30 °C -asetuksilla.

Kristallivioletti ja metyyllivioletti migroituivat lähes päällekkäin, noin 7,5 minuutissa. Yhtä lukuun ottamatta kaikissa aiemmissä märkämustemittauksissa esiintyi tämä piikki. Kristallivioletin piikki on esitetty kuvassa 13. Viktoriasinisen piikkejä ei näkynyt.



Kuva 13. Kristallivioletin piikki,  $\lambda = 214 \text{ nm}$

#### 5.5 Mittaukset paperinäytteistä ajopuskurilla pH 4,3

Lähtökohtana oli, että musteissa olisi useampia väriaineita kuin kristallivioletti, metyyllivioletti ja viktoriasininen. Piikkien vähäisyys johtui kenties liukoisuusongelmista, jotka johtivat siihen, että jotkut muut vielä tunnistamattomat mahdolliset väriaineet yksinkertaisesti saostuivat kapillaarin seinille tai jäivät suodattimelle uutteen käsittelyssä. Tämän johdosta mitattiin vertailun vuoksi kaksi satunnaisesti valittua paperinäytettä, Bic perus ja NBC, 50 % ja 30 % metanolipuskurisysteemeillä.

Uusia piikkejä ei ilmennyt, mutta 50 % systeemissä kristallivioletti/metyyliviolettipiikin ympäristö alkoi saada hienorakennetta, olkapäitä sekä pieniä piikkejä ennen ja jälkeen. 50 % metanolipuskuri kasvatti viskositeettia ja hidasti mittausta. Elektro-osmoottinen virtaus oli jo 28 minuutin kohdalla.

Tämä hitaus kenties edesauttoi hienorakenteen syntymistä. Hitaudesta huolimatta mitattiin loput yhdeksän paperinäytettä.

Pelkästään kristallivioletti/metyyliviolettipiikin ympäristössä ollutta hienorakennetta tarkastelemalla voitiin havaita 4 - 5 erilaista musteryhmää. Musteiden erottelun kannalta keskeistä oli kuitenkin, että kristallivioletti/metyylivioletti-alueen ulkopuolella kationisia piikkejä oli hyvin vähän.

## 5.6 Orgaanisen liuottimen vaihdon vaikutus mittauksiin

Kuulakärkikynämusteiden erottelu perustui piikkien rakenne-eroihin. Kristallivioletin/metyylivioletin lisäksi muita piikkejä ei ollut havaittu. Seuraavaksi keskityttiin näytejoukon piikkihienorakenteeseen. Perusedellytyksen mukaan hienorakenne piti saada pohjaviivalla erotettua pääpiikistä. Tuloksiin pääsemiseksi jännitettä ja käyttölämpötilaa olisi pitänyt muuttaa pienemmiksi, esimerkiksi 15 kV/20 °C. Metanoliajopuskurisysteemillä elektro-osmoottinen virtaus olisi hidastunut jo lähes tunnin mittaiseksi. Projektin alusta kuitenkin tiedettiin, että asetonitriiliajopuskurisysteemeillä on selvästi nopeampi elektro-osmoottinen virtaus. Lisäksi tiedettiin myös, että asetonitriilisysteemeillä elektro-osmoottinen virtaus on paitsi nopeampi, myös verraten riippumaton asetonitriilipitoisuudesta. Ajoliuoksen ja näytteiden orgaaninen liuotin vaihdettiin metanolista asetonitriiliin.

Mitattiin Bic perus- ja NBC-paperinäytteet 50 % asetonitriiliajopuskurisysteemillä. Ajassa säästettiin paljon, mutta muuta hyötyä piikkierotteluun ei syntynyt. Tämähän tehtiinkin vielä 25 kV / 30 °C -olosuhteissa.

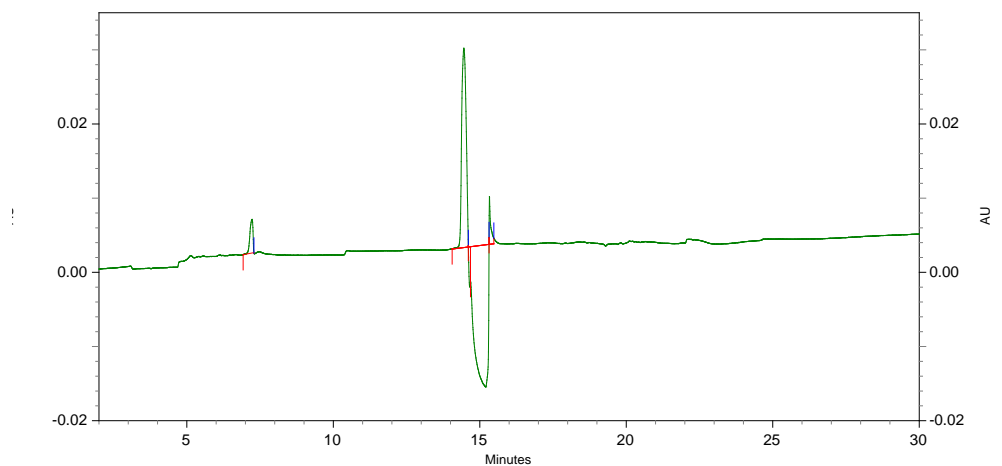
## 5.7 Väriainestandardien ajonaikainen näytevyöhykkeen fokusointi

Ennen kuin asetonitriiliajopuskurisysteemillä alettiin mitata näytteitä alemmalla jännitteellä ja alemmassa lämpötilassa, kokeiltiin, miten ajon aikainen näytevyöhykkeen fokusointi vaikuttaisi tuloksiin. Standardit ja paperinäytteet liuotettiin ajopuskuri-liuotinseoksen sijasta vesi-liuotinseokseen

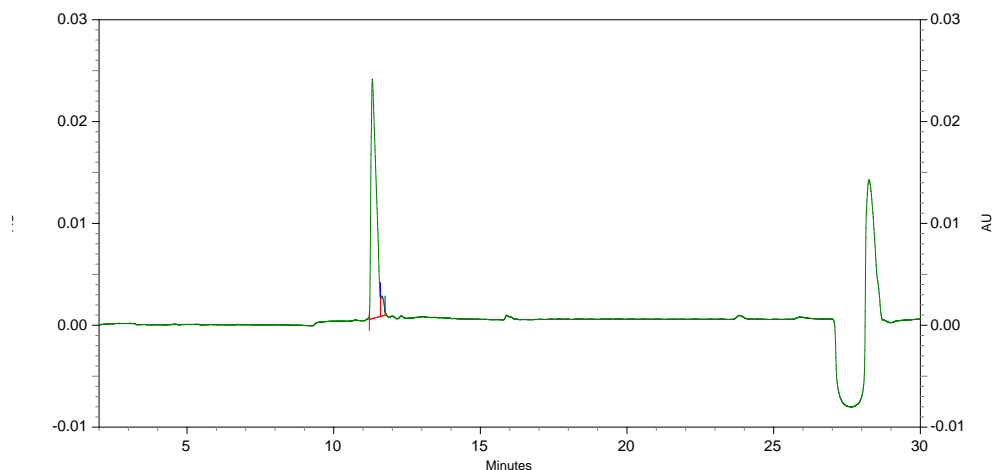
Standardiaineet valmistettiin sekä asetonitriili-vesi- ja metanoli-veisysteemeihin ja ajettiin 50 % asetonitriiliajopuskurilla (pH 4,3), 50 % metanoliajopuskurilla (pH 4,3), 50 % asetonitriiliajopuskurilla (pH 9,2) ja 50 % metanoliajopuskurilla (pH 9,2).

Puskuri pH 9,2 otettiin mittauksiin mukaan, koska korkeammassa pH:ssa elektro-osmoottinen virtaus on nopeampi suuremmasta kapillaarin pinnan varausasteesta johtuen.

Kuvan 14 elektroferogrammista metyyli violetti on sekoitettu metanoliin ja ajopuskuriin. Kuvan 15 elektroferogrammista metyyli violetti on sekoitettu metanoliin ja veteen. Kuvan 14 mittauksissa käytettiin 30 % metanoliajopuskuria ja kuvan 15 mittauksissa käytettiin 50 % metanoliajopuskuria. Tämän vuoksi elektro-osmoottisen virtauksen piikki on kuvassa 14 noin 15 minuutin kohdalla ja kuvassa 15 vasta 28 minuutin kohdalla.



*Kuva 14. Metyyli violetti sekoitettu metanoliin ja ajopuskuriin,  $\lambda = 214$  nm. 30 % metanoliajopuskurilla (pH 4,3) metyyli violetin migraatioaika noin 7,5 minuuttia.*



*Kuva 15. Metyyli violetti sekoitettu metanoliin ja veteen,  $\lambda = 214$  nm. 50 % metanoliajopuskurilla (pH 4,3) metyyli violetin migraatioaika noin 11,5 minuuttia.*

Ajonaikainen näytesyöhykkeen fokusointi toi siis paljon herkkyyttä ja myös piikin hienorakennetta esiin. Lisäksi 600 nm (keltainen) aallonpituus oli käytökelpoinen ja toi edelleen lisäherkkyttä.

Kautta linjan pH 4,3-ajopuskurilla saatiin isommat piikit, mutta monissa tapauksissa pH 9,2-ajopuskuri toi esiin enemmän hienorakennetta.

## 5.8 Paperinäytteiden ajonaikainen näytesyöhykkeen fokusointi

Edelleen kristallivioletti/metyylivioletti -alueen piikkihienorakenteen toteamistarkoituksessa Mikropaino (valkoinen) -paperinäytettä uutettiin asetonitriilillä, metanolilla ja pyridiinillä. Uuttovaiheessa putkiin lisättiin vielä vettä, ajopuskuri pH 4,3 tai ajopuskuri pH 9,2 taulukossa 4 esitetyllä tavalla.

*Taulukko 4. Mikropaino-paperinäytteen käsittelyssä käytetyt liuokset*

Asetonitriili - Vesi	Metanoli - Vesi	Pyridiini - Vesi
Asetonitriili - Ajopuskuri pH 4,3	Metanoli - Ajopuskuri pH 4,3	Pyridiini - Ajopuskuri pH 4,3
Asetonitriili - Ajopuskuri pH 9,2	Metanoli - Ajopuskuri pH 9,2	Pyridiini - Ajopuskuri pH 9,2

Nämä uutteen mitattiin 50 % metanolijopuskurilla (pH 4,3), 50 % asetonitriilijopuskurilla (pH 4,3), 50 % metanolijopuskurilla (pH 9,2) ja 50 % asetonitriilijopuskurilla (pH 9,2).

Vesiuutetut paperinäytteet tuottivat puskuriuutettuja suuremmat piikit. Organisella liuottimella ei ollut merkitystä piikin korkeuteen, mutta pyridiiniä ei voitu käyttää pH:ssa 4,3, koska oli itsekin protonoitunut. Ajopuskuri pH 9,2 ei soveltunut uuttoon, koska piikit jäivät hyvin pieniksi. Metanolijoliuoksessa syntyi hieman useammin piikin hienorakennetta kuin asetonitriilillä. Tämä johtui kenties siitä, että metanolilla migraatioajat olivat jo hyvin pitkät.

## 5.9 Näytejoukon erottelu kapillaarielektroforeesilla

Projekti vietiin loppuun tarkastelemalla, mitä pääväripiikin (kristallivioletti/metyylivioletti) ympäristössä esiintyvä piikkihienorakenne ja muu ennen elektro-osmoottista virtausta migroitava kationinen aines tarjosi erotusmie-

lessä. Käyttöjännitettä ja lämpötilaa laskettiin, jotta piikkirakenteen erottuminen tehostuisi.

Lopulliseen paperinäytteiden kapillaarielektroforeesierotteluun valittiin 50 % asetonitrilijopuskuri pH 4,3, erottelu tehtiin 20 kV:n jännitteellä, 20 °C:n lämpötilassa ja aallonpituuksilla 214 nm ja 580 nm. Paperinäytteet uutettiin 50 % asetonitrili-vesi -yhdistelmään, jossa näytteen kokonaistilavuus oli 50 µl.

Taulukossa 5 on esitetty ennen elektro-osmoottista virtausta migroituneet, teorian mukaan positiivisesti varautuneiden piikkien lukumäärät.

*Taulukko 5. Näytteiden migroituneiden piikkien lukumäärät*

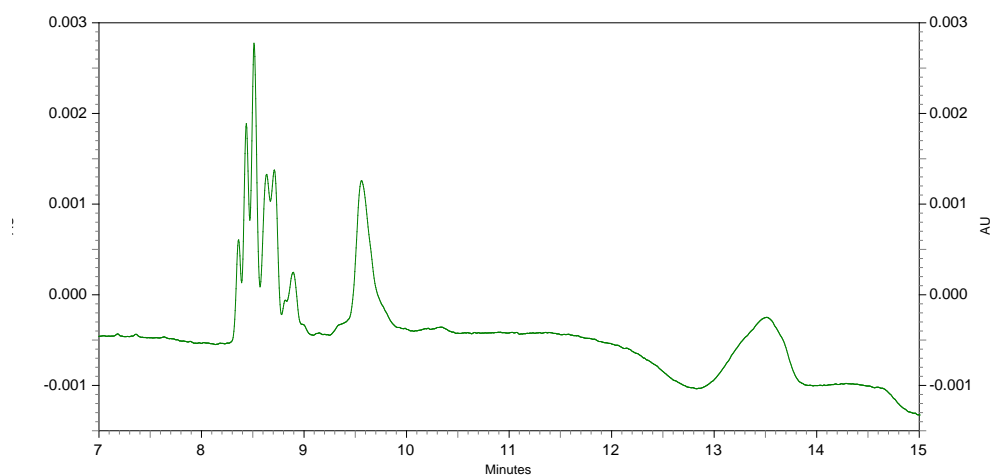
<b>Näyte</b>	<b>Piikkien lukumäärä <math>\lambda=214\text{nm}</math></b>	<b>Piikkien lukumäärä <math>\lambda=580\text{nm}</math></b>
Mikropaino punainen	3	3
Stop Rust Oy	5	5
Bic perus	2	1
Parat	9	3
Pilot	5	3
AI	3	2
NBC - laitton laboratorio	4	3
Staedtler Stick 430M	2	2
Bic Soft feel	6	4
Vip Vescor Oy	3	2
Mikropaino valkoinen	2	1

Näytekohtainen tarkempi piikkiaineisto on liitteenä 3.

Musteet voitiin karkeasti erottaa kahdeksaan ryhmään:

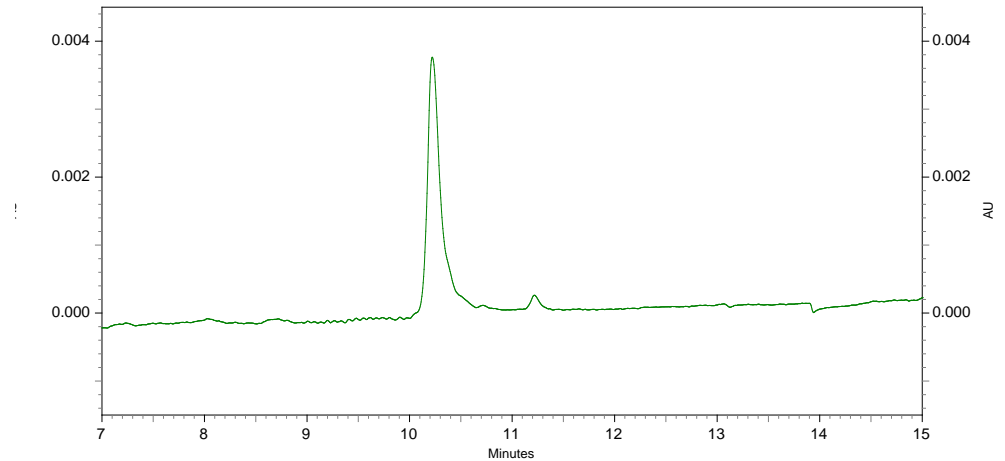
1. Bic (perus)
2. Parat
3. Pilot
4. Staedtler Stick 430M
5. Bic Soft feel
6. Mikropaino (punainen)
7. Mikropaino (valkoinen)
8. Vip Vescor Oy, Al, Stop Rust Oy ja NBC

Piikkihienorakenteeseen perustuva tarkastelu paljasti odotettua enemmän laadullista erotteluvoimaa. Huomattakoon kuitenkin, että näytteistä ajettiin vain yksi toisto. Aallonpituuskohtainen tarkastelu paljastaa, että vain osa piikeistä absorboi näkyvällä alueella (eli ovat värillisiä), joten yllä havaittu näytejoukon laadullinen kapillaarielektroforeesierottelu perustuu väriaineiden lisäksi muuhunkin kationiseen yhdistejoukkoon. Kuvassa 16 ja 17 on esimerkki musteiden kapillaarielektroforeesierottelusta runsaimmillaan ja pelkistetyimmillään.



Kuva 16. Parat-paperinäytteen elektroferogrammi





Kuva 17. Mikropaino (valkoinen)-paperinäytteen elektroferogrammi

## 6 TULOKSET JA PÄÄTELMÄT

Saatujen tulosten perusteella laskettiin kapillaarielektroforeesin erotteluvoima käytetylle näytejoukolle. Erotteluvoima on forensinen käsite, joka kuvaa menetelmän kykyä erottaa laadullisesti materiaaleja. Tässä tapauksessa erotteluvoima kuvaa kuinka monta erilaista mustevalmistetta näytejoukossa voidaan kapillaarielektroforeesilla todeta olevan [14].

$$\text{Erotteluvoima} = \frac{\text{Erotetut näyteparit}}{\text{Näyteparien lukumäärä}}$$

$$\text{Näyteparien määrä} = \frac{n(n-1)}{2}, n = 11$$

$$\text{Näyteparien määrä} = \frac{11(11-1)}{2} = 55$$

Mittauksissa saatiin kahdeksan eri musteryhmää, joten kuusi paria 55:stä jäisi erottumatta:

$$\text{Erotteluvoima} = \frac{55 - 6}{55} = 0,89$$

Muutetaan tämä vielä prosenteiksi kertomalla tulos sadalla.

$$0,89 \cdot 100 \% = 89 \%$$

Erotteluvoiman perusteella kapillaarielektroforeesi erottelee näytejoukon kuulakärkikynämusteet lähes 90 %:sesti. Kapillaarielektroforeesin erottelukyky voi olla vieläkin parempi, koska näytekyntien musteiden koostumuksia ei tiedetty ja saman ryhmän kynissä voi hyvin ollakin samanlainen mustekoostumus.

Cations HR -kitin ajopuskurilla saadut mittaustulokset olivat heikkoja ja puskurit eivät toimineet kuulakärkikynämusteiden analysoimisessa niiden omien UV-vasteiden vuoksi.

CEofix pH 9,2 -kitin ajopuskurit eivät myöskään sopineet näytejoukon analysoimiseen. Elektrolyyttikitin pH oli liian korkea, minkä vuoksi näytteiden väriaineet olivat varauksettomia eli neutraaleja. Tällöin väriaineet olisivat migroituneet yhdessä elektro-osmoottisen virtauksen kanssa.

CEofix pH 4,3 -kitin ajopuskuri sopi väriaineiden analysoimiseen parhaiten. Elektrolyyttikitin pH oli hieman hapan, jolloin jo neutraalissa ympäristössä varautuneet väriaineet olivat varmuudella positiivisesti varautuneita. Kitin ajoliuoksia täytyi kuitenkin käsitellä näytteiden liukoisuusongelmien vuoksi. Näytteiden saostumista kapillaarin seinämille pyrittiin vähentämään lisäämällä ajoliuokseen orgaanista liuotinta. Metanolin ja asetonitriliin vaikutuksia tuloksiin tutkittiin. Ajoliuoksen suuri metanolipitoisuus pidensi mittausaikaa huomattavasti ja näytteiden analysointi olisi vienyt paljon aikaa. Asetonitriliä käytettäessä ei vastaavia ongelmia ollut ja mittausaika ei muuttunut, vaikka asetonitrilipitoisuus kasvoi.

Paperinäytteiden käsittelyssä aluksi näyte liuotettiin orgaaniseen liuottimeen ja ajopuskuriin. Tällöin mittauksista saadut piikit eivät olleet kovin isoja. Ajonaikainen näytteen fokusointi kasvatti piikkien kokoa ja tulokset saavutettiin helposti vaihtamalla näytteen käsittelyssä ajopuskurin tilalle vesi.

Mittausolosuhteiden muuttamisella ei ollut niin suurta merkitystä kuin ajoliuoksilla ja näytteen käsittelyllä. Isommalla jännitteellä ja kapillaarin lämpötilalla mittausajat olivat lyhyempiä. 20 kV:n jännitteellä ja 20 °C:n lämpötilalla mittausaika oli pitempi ja piikkien hienorakenne saatiin esille.

Näytejoukon erottelu perustui piikkien hienorakenteen tarkasteluun. Piikkijoukossa oli muitakin positiivisesti varautuneita yhdisteitä kuin väriaineita. Näitä muita piikkejä ei tunnistettu, mutta siihen ei pyrittykään. Hyvät mittaus-

tulokset paperinäytteistä saatiin 50 % asetonitriiliajopuskurilla (pH 4,3), 20 kV:n jännitteellä ja 20 °C:n lämpötilassa. Piikit detektoitiin aallonpituuksilla 214 nm ja 580 nm. Kahdella aallonpituudella mitattaessa saatiin selville, mitkä piikit ovat peräisin sinisistä väriaineista ja mitkä olivat muista yhdisteistä peräisin.

## 7 YHTEENVETO

Työn tavoitteena oli selvittää kapillaarielektroforeesin erotteluvoimaa sinisten kuulakärkikynien laadullisessa luonnehdinnassa. Näytteinä oli 11 ulkonäöltään erilaista sinisävyistä kuulakärkikynää ja kolme musteissa yleisesti käytettyä väriainetta, viktoriasininen, metyyllivioletti ja kristallivioletti. Kuulakärkikynämusteita ja väriaineita eroteltiin kapillaarielektroforeesilla. Hyviä mittaolosuhteita haettiin muuttamalla sähköjännitettä, kapillaarin lämpötilaa, ilmaisimen aallonpituutta ja ajoliuosten koostumusta sekä näytteen käsittelyllä.

Kapillaarielektroforeesianalytiikasta löytyi musteiden laadullista erottelukykä. Mittaustuloksia tarkasteltaessa havaittiin, että näytejoukon kuulakärkikynämusteiden väriainevariaatiot olivat odotettua vähäisempiä. Hyviin tuloksiin päästiin, kun näytteiden erottelu ulotettiin väriaineista kaikkiin positiivisesti varautuneisiin musteiden ainesosiin. Suoritettujen mittausten perusteella kapillaarielektroforeesin erotteluvoima on hyvä ja kehitetyllä menetelmällä voidaan erotella sinisiä kuulakärkikynämusteita toisistaan.

Saadut tulokset antavat hyvän pohjan menetelmän kehittämiseksi. Menetelmän kehitystä tullaan tekemään näytteensyötön, ajopuskurin sekä näytteen liuotinosuuden osalta. Näytteensyötönä tullaan kokeilemaan elektrokineettistä näytteensyöttöä, jolloin kapillaariin saadaan näytteestä pelkät varautuneet yhdisteet. Myös pitempää näytteensyöttöaika voi kokeilla. Tällöin näytettä imetään kapillaariin 0,5 sekunnin sijaan esimerkiksi koko sekunnin ajan, jolloin näytemäärä kapillaarissa kasvaa. Ajopuskurin ja näytteen liuotinosuutta voi muuttaa. Edellisissä mittauksissa asetonitriilipitoisuus oli 50 %, seuraavaksi kokeillaan pienempää liuotinpitoisuutta ja sen vaikutuksia tuloksiin. Näistä mittauksista saatujen tulosten perusteella tehdään päätös menetelmän mahdollisesta validoinnista ja käyttöönotosta.

Toimeksiantonäytteiden kohdalla ongelmaksi muodostunee vähäiset näytemäärät. Kapillaarielektroforeesilla analysoitavat liuokset ovat ruiskusuodatettavia, mitä varten näytettä täytyy olla riittävästi. Menetelmää ei voi myöskään käyttää asiakirjoihin, joita ei saa vahingoittaa, koska mustetahra leikataan asiakirjasta ennen liuotusta.

Kapillaarielektroforeesianalyysia ei kannata soveltaa toimeksiantotyössä ennen kuin asiakirjatoimi on suorittanut omat mikroskopiaan ja eri valolähteisiin perustuvat visuaaliset mittauksensa. Silloinkaan instrumentaalisia mittauksia ei kannata soveltaa näytepapereihin, jotka asiakirjatoimi on jo todennut varmasti erilaisiksi. Kapillaarielektroforeesin käyttöalueeksi on mielekästä hahmottaa tilanteet, joissa näytepaperin samanlaisuutta koskevat asiakirjatoimen havainnot ovat epävarmat tai positiiviset, siis silloin kun halutaan lisäerottelua.

**VIITELUETTELO**

- [1] Brewer, Jason D. - Hagan, Kristin A. - Egan, James M. Forensic Analysis of Blue Ballpoint Pen Inks Using Capillary Electrophoresis. *Forensic Science Communications*, Volume 7, number 3, 2005.
- [2] Egan, James M. - Hagan, Kristin A. - Brewer Jason D. Forensic Analysis of Black Ballpoint Pen Inks Using Capillary Electrophoresis. *Forensic Science Communications*, Volume 7, number 3, 2005.
- [3] Chemicalland21.com, *Victoria Blue B* [verkkodokumentti]. [Viitattu 9.9.2008]. Saatavissa: <http://www.chemicalland21.com/specialtychem/finechem/VICTORIA%20BLUE%20B.htm>.
- [4] Wikipedia.com, *Methyl Violet 6B* [verkkodokumentti]. 24.1.2007 [viitattu 9.9.2008]. Saatavissa: [http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/f/fe/Methyl\\_Violet\\_6B.png](http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/f/fe/Methyl_Violet_6B.png).
- [5] Wikipedia.com, *Methyl Violet 10B* [verkkodokumentti]. 24.1.2007 [viitattu 9.9.2008]. Saatavissa: [http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/c/cd/Methyl\\_Violet\\_10B.png](http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/c/cd/Methyl_Violet_10B.png).
- [6] Jaarinen, Soili - Niiranen, Jukka, Laboratorion analyysitekniikka. Helsinki: Edita. 5. uud. painos. 2005 (1996).
- [7] Keusch, Peter. *Crystal Violet - a pH Indicator* [verkkodokumentti]. 7.3.2003 [viitattu 9.9.2008]. Saatavissa: [http://www.chemie.uni-regensburg.de/Organische\\_Chemie/Didaktik/Keusch/D-KV-e.htm](http://www.chemie.uni-regensburg.de/Organische_Chemie/Didaktik/Keusch/D-KV-e.htm).
- [8] Riekkola, Marja-Liisa - Hyötyläinen, Tuulia, *Kolonnikromatografia ja elektromigraatiotekniikat*. Helsinki: Yliopistopaino. 2. uud. painos. 2002 (2000).
- [9] *High performance capillary electrophoresis - An introduction*. Agilent Technologies. Germany. 2000.

- [10] Riekkola, Marja-Liisa - Hyötyläinen, Tuulia, *Kolonnikromatografia ja elektromigraatiotekniikat*. Helsinki: Yliopistopaino. 2000.
- [11] Harris, Daniel C. *Quantitative Chemical Analysis*. New York: W.H Freeman and Company. 6. Edition. 2003 (1982).
- [12] Vogt, Carla - Becker, Andreas - Vogt, Jürgen, *Investigation of Ball Point Pen Inks by Capillary Electrophoresis (CE) with UV/Vis Absorbance and Laser Induced Fluorescence Detection and Particle Induced X-Ray Emission (PIXE)*. *Journal of Forensic Sciences*. 1999; 44(4):819-831.
- [13] Mania, Joanna - Xu, Xiaoma - Kościelniak, Paweł, *Validation of the Capillary Electrophoresis Method for the Forensic Ink Analysis*. [Verkkodokumentti]. 2002 [viitattu 9.9.2008]. Saatavissa: <http://www.chemia.uj.edu.pl/~wozniaki/posters/torun.pdf>
- [14] LaPorte, Gerald M. et al, An Evaluation of Matching Unknown Writing Inks with the United States International Ink Library. *Journal of Forensic Sciences*, Volume 51, number 3, 2006.

## KAPILLAARIELEKTROFOREESIN AJOPARAMETRIT

Initial Conditions | PDA Detector Initial Conditions | Time Program

**Auxiliary data channels**

Voltage max: 30.0 kV

Current max: 100.0  $\mu$ A

Power

Pressure

**Mobility channels**

Mobility

Apparent Mobility

Plot trace after voltage ramp

**Analog output scaling**

Factor: 1

**Temperature**

Cartridge: 20.0  $^{\circ}$ C

Sample storage: 25.0  $^{\circ}$ C

**Peak detect parameters**

Threshold: 2

Peak width: 9

**Trigger settings**

Wait for external trigger

Wait until cartridge coolant temperature is reached

Wait until sample storage temperature is reached

**Inlet trays**

Buffer: 36 vials

Sample: 48 vials

**Outlet trays**

Buffer: 36 vials

Sample: 48 vials

Initial Conditions | PDA Detector Initial Conditions | Time Program

**Electropherogram scan data**

Acquisition enabled

Data rate: 4 Hz

Scan range from 190 to 300 nm

**Electropherogram channel data**

Data Rate: 4 Hz

	Acquisition enabled	Reference channel	Wavelength (nm)	Bandwidth (nm)
Channel 1:	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	214	10
Channel 2:	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	580	10
Channel 3:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	280	10
Peak detect:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	250	120

**Filter**

High sensitivity

Normal

High resolution

Peak width (points): 16-25

**Relay 1**

Off

On

**Relay 2**

Off

On

**Reference channel**

Wavelength: 400 nm

Bandwidth: 10 nm

**Absorbance signal**

Direct

Indirect

Initial Conditions		PDA Detector Initial Conditions		Time Program		
Time (min)	Event	Value	Duration	Inlet vial	Outlet vial	Summary
1	Rinse - Pressure	20.0 psi	0.50 min	BI:B1	BO:A1	forward, In / Out vial inc 20
2	Rinse - Pressure	20.0 psi	1.00 min	BI:C1	BO:A1	forward, In / Out vial inc 20
3	Inject - Pressure	0.5 psi	5.0 sec	SI:A1	BO:B1	Override, forward
4	Inject - Pressure	0.1 psi	10.0 sec	BI:D1	BO:B1	No override, forward, In / Out vial inc 20
5	Separate - Voltage	20.0 KV	30.00 min	BI:E1	BO:B1	1.00 Min ramp, normal polarity, In / Out vial inc 20
6	Autozero					Accelerator -> Accelerator (Buffer -> Buffer)
7	Rinse - Pressure	20.0 psi	0.50 min	BI:A1	BO:A1	forward, In / Out vial inc 20
8	Stop data					NaOH -> waste
9	Rinse - Pressure	20.0 psi	0.50 min	BI:F1	BO:A1	forward, In / Out vial inc 20
10	End					H2O -> waste
11						



**ELEKTROLYYTTIKITTIEIN VALMISTAJA JA MAAHANTUOJA**

Elektrolyyttikittien valmistajan yhteystiedot:

Analisis s.a.

Z.I. de Rhines

Rue de Néverlée 11

B-5020 Suarlée, Belgium

Elektrolyyttikittien maahantuojaan yhteystiedot:

Ordior Oy

Konalantie 47 A

00390 Helsinki



Näyte	Migraatioaika (min), aallonpituus 580 nm																						
	8,4	8,5	8,6	9	9,1	9,2	9,3	9,4	9,5	9,6	9,7	10	10,1	10,2	10,3	11,3	12,4	12,9	13	13,2	15,3	15,5	
Mikrop.pun							X		X									X					
StopRust							X		X					X					X			X	
BicPerus				X																			
Parat											X					X					X		
Pilot										X					X						X		
AI											X												
NBC					X	X	X																
Staedtler										X													
BicSoft						X		X									X						
VipVescor						X	X					X											
Mikrop.valk																X							