



การประมาณอายุของคราบเลือด

โดย

นายกฤษณะ พวงระย้า

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชานิติวิทยาศาสตร์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

ปีการศึกษา 2552

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

การประมาณอายุของคราบเลือด

โดย

นายกฤษณะ พวงระย้า

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชานิติวิทยาศาสตร์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

ปีการศึกษา 2552

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

AGE DETERMINATION OF BLOOD STAIN

By

Kridsana Poungraya

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree

MASTER OF SCIENCE

Program of Forensic Science

Graduate School

SILPAKORN UNIVERSITY

2009

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร อนุมัติให้วิทยานิพนธ์เรื่อง “ การประมาณอายุของคราบเลือด ” เสนอโดย นายกฤษณะ พวงระย้า เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชานิติวิทยาศาสตร์

.....

(รองศาสตราจารย์ ดร.ศิริชัย ชินะตั้งกูร)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่.....เดือน..... พ.ศ.....

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธงชัย เตโชวิศาล

คณะกรรมการตรวจสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ พันตำรวจเอกสันต์ สุขวงษ์)

...../...../.....

..... กรรมการ

(พันตำรวจเอกสมภพ เองสมบูรณ์)

...../...../.....

..... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธงชัย เตโชวิศาล)

...../...../.....

49312344 : สาขาวิชานิติวิทยาศาสตร์

คำสำคัญ : อายุของคราบเลือด/ นิติวิทยาศาสตร์/ คราบเลือด

กฤษฎะ พวงระย้า : การประมาณอายุของคราบเลือด. อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ : ผศ.ดร.ธงชัย เตโชวิศาล. 95 หน้า.

คราบเลือดสามารถนำไปใช้ในการพิสูจน์เอกลักษณ์บุคคลได้ แต่จะให้ข้อมูลเพียงเล็กน้อยว่าคราบเลือดได้ถูกทิ้งไว้นานแค่ไหน ซึ่งหากสามารถประมาณอายุของคราบเลือดได้จะเกิดประโยชน์อย่างมากต่องานด้านนิติวิทยาศาสตร์ งานวิจัยนี้ได้ทดลองใช้เครื่อง HPLC เพื่อแสดงความแตกต่างระหว่างชนิดของโปรตีนที่เปลี่ยนแปลงตามระยะเวลา ในคราบเลือดที่ได้มาจากอาสาสมัครจำนวน 4 คน

ผลการวิจัยนี้แสดงให้เห็นโครมาโตแกรมของโปรตีนที่ได้จากการสกัดคราบเลือดบนกระดาษกรอง บนผ้าไซลอน และบนผ้าเวสต์พอยท์ จากการวิเคราะห์พื้นที่พีคของโปรตีนชนิดต่างๆ พบว่าเมื่ออายุของคราบเลือดมากขึ้นพื้นที่ของพีคที่ตรวจพบมีการเปลี่ยนแปลง ในการศึกษาสัดส่วนของพื้นที่พีค D (แอลฟา-โกลบิน) ต่อพื้นที่พีค C (เบตา-โกลบิน) การศึกษาค่าร้อยละของพื้นที่พีค C (%C) และศึกษาค่าร้อยละของพื้นที่พีค D (%D) สรุปได้ว่าการเปลี่ยนแปลงของพื้นที่พีค C และพีค D เทียบกับระยะเวลา สามารถใช้ในการประมาณอายุของคราบเลือดได้

สาขาวิชานิติวิทยาศาสตร์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

ปีการศึกษา 2552

ลายมือชื่อนักศึกษา

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

49312344 : MAJOR : FORENSIC SCIENCE

KEY WORDS : AGE OF BLOOD STAIN / FORENSIC SCIENCE / BLOOD STAIN

KRIDSANA POUNGRAYA : AGE DETERMINATION OF BLOOD STAIN. THESIS

ADVISORS : ASST.PROF.THONGCHAI TACHOWISAN, Ph.D. 95 pp.

Bloodstain allows for the unambiguous identification but provides little information about when the sample was deposited. The ability to determine the age of a blood stain would greatly benefit the forensic science community. We have used HPLC to show that the ratio between different types of protein changes over time in a linear fashion when dried human blood from four individuals.

The results in this study show the chromatograms from bloodstain extracts of filterpaper , solon cloth and westpoint cloth. Analysis of peak area from several kind of proteins presented the peak area change with ages of bloodstains. The conclusion from study of the peak area ratio of D peak (α -globin) to C peak (β -globin) , area percent of C peak (%C) and area percent of D peak (%D) presented the peak area of C peak and D peak may be applicable to the determination of bloodstain age.

Program of forensic science Graduate School, Silpakorn University Academic Year 2009

Student's signature

Thesis Advisors's signature

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษาวิจัยเรื่องการประมาณอายุของคราบเลือด สำเร็จลุล่วงลงได้ ด้วยความกรุณาและความร่วมมือจากบุคคลหลายท่านที่ได้สละเวลา ให้ความรู้ คำแนะนำและข้อคิดเห็นที่มีคุณค่ายิ่ง ผู้วิจัยจักขอขอบคุณในความกรุณาของท่านทั้งหลายเป็นอย่างสูง งานวิจัยครั้งนี้จะไม่สำเร็จลงได้ หากมิได้รับความกรุณาอนุญาตให้ใช้สถานที่และเครื่องมือ ตลอดจนความร่วมมือจากเจ้าหน้าที่ของ ศูนย์วิทยาศาสตร์และวิทยาศาสตร์ประยุกต์ มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี ผู้วิจัยขอขอบคุณเรืออากาศ เอกหญิงนันทิกาญจน์ บำรุงกิจ นายทหารพยาบาล ร.พ.จันทบุรุษเบกษา กรมแพทย์ทหารอากาศ ที่กรุณาช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่างเลือด

นอกจากนี้ ผู้วิจัยขอขอบคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธงชัย เตโชวิศาล ที่ได้กรุณาเป็นที่ปรึกษา ขอขอบคุณ รองศาสตราจารย์ พันตำรวจเอกสันต์ สุขวัฒน์ และ พันตำรวจเอกสมภพ เองสมบุญ ที่ได้กรุณาตรวจแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

สุดท้ายนี้ ผู้วิจัยขอขอบคุณ ผู้ร่วมงานทุกท่านที่ให้การสนับสนุน รวมทั้งขอขอบคุณผู้ที่มีได้เอื้อนาม โดยเฉพาะอย่างยิ่งผู้ที่กรุณาให้เก็บเลือดสำหรับทำการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ ซึ่งมีความสำคัญอย่างยิ่งที่ทำให้วิทยานิพนธ์นี้ประสบความสำเร็จได้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญภาพ.....	ฎ
บทที่	
1 บทนำ.....	1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
ความมุ่งหมายและวัตถุประสงค์ของการศึกษา.....	4
สมมติฐานของการศึกษา.....	4
ขอบเขตการศึกษา.....	4
ข้อจำกัดของการวิจัย.....	4
คำจำกัดความที่ใช้ในการศึกษา.....	5
กรอบแนวคิดของการวิจัย.....	5
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	5
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	6
องค์ประกอบของเลือด.....	7
เม็ดเลือดแดง.....	8
เม็ดเลือดขาว.....	9
เกล็ดเลือด.....	10
พลาสมา.....	11
ระบบบัพเฟอรัในเลือด.....	12
การแข็งตัวของเลือด.....	13
การเก็บพยานวัตถุ.....	14
วิธีการเก็บเลือด.....	15

บทที่	หน้า
โครมาโตกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง.....	16
หลักการแยกสาร.....	18
ชนิดของโครมาโตกราฟีของเหลว.....	19
เครื่องมือโครมาโตกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง.....	20
วิญภาคไหล.....	21
ปั๊ม.....	21
อินเจกเตอร์.....	22
คอลัมน์.....	22
เตาอบ.....	24
ตัวตรวจวัด.....	25
เครื่องประมวลผล.....	29
ข้อควรปฏิบัติในการใช้เครื่องโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง...	29
การบำรุงรักษาเครื่องโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง.....	30
งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	31
การประมาณอายุของคราบเลือด โดย real-time revers transcription PCR.....	31
การประมาณอายุของคราบเลือด โดย AFM.....	34
การประมาณอายุของคราบเลือด โดย High Performance Liquid Chromatography (HPLC).....	38
3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	59
วัสดุอุปกรณ์.....	59
สารเคมี.....	60
วิธีการ.....	60
4 ผลการทดลอง	62
ผลการวิเคราะห์ข้อมูล.....	62
เปรียบเทียบรูปแบบโปรตีนของคราบเลือดบนวัสดุชนิดต่างๆ.....	62
การเปลี่ยนแปลงของโปรตีนในคราบเลือดบนกระดาษกรอง.....	64
การเปลี่ยนแปลงของโปรตีนในคราบเลือดบนผ้าไซลอน.....	67
การเปลี่ยนแปลงของโปรตีนในคราบเลือดบนผ้าเวสต์พอยท์.....	70

บทที่	หน้า
5	
สรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ.....	74
สรุปผลการวิจัย.....	74
การอภิปรายผล.....	76
ข้อเสนอแนะ.....	77
บรรณานุกรม.....	78
ภาคผนวก.....	80
ภาคผนวก ก โครมาโตแกรมจากสารสกัดปราบเลือดบนกระดาษกรอง.....	82
ภาคผนวก ข โครมาโตแกรมจากสารสกัดปราบเลือดบนผ้าใยลอน.....	86
ภาคผนวก ค โครมาโตแกรมจากสารสกัดปราบเลือดบนผ้าเวสต์พอยท์.....	91
ประวัติผู้วิจัย.....	95

สารบัญญัตราง

ตารางที่		หน้า
1	แสดงค่าสัดส่วนของพื้นที่พืค D ต่อพื้นที่พืค C (D/C) จากโครมาโตแกรมของ คราบเลือดบนกระดาษกรอง.....	64
2	แสดงค่าร้อยละของพื้นที่พืค C จากโครมาโตแกรมของคราบเลือด บนกระดาษกรอง.....	65
3	แสดงค่าร้อยละของพื้นที่พืค D จากโครมาโตแกรมของคราบเลือด บนกระดาษกรอง.....	66
4	แสดงค่าสัดส่วนพื้นที่พืค D ต่อพื้นที่พืค C (D/C) จากโครมาโตแกรมของ คราบเลือดบนผ้า ไชลอน.....	67
5	แสดงค่าร้อยละของพื้นที่พืค C (%C) จากโครมาโตแกรมของคราบเลือด บนผ้า ไชลอน.....	68
6	แสดงค่าร้อยละของพื้นที่พืค D (%D) จากโครมาโตแกรมของคราบเลือด บนผ้า ไชลอน.....	69
7	แสดงค่าสัดส่วนพื้นที่พืค D ต่อพื้นที่พืค C (D/C) จากโครมาโตแกรมของ คราบเลือดบนผ้าเวสท์พอยท์.....	70
8	แสดงค่าร้อยละของพื้นที่พืค C จากโครมาโตแกรมของคราบเลือด บนผ้าเวสท์พอยท์.....	71
9	แสดงค่าร้อยละของพื้นที่พืค D จากโครมาโตแกรมของคราบเลือด บนผ้าเวสท์พอยท์.....	72

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	แสดงโมเลกุลจำลองของฮีโมโกลบินและเหล็กจับอยู่กับฮีม.....	9
2	แผนภูมิการเกิดปฏิกิริยาต่อเนื่องของกระบวนการแข็งตัวของเลือด.....	14
3	เครื่องโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC).....	17
4	ปั๊ม (Pump) HPLC.....	22
5	คอลัมน์ (column) HPLC.....	23
6	การวิเคราะห์อัตราส่วน (ratio) ที่เปลี่ยนแปลงตามอายุของคราบเลือด แสดงให้เห็นการเปลี่ยนแปลงของระดับ RNA ตามอายุของคราบเลือด ข้อมูลแสดงให้เห็นอัตราส่วนของ 18 S rRNA กับ β -actin mRNA ซึ่งหาค่าโดย real-time reverse transcription PCR.....	33
7	ผลของการสืบสวนสอบสวนเกี่ยวกับโครงสร้างของหยดเลือดแห้งโดย AFM....	36
8	เปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงของความยืดหยุ่นจากผลของการเปลี่ยนแปลงเวลา คราบเลือดถูกวัดค่าความยืดหยุ่นหลังจากมีอายุได้ 1.5 ชั่วโมง 30 ชั่วโมง และหลังจาก 31 วัน.....	37
9	โครมาโตแกรมของสารสกัดจากคราบเลือด ซึ่งเก็บไว้ภายใต้แสงฟลูออเรสเซนซ์ที่ 37° C ในช่วงเวลาต่างๆ.....	40
10	ความสัมพันธ์ระหว่างอายุของคราบเลือดกับอัตราส่วนพื้นที่ฟลักของสายโซ่แอลฟาต่อพื้นที่ฟลักของฮีม จากโครมาโตแกรมของสารสกัดจากคราบเลือด..	40
11	ความสัมพันธ์ระหว่างอายุของคราบเลือดกับอัตราส่วนพื้นที่ฟลักของ X ต่อพื้นที่ฟลักของฮีมจากคราบเลือดที่เก็บไว้ภายใต้แสงฟลูออเรสเซนซ์(a,b) และในที่มีด(c,d) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่อุณหภูมิห้อง และที่ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 52 สัปดาห์.....	41
12	การแยกของสายโซ่โกลบิน (globin chain) ของกวาง จากสารตัวอย่างที่สกัดจากคราบเลือดบนกระดาษกรอง.....	44
13	เลือดของมนุษย์ปริมาณต่างๆ ที่ตรวจวัดด้วย fluorescence detector.....	45
14	เปรียบเทียบระหว่าง Supercosil และ Vydac large pore column	46
15	การปรากฏของฟลัก X ที่ตรวจวัดได้โดย HPLC วิเคราะห์ด้วย ระบบ A ที่ 220 nm	48

ภาพที่	หน้า
16 การเพิ่มขึ้นของอัตราส่วนระหว่างพีค X (ตรวจวัดที่ 220 nm) กับพีค heme (ตรวจวัดที่ 254 nm).....	49
17 ความสัมพันธ์ระหว่าง พีค X กับ heme-peak (254 nm) สำหรับคราบเลือดที่เก็บไว้ที่ 23°C และ 0°C เมื่อเพิ่มระยะเวลาในการเก็บเป็นเกือบ 1 ปี.....	50
18 การปรากฏของพีค X และ Y ตรวจวัดที่ 220nm	51
19 การปรากฏของพีค Z ตรวจวัดโดย HPLC ระบบ B ที่ 395 nm จากคราบเลือดบนผ้าที่ 37°C ที่ระยะเวลาต่างๆ.....	51
20 การเพิ่มขึ้นของพีค X/heme-peak ตามระยะเวลา ที่ตรวจวัด โดย ระบบ B จากคราบเลือดบนผ้าที่อุณหภูมิต่างๆ โดยตัวอย่างที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องที่ถูกบันทึกไว้เป็นคราบเลือดบนผ้า cotton (□) และบนกระดาษกรอง (Δ)	52
21 ความสัมพันธ์ระหว่างพีค Z (ตรวจวัดที่ 395 nm) กับ heme-peak (ตรวจวัดที่ 254 nm) ของคราบเลือดบนผ้าซึ่งเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่างๆ	53
22 อัตราส่วนพื้นที่พีคของพีค X ต่อ Y จากคราบเลือดบนผ้าที่เก็บไว้ที่สามอุณหภูมิระหว่าง 0°C และ 37°C	54
23 อัตราส่วน Z/Y (peak heights) วัดค่าจากสารสกัดจากคราบเลือดบนผ้าซึ่งเก็บไว้ที่ 37°C และที่อุณหภูมิห้อง.....	56
24 อัตราส่วน X/Y วัดค่าจากสารสกัดด้วยเมทานอลจากคราบเลือดบนผ้าซึ่งเก็บไว้ที่สามอุณหภูมิแตกต่างกัน.....	57
25 การเปลี่ยนแปลงของพีค β - และ α - globin ตรวจวัดที่ 220 nm โดย HPLC ระบบ B	58
26 โครมาโตแกรมของกระดาษกรองที่ปราศจากคราบเลือด.....	62
27 โครมาโตแกรมของคราบเลือดบนกระดาษกรอง (filter paper) จากอาสาสมัครเพศชายคนที่ 1(M1) อายุของคราบเลือด 1 วัน.....	63
28 โครมาโตแกรมของคราบเลือดบนผ้าโซลอน (solon) จากอาสาสมัครเพศชายคนที่ 1 (M1) อายุของคราบเลือด 1 วัน.....	63
29 โครมาโตแกรมของคราบเลือดบนผ้าเวสต์พอยท์ (westpoint) จากอาสาสมัครเพศชายคนที่ 1(M1) อายุของคราบเลือด 1 วัน.....	63

ภาพที่	หน้า
30	แสดงความสัมพันธ์ระหว่างอายุของคราบเลือด (days) กับค่าเฉลี่ยสัดส่วนของพื้นที่ที่ฟีก D ต่อพื้นที่ที่ฟีก C (average D/C) จากคราบเลือดบนกระดาษกรอง... 65
31	แสดงความสัมพันธ์ระหว่างอายุของคราบเลือด (days) กับค่าเฉลี่ยร้อยละของพื้นที่ที่ฟีก C (average %C) จากคราบเลือดบนกระดาษกรอง..... 66
32	แสดงความสัมพันธ์ระหว่างอายุของคราบเลือด (days) กับค่าเฉลี่ยร้อยละของพื้นที่ที่ฟีก D (average %D) จากคราบเลือดบนกระดาษกรอง..... 67
33	แสดงความสัมพันธ์ระหว่างอายุของคราบเลือด (days) กับค่าเฉลี่ยสัดส่วนของพื้นที่ที่ฟีก D ต่อพื้นที่ที่ฟีก C (average D/C) จากคราบเลือดบนผ้าไซลอน..... 68
34	แสดงความสัมพันธ์ระหว่างอายุของคราบเลือด (days) กับค่าเฉลี่ยร้อยละของพื้นที่ที่ฟีก C (average %C) จากคราบเลือดบนผ้าไซลอน..... 69
35	แสดงความสัมพันธ์ระหว่างอายุของคราบเลือด (days) กับค่าเฉลี่ยร้อยละของพื้นที่ที่ฟีก D (average %D) จากคราบเลือดบนผ้าไซลอน..... 70
36	แสดงความสัมพันธ์ระหว่างอายุของคราบเลือด (days) กับค่าเฉลี่ยสัดส่วนของพื้นที่ที่ฟีก D ต่อพื้นที่ที่ฟีก C (average D/C) จากคราบเลือดบนผ้าเวสต์พอยท์.. 71
37	แสดงความสัมพันธ์ระหว่างอายุของคราบเลือด (days) กับค่าเฉลี่ยร้อยละของพื้นที่ที่ฟีก C (average %C) จากคราบเลือดบนผ้าเวสต์พอยท์..... 72
38	แสดงความสัมพันธ์ระหว่างอายุของคราบเลือด (days) กับค่าเฉลี่ยร้อยละของพื้นที่ที่ฟีก D (average %D) จากคราบเลือดบนผ้าเวสต์พอยท์..... 73
39	แสดงโครมาโตแกรมจากสารสกัดคราบเลือดบนกระดาษกรอง (filter paper) Whatman เบอร์ 5 จากอาสาสมัครเพศชาย คนที่ 1 ในช่วงระยะเวลา 1 4 14 และ 21 วัน 82
40	แสดงโครมาโตแกรมจากสารสกัดคราบเลือดบนกระดาษกรอง (filter paper) Whatman เบอร์ 5 จากอาสาสมัครเพศชาย คนที่ 2 ในช่วงระยะเวลา 1 4 14 และ 21 วัน 83
41	แสดงโครมาโตแกรมจากสารสกัดคราบเลือดบนกระดาษกรอง (filter paper) Whatman เบอร์ 5 จากอาสาสมัครหญิง คนที่ 1 ในช่วงระยะเวลา 1 4 14 และ 21 วัน..... 84

ภาพที่	หน้า	
42	แสดงโครมาโตแกรมจากสารสกัดปราบเลือดบนกระดาษกรอง (filter paper) Whatman เบอร์ 5 จากอาสาสมัครเพศหญิง คนที่ 2 ในช่วงระยะเวลา 1 4 14 และ 21 วัน	85
43	แสดงโครมาโตแกรมจากสารสกัดปราบเลือดบนผ้าไซลอน (solon) จาก อาสาสมัครเพศชาย คนที่ 1 ในช่วงระยะเวลา 1 9 และ 13 วัน	87
44	แสดงโครมาโตแกรมจากสารสกัดปราบเลือดบนผ้าไซลอน (solon) จาก อาสาสมัครเพศชาย คนที่ 2 ในช่วงระยะเวลา 1 9 13 และ 20 วัน	88
45	แสดงโครมาโตแกรมจากสารสกัดปราบเลือดบนผ้าไซลอน (solon) จาก อาสาสมัครเพศหญิง คนที่ 1 ในช่วงระยะเวลา 1 9 13 และ 20 วัน	89
46	แสดงโครมาโตแกรมจากสารสกัดปราบเลือดบนผ้าไซลอน (solon) จาก อาสาสมัครเพศหญิง คนที่ 2 ในช่วงระยะเวลา 1 9 13 และ 20 วัน	90
47	แสดงโครมาโตแกรมจากสารสกัดปราบเลือดบนผ้าเวสต์พอยท์ (westpoint) จาก อาสาสมัครเพศชาย คนที่ 1 ในช่วงระยะเวลา 1 12 และ 15 วัน	92
48	แสดงโครมาโตแกรมจากสารสกัดปราบเลือดบนผ้าเวสต์พอยท์ (westpoint) จาก อาสาสมัครเพศหญิง คนที่ 1 ในช่วงระยะเวลา 1 8 12 และ 15 วัน	93
49	แสดงโครมาโตแกรมจากสารสกัดปราบเลือดบนผ้าเวสต์พอยท์ (westpoint) จาก อาสาสมัครเพศหญิง คนที่ 2 ในช่วงระยะเวลา 1 8 12 และ 15 วัน	94

บทที่ 1

บทนำ

1. ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ในการเกิดอาชญากรรม คดีต่างๆไม่ว่าจะเป็นการฆาตกรรม ชิงทรัพย์ ข่มขืน ทำร้ายร่างกาย มักจะพบหลักฐานบางอย่างของคนร้ายหลงเหลืออยู่ในที่เกิดเหตุ ทั้งหลักฐานทางกายภาพและชีวภาพ โลหิตเป็นพยานวัตถุชนิดหนึ่งทางชีวภาพที่มีความสำคัญมากและมักพบได้ในที่เกิดเหตุ โดยเฉพาะในอาชญากรรมที่มีความรุนแรง เช่น คดีฆาตกรรมที่ใช้อาวุธชนิดต่าง ๆ ทำร้ายร่างกายจนเกิดบาดแผลและมีโลหิตไหลออกมาจะมีปริมาณมากน้อยอย่างไรขึ้นอยู่กับความลึกหรือตำแหน่งของบาดแผลบนร่างกาย บาดแผลที่อยู่บริเวณทางเดินของเส้นโลหิตใหญ่ย่อมจะมีโลหิตไหลออกมามาก เลือดที่ไหลออกมาอาจจะเปื้อนอยู่ในที่ต่าง ๆ เช่นตามเสื้อผ้า พื้น ฝาผนัง ตามร่างกายของผู้เสียหาย หรือคนร้ายและอาวุธที่ใช้ทำร้าย เลือดที่ไหลออกมาเปื้อนอยู่ในที่ต่าง ๆ ดังกล่าวนั้น จะมีลักษณะเกาะแน่นเป็นหยดหรือคราบอยู่ ณ ที่นั้นเรียกว่า หยดเลือด หรือคราบเลือด ซึ่งหยดเลือดหรือคราบเลือดนี้นับว่าเป็นประโยชน์แก่การสืบสวนเป็นอย่างมาก เช่น

1. ช่วยให้ทราบถึงวิธีการกระทำผิดของคนร้าย
2. ช่วยให้ทราบถึงเส้นทางหลบหนีของคนร้าย
3. ช่วยในการตรวจพิสูจน์ยืนยันตัวบุคคล
4. ช่วยในการประมาณระยะเวลาของการเกิดเหตุ

จากที่ได้กล่าวมาข้างต้นจะเห็นได้ว่าเลือดเป็นวัตถุพยานที่มีความสำคัญเป็นอย่างยิ่ง ซึ่งสามารถใช้เป็นหลักฐานประกอบในการสืบสวนสอบสวนเกี่ยวกับพฤติกรรมที่เกิดขึ้นในคดีต่างๆ โดยที่คราบเลือดจะเป็นพยานวัตถุที่เป็นเครื่องมือช่วยในการสืบสวนสอบสวนและในการพิจารณาคดีได้เป็นอย่างดี เพราะคราบเลือดในสถานที่เกิดเหตุสามารถบ่งบอกได้ว่าอาชญากรรมนั้นเกิดขึ้นได้อย่างไร โดยทั่วไปสามารถใช้รูปร่างลักษณะของหยดเลือดในการพิจารณาในหลายๆด้าน เช่น ประมาณความเร็วในการกระเด็นของหยดเลือด มุมที่เลือดตกกระทบพื้น หรือระยะทางที่เลือดหยดลงมาได้ รูปร่างของหยดเลือด ตลอดจนรอยกระเด็นของเลือดสามารถใช้ประกอบพิจารณาเพื่อบอกทิศทางของหยดเลือดว่าเคลื่อนที่ไปทิศทางไหน ซึ่งจะช่วยให้บอกถึงที่มาของหยดเลือด

ว่ามาจากทิศทางใด อีกทั้งลักษณะคราบเลือดที่พบจะช่วยบ่งบอกได้ถึงพฤติกรรมที่ทำให้เกิดคราบเลือดขึ้น โดยลักษณะของคราบเลือดที่พบในการตรวจมีลักษณะสำคัญในการพิจารณา คือ

1. การกระจายของคราบเลือด
2. ตำแหน่งของคราบเลือด
3. ปริมาณของเลือด
4. ความสัมพันธ์กับวัตถุพยานแวดล้อมอื่น ๆ

การกระจายของคราบเลือดเป็นเครื่องช่วยบอกได้อย่างหนึ่ง ถ้าเป็นเลือดที่ออกจากเส้นเลือดแดงใหญ่จะกระจายออกไปได้ไกลกว่าที่ออกจากเส้นเลือดเล็ก และเลือดที่ออกจากเส้นเลือดดำจะหยดไม่กระจายมาก นอกจากนี้ยังช่วยบอกตำแหน่งของบาดแผลได้ เช่น ถ้าบาดแผลอยู่ในส่วนบนของร่างกาย การกระจายของคราบเลือดจะกว้างกว่าคราบเลือดจากเส้นเลือดในร่างกายส่วนล่างของร่างกาย เป็นต้น

ทางด้านนิติวิทยาศาสตร์ การตรวจสอบรอยเลือดจะเป็นตัวแทนที่แสดงให้เห็นความสัมพันธ์ของสิ่งที่เกิดขึ้นในระหว่างการสืบสวนสอบสวนในสถานที่เกิดเหตุ ซึ่งจากข้อมูลต่างๆ เกี่ยวกับเลือดที่เรพบในที่เกิดเหตุ เราสามารถนำมาเปรียบเทียบกับพยานหลักฐานต่าง ๆ ในที่เกิดเหตุรวมทั้งทำให้การของพยาน ผู้เสียหาย หรือผู้ต้องสงสัย โดยทั่วไปวัตถุพยานที่เป็นเลือดสามารถที่จะเชื่อมโยงผู้เคราะห์ร้ายกับสถานที่เกิดเหตุ เชื่อมโยงผู้ต้องสงสัยกับสถานที่เกิดเหตุ เชื่อมโยงผู้ต้องสงสัยกับผู้เคราะห์ร้าย นอกจากนั้นยังอาจช่วยในการคัดกรองผู้ต้องสงสัย แยกแยะผู้บริสุทธิ์ออกจากผู้กระทำผิด ซึ่งมีความสำคัญอย่างยิ่งโดยเฉพาะกรณีที่มีผู้ต้องสงสัยจำนวนมาก ดังนั้น ในการตรวจคราบเลือดจึงจำเป็นต้องได้ข้อมูลต่างๆ ที่เกี่ยวกับคราบเลือดเพื่อประกอบในการแปลผลไม่ว่าจะเป็นลักษณะการกระจาย ตำแหน่ง และปริมาณคราบเลือด ต้องนำมาเปรียบเทียบกับพยานหลักฐานต่างๆ ในที่เกิดเหตุ เพื่อจะใช้บ่งบอกพฤติกรรมที่คาดคะเนไว้ให้ใกล้เคียงกับความจริงมากที่สุด

การตรวจสอบคราบเลือดในงานด้านนิติวิทยาศาสตร์นั้น มีหลายวิธีที่เชื่อถือได้สำหรับการค้นหาและพิสูจน์เพื่อยืนยันว่าเป็นหยดเลือด เช่น ฟีนอล์ฟทาลีน (phenolphthalein) หรือ เตตระเมทิลเบนซิดีน (tetramethylbenzidine) โดยจะเกิดการเปลี่ยนสีเมื่อสัมผัสกับเปอร์ออกซิเดส (peroxidase) หรือฮีโมโกลบิน (hemoglobin) ในเลือด (Cox 1991:1503-1511) สำหรับการค้นหาร่องรอยของเลือดที่มีปริมาณเล็กน้อยนั้น การทดสอบโดยใช้ ลูมินอล (luminol) ได้ถูกนำมาใช้อย่างกว้างขวางในงานด้านนิติวิทยาศาสตร์ (Quickenden et al. 2001:251-253) นอกจากนี้ยังสามารถระบุเอกลักษณ์ของเลือดแต่ละบุคคลได้อย่างชัดเจนและแน่นอนโดยใช้เทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุล เช่น การตรวจ genetic fingerprint (Gill et al. 2002:366-385)

อย่างไรก็ตาม การประมาณอายุของคราบเลือดยังคงเป็นปัญหาในการปฏิบัติงานด้านนิติวิทยาศาสตร์ เป็นเวลามากกว่าร้อยปีมาแล้วที่นักนิติวิทยาศาสตร์ได้ร่วมกันหาวิธีเพื่อระบุอายุที่แท้จริงและถูกต้องแม่นยำของรอยเลือดที่แห้ง ตั้งแต่นั้นมาเริ่มมีการเสนอให้มีการหาคำตอบที่เป็นไปได้ของปัญหาสำคัญนี้ในระหว่างการตรวจสถานที่เกิดเหตุ มีการพยายามหาระยะเวลาในการละลายที่แตกต่างกันของคราบเลือดที่มีอายุต่างกัน (Schwarzacher 1930:119-124) แต่วิธีนี้ได้ค่าที่คลาดเคลื่อนจากความเป็นจริงมาก มีการทดสอบวิธีการใหม่ เช่น การวัดค่าอิเล็กตรอนสปินเรโซแนนซ์ (electron-spin-resonance) (Miki et al. 1987:149-158) ซึ่งสามารถตรวจอายุของเลือดซึ่งขึ้นกับการเพิ่มความเข้มสัญญาณ (signal intensity) ของ meth-hemoglobin non-hem-iron และ organic radicals ซึ่งวิธีนี้ได้ทำการทดลองแล้วพบว่ามีความผิดพลาดสูง เนื่องจากวิธีนี้แสดงให้เห็นว่าเป็นการประมาณอายุของคราบเลือดอย่างหยาบ แสดงผลได้ไม่ละเอียดเท่าที่ควรนักและไม่สามารถรองรับค่าใช้จ่ายที่สูงจากการใช้เทคนิคนี้

จากวิธีการทั้งหมดที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้นได้ผ่านการทดสอบและพบว่าไม่เหมาะสมในการนำมาประยุกต์ใช้กับงานทางด้านนิติวิทยาศาสตร์ เนื่องจากผลของการประมาณอายุของคราบเลือดจะเห็นได้ว่ามีความคลาดเคลื่อนสูงมากเมื่อเปรียบเทียบกับอายุจริงของเลือดซึ่งความพยายามที่จะทดลองหาวิธีต่างๆ เหล่านี้ต้องอาศัยเครื่องมือ อุปกรณ์ และเทคโนโลยีที่ก้าวหน้าทันสมัยอย่างมาก ด้วยเหตุนี้จึงไม่สามารถนำมาใช้ได้โดยตรงในสถานที่เกิดเหตุได้

วิธีทางโครมาโตกราฟีถูกนำมาใช้หาอายุของคราบเลือด โดยใช้โครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) หาปริมาณองค์ประกอบของสายโซ่โกลบิน (globin) ของฮีโมโกลบินในเม็ดเลือดแดง พบการลดลงของอัตราส่วนระหว่างสายโซ่แอลฟา (α -chain) กับ ฮีม (heme) เมื่อคราบเลือดมีอายุมากขึ้น (Inoue et al. 1991:127-131) ต่อมาได้รายงานการพบพีก (peak) ที่มีพื้นที่ (area) เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาเรียกว่า “X” ซึ่งไม่สามารถตรวจพบได้ในเลือดสด (Inoue et al. 1992:17-27) ซึ่งวิธีทางโครมาโตกราฟีที่กล่าวมาข้างต้นเป็นเพียงการศึกษาวิจัยขั้นต้นในหลอดทดลองเท่านั้น และหลังจากนั้น Andrasko J. ใช้ HPLC ศึกษาสารสามชนิด ที่เกิดขึ้นจากการเสื่อมสภาพของฮีโมโกลบิน เรียกว่า “X” “Y” และ “Z” โดยศึกษาที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส อุณหภูมิห้อง (22-23 องศาเซลเซียส) และที่ 37 องศาเซลเซียส พบว่าสามารถใช้บอกอายุของคราบเลือดบนผ้า (cotton) ได้เมื่อทราบอุณหภูมิที่คราบเลือดถูกเก็บไว้ (Andrasko 1997:601-607) อย่างไรก็ตามงานวิจัยดังกล่าวยังไม่มีการนำมาใช้ให้เกิดประโยชน์ในงานด้านนิติวิทยาศาสตร์ทั้งในและต่างประเทศ สำหรับประเทศไทยแล้วยังไม่มีการศึกษาวิจัยถึงวิธีการในการประมาณอายุของคราบเลือด ซึ่งเห็นว่าหากได้ทำการศึกษาวิจัยอย่างจริงจังน่าจะสามารถนำมาใช้ให้เกิดประโยชน์ในงานด้านนิติวิทยาศาสตร์ต่อไปได้

วิทยานิพนธ์นี้เป็นการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนของเลือดในระยะเวลาต่างๆ โดยวิธี HPLC โดยศึกษาการเปลี่ยนแปลงของปริมาณโปรตีนในคราบเลือด ในช่วงระยะเวลาต่างๆ หลังการหลังของเลือด

2. ความมุ่งหมายและวัตถุประสงค์ของการศึกษา

วิทยานิพนธ์นี้มีวัตถุประสงค์สำคัญเพื่อศึกษาวิธีการประมาณอายุของคราบเลือดโดยศึกษาการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนในคราบเลือด ในระยะเวลาต่างๆ กันหลังการหลัง โดยเทคนิคโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC)

3. สมมติฐานของการศึกษา

1. โปรตีนในคราบเลือดมีการเปลี่ยนแปลงตามระยะเวลา
2. การเปลี่ยนแปลงของโปรตีนในคราบเลือดใช้ในการประมาณอายุของคราบเลือดได้

4. ขอบเขตของการศึกษา

1. ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนในคราบเลือดบนกระดาษกรอง (filter paper) Whatman เบอร์ 5 จากอาสาสมัครที่มีสุขภาพดี 4 คน โดยเครื่อง HPLC ในช่วงระยะเวลาอายุของคราบเลือด 1 4 14 และ 21 วัน
2. ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนในคราบเลือดบนผ้าโซลอน (solon) จากอาสาสมัครที่มีสุขภาพดี 4 คน โดยเครื่อง HPLC ในช่วงระยะเวลาอายุของคราบเลือด 1 9 13 และ 20 วัน
3. ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนในคราบเลือดบนผ้าเวสต์พอยท์ (westpoint) จากอาสาสมัครที่มีสุขภาพดี 3 คน โดยเครื่อง HPLC ในช่วงระยะเวลาอายุของคราบเลือด 1 8 12 และ 15 วัน

5. ข้อจำกัดของการวิจัย

1. การวิจัยนี้ต้องการคราบเลือดที่มีคุณสมบัติเช่นเดียวกับคราบเลือดในสถานที่เกิดเหตุจากอาชญากรรมที่เกิดขึ้นจริง ดังนั้นในการเก็บตัวอย่างเลือดจึงไม่มีการใช้สารกันเลือดแข็ง
2. ในการวิเคราะห์ตัวอย่างแต่ละครั้งใช้เวลานาน ดังนั้นในแต่ละวันจึงไม่สามารถวิเคราะห์ตัวอย่างจำนวนมากได้
3. ในการวิเคราะห์ตัวอย่างแต่ละครั้งมีค่าใช้จ่ายค่อนข้างสูง

6. คำจำกัดความที่ใช้ในการศึกษา

Bloodstain	หมายถึง คราบเลือด
Filter paper	หมายถึง กระดาษกรอง
Solon	หมายถึง ผ้าโซลอน
Westpoint	หมายถึง ผ้าเวสต์พอยท์
D/C	หมายถึง อัตราส่วนระหว่างพื้นที่ฟีด D ต่อพื้นที่ฟีด C
%C	หมายถึง ค่าร้อยละของพื้นที่ฟีด C
%D	หมายถึง ค่าร้อยละของพื้นที่ฟีด D
average D/C	หมายถึง ค่าเฉลี่ยของอัตราส่วนระหว่างพื้นที่ฟีด D ต่อพื้นที่ฟีด C
average %C	หมายถึง ค่าเฉลี่ยร้อยละของพื้นที่ฟีด C
average %D	หมายถึง ค่าเฉลี่ยร้อยละของพื้นที่ฟีด D
days	หมายถึง อายุของคราบเลือดเป็นวัน
M1	หมายถึง คราบเลือดของอาสาสมัครเพศชายคนที่ 1
M2	หมายถึง คราบเลือดของอาสาสมัครเพศชายคนที่ 2
F1	หมายถึง คราบเลือดของอาสาสมัครเพศหญิงคนที่ 1
F2	หมายถึง คราบเลือดของอาสาสมัครเพศหญิงคนที่ 2

7. กรอบแนวคิดของการวิจัย

เลือดมีโปรตีนหลายชนิดเป็นองค์ประกอบ การที่เลือดหลังออกภายนอกร่างกาย โปรตีนเหล่านี้ย่อมเกิดการเปลี่ยนแปลง ซึ่งการเปลี่ยนแปลงนี้ย่อมขึ้นกับระยะเวลา ดังนั้นการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนในคราบเลือดย่อมนำไปสู่การประมาณอายุของคราบเลือดได้

8. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบถึงวิธีการในการประมาณอายุของคราบเลือดเพื่อเป็นประโยชน์ในการสืบสวนสอบสวนคดีอาชญากรรม
2. พัฒนางานด้านนิติวิทยาศาสตร์ของประเทศไทยในด้านการตรวจสอบคราบเลือด

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การวิเคราะห์เลือดรวมไปถึงการวัดขนาดของเซลล์เม็ดเลือดเป็นการทดสอบขั้นพื้นฐานของการทดสอบด้านโลหิตวิทยา เป็นสิ่งที่จำเป็นอย่างยิ่งในการตรวจสุขภาพ การตรวจวิเคราะห์โรค และการรักษาเยียวยา ในห้องปฏิบัติการต่างๆ ไปจะใช้ผลการตรวจเลือดเพื่อหาสาเหตุวินิจฉัยโรค และสังเกตการตอบสนองของร่างกายต่อโรค การทดลองบางครั้งจะวัดส่วนประกอบของเลือด และตรวจสอบสารปนเปื้อนในเลือดเพื่อระบุการทำงานที่ผิดปกติไปของอวัยวะต่างๆ (อรทัย ตั้งวรสิทธิชัย 2543 : 85)

ทางด้านนิติวิทยาศาสตร์ เลือดเป็นพยานวัตถุชนิดหนึ่งที่มีความสำคัญมากและมักพบอยู่ในสถานที่เกิดเหตุที่มีการก่ออาชญากรรมที่ใช้ความรุนแรง เลือดที่ไหลออกมาอาจจะเปราะเปื้อนอยู่ตามสถานที่ต่างๆ เช่น เสื้อผ้า พื้น ฝาผนัง ตามร่างกายของผู้เสียหายหรือคนร้าย และอาวุธที่ใช้ทำร้าย เลือดที่ไหลออกมาเปราะเปื้อนอยู่ตามที่แตกต่างกัน ดังกล่าวนั้น จะมีลักษณะเกาะแน่นเป็นหยดหรือคราบ เรียกว่า หยดเลือด หรือคราบเลือด ซึ่งหยดเลือดหรือคราบเลือดนั้นนับว่าเป็นประโยชน์แก่การสืบสวนเป็นอันมากคือ ช่วยให้ทราบถึงวิธีการกระทำผิดของคนร้าย ช่วยให้ทราบถึงเส้นทางการเคลื่อนที่ทั้งของผู้เคราะห์ร้ายและคนร้าย และ/หรือเส้นทางการหลบหนีของคนร้าย ช่วยในการตรวจพิสูจน์ยืนยันตัวบุคคลผู้กระทำความผิดในกรณีที่มีเลือดของผู้ต้องสงสัยอยู่ในสถานที่เกิดเหตุ และช่วยในการประมาณระยะเวลาของการเกิดเหตุที่ผ่านมาแล้ว ซึ่งการพิจารณาลักษณะของหยดเลือดหรือคราบเลือดประกอบกับสิ่งอื่นๆ อาจทราบได้ว่าผู้ผู้นั้นได้ถูกฆ่าตายตั้งแต่เมื่อใด โดยที่เลือดที่ไหลออกมาใหม่ๆ จะมีลักษณะเหลวและมีสีแดงเข้ม ต่อมาจะเป็นลักษณะเหลวตรงกลาง ส่วนตามขอบของเลือดจะค่อยๆ แห้ง และสีจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลแก่ ต่อจากนั้นจะค่อยๆ เปลี่ยนสภาพแห้งเป็นสะเก็ดสีน้ำตาลแก่หรือสีดำ (อรรถพล แซ่มสุวรรณวงศ์ และคณะ 2546 : 133-134)

การเชื่อมโยงกันระหว่างชีววัตถุกับการประกอบอาชญากรรม สำคัญอย่างยิ่งในการจำกัดจำนวนผู้ที่เกี่ยวข้องกับเหตุการณ์เหยื่อ และผู้ต้องสงสัย เช่น การค้นหาชีววัตถุจากตำแหน่งที่น่าสงสัยในบ้านหรือที่อื่นที่เกี่ยวข้องกับเหยื่อ ที่อยู่ในความคาดหมาย จะสามารถนำไปสู่ความจริงได้ เช่น การหาเลือดของเหยื่อในพยานะต้องสงสัย การที่ไม่รู้เกี่ยวกับช่วงเวลาชีววัตถุถูกทิ้งไว้นั้น เป็นไปไม่ได้ที่จะเชื่อมโยงระหว่างตัวอย่างทางชีววิทยากับการประกอบอาชญากรรม

ความสามารถในการประมาณอายุของคราบเลือดเป็นการใช้ความพยายามอย่างสูงในงานด้านนิติวิทยาศาสตร์ การระบุเอกลักษณ์บุคคลอาจทำได้โดยการตรวจพิสูจน์ DNA จากคราบเลือด แต่การประมาณอายุของคราบเลือดที่สัมพันธ์กับเวลาในการเกิดอาชญากรรมนั้นเป็นความปรารถนาอย่างยิ่ง หลายๆวิธีได้เคยถูกนำมาใช้ในการพยายามที่จะประมาณอายุของคราบเลือด วิธีการส่วนใหญ่อาศัยการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ hemoglobin ไปเป็นอนุพันธ์ของมัน และการดูร่วมกันระหว่างการเปลี่ยนแปลงของสีและความสามารถในการละลาย Fiori (1962) ได้รายงานวิธีการหาความสัมพันธ์กันระหว่างอายุของคราบเลือดกับการแพร่กระจายของ Cl^- รอบๆคราบ ซึ่งสามารถเกิดเป็นสารประกอบ $AgCl$ ในการเกิดปฏิกิริยา reduction ขอบสีดำจะเกิดขึ้นรอบๆคราบเลือดซึ่งมีอายุมากกว่าสองเดือน ขนาดของขอบนี้จะเพิ่มขึ้นจนกระทั่งเก้าเดือน ซึ่งเป็นสิ่งบ่งบอกในการประมาณอายุของตัวอย่าง วิธี enzyme assays ก็เคยถูกนำมาใช้โดยไม่ประสบความสำเร็จเท่าที่ควร โดยทั่วไปจะได้รายงานผลที่อายุของตัวอย่างน้อยหรือมากกว่าอายุที่แน่นอน (Inoue et al. 2002 : 127-132)

องค์ประกอบของเลือด

เลือดของคนเราแบ่งเป็น 4 หมู่ด้วยกัน คือ หมู่โอ หมู่เอ หมู่บี และหมู่เอบี เลือดมีหน้าที่ลำเลียงอาหาร น้ำ ออกซิเจน และสารอื่นๆ ไปยังอวัยวะต่างๆ ของร่างกาย นอกจากนั้นยังลำเลียงของเสีย เช่น คาร์บอนไดออกไซด์มายังปอด เพื่อขับออกจากร่างกาย (ทัศนัยณี จันทนียังยง 2539 : 207)

เลือดเป็นเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (connective tissue) ชนิดหนึ่งของร่างกาย มีคุณสมบัติพิเศษคือเป็นของเหลวแต่เมื่อออกมาจากร่างกายจะแข็งตัวได้เป็นลิ่ม (clot) ในเลือดมีกระบวนการทางชีวเคมีเกิดขึ้นหลายอย่าง มีสารชีวโมเลกุลหลายชนิดเป็นส่วนประกอบ ทำให้เลือดมีคุณสมบัติเฉพาะตัวและทำหน้าที่หลายประการให้แก่ร่างกาย เมื่อเราเจาะเลือดจากร่างกาย แล้วทิ้งไว้สักครู่เลือดจะแข็งตัวเรียกว่าลิ่ม (clot) ถ้าปล่อยให้มันแข็งตัวนานขึ้นลิ่มนี้จะหดตัวบีบเอาส่วนน้ำใสออกมาเรียกว่าซีรัม (serum) แต่ถ้าเลือดที่เจาะมาใหม่ๆ นั้นได้เติมสารกันเลือดแข็งไว้เลือดจะไม่เป็นลิ่มเมื่อนำไปปั่นแยก (centrifuge) จะมีส่วนน้ำใสสีเหลืองจางชั้นบน เรียกว่าพลาสมา (plasma) ส่วนล่างสีแดงเป็นส่วนของเม็ดเลือดแดงซึ่งส่วนบนสุดของชั้นนี้จะมีสีขาวบางๆ เป็นชั้นของเกล็ดเลือดและเม็ดเลือดขาว เรียกว่า buffy coat ซีรัมกับพลาสมาจึงต่างกันตรงที่พลาสมายังมีสารโปรตีนที่ทำให้เลือดแข็งตัวได้ละลายอยู่ด้วย แต่ละส่วนประกอบของเลือดจะมีหน้าที่หลักโดยคร่าวๆ ดังนี้

1. เม็ดเลือดแดง มีหน้าที่นำออกซิเจนจากปอดไปให้เนื้อเยื่อทั่วร่างกาย
2. เม็ดเลือดขาว มีหน้าที่ป้องกันและต่อสู้กับเชื้อโรคและสิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่ร่างกาย

3. เกิดเลือด มีหน้าที่ในการห้ามเลือดเมื่อมีเลือดออก

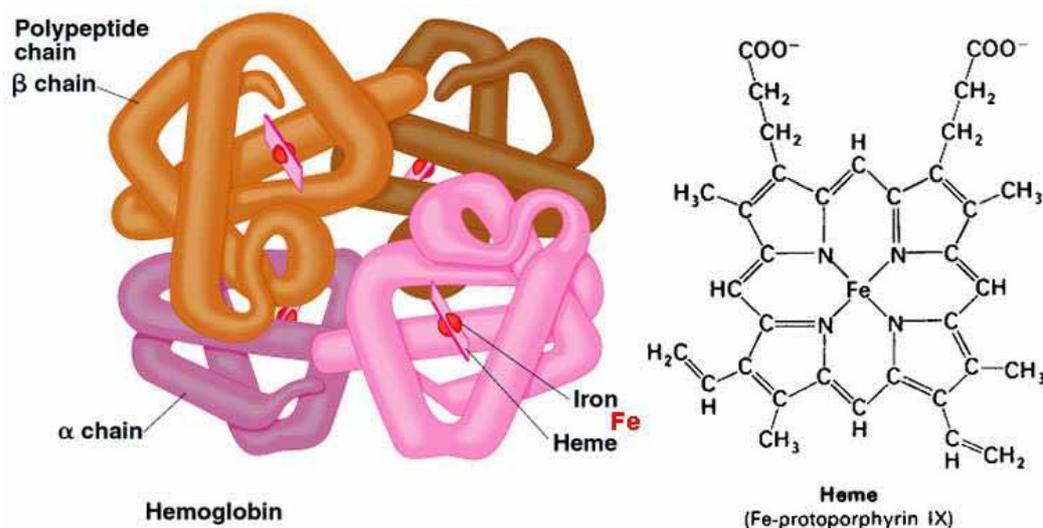
4. ส่วนน้ำในเลือด ได้แก่ พลาสมา หรือซีรัม จะมีสารชีวโมเลกุลทุกชนิด คือ คาร์โบไฮเดรต โปรตีน ลิพิด เกลือแร่ และน้ำ ทำหน้าที่หล่อเลี้ยงเซลล์ทั่วร่างกาย และทำให้ร่างกายอยู่ในภาวะสมดุลและยังนำของเสียที่เกิดจากเมตาบอลิซึมไปขับถ่ายออกทางไต ปอด ผิวหนัง และลำไส้ (ชาดา สืบหลินวงศ์ 2542 : 229)

เม็ดเลือดแดง (Red Blood Cell)

เม็ดเลือดแดงของคนเป็นเซลล์ที่ไม่มีนิวเคลียส มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 7-8 ไมโครเมตร รูปร่างเหมือนจานแต่ปุ่มตรงกลางทั้งสองข้าง มีอยู่ทั้งหมดประมาณร้อยละ 40-50 ของปริมาตรเลือดทั้งหมดของร่างกายหรือประมาณ 4 - 5 ล้านเซลล์ต่อเลือดหนึ่งมิลลิลิตร มีอายุในกระแสโลหิตได้นานประมาณ 120 วัน โดยทั่วไปในวันหนึ่ง ๆ มีการสร้างเม็ดเลือดออกมาใหม่ประมาณร้อยละ 9 ของจำนวนทั้งหมดที่มีอยู่ในร่างกาย โครงสร้างของเม็ดเลือดแดงประกอบด้วยสารลิโปโปรตีน (lipoprotein) และมีสารโปรตีนที่จับกับเหล็กที่เรียกว่า ฮีโมโกลบิน ซึ่งมีหน้าที่สำคัญในการจับนำเอาออกซิเจนจากปอดไปเลี้ยงเนื้อเยื่อ และอวัยวะต่างๆ ของร่างกายทางเส้นเลือดแดงและนำคาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่งเป็นของเสียจากเนื้อเยื่อและอวัยวะต่าง ๆ กลับไปยังปอดเพื่อถ่ายเทออกทิ้งไปทางเส้นเลือดดำ ในคนปกติ ผู้ชายจะมีฮีโมโกลบินประมาณ 14-18 กรัมในเลือด 100 มิลลิลิตร ผู้หญิงจะมีฮีโมโกลบินประมาณ 12-14 กรัมในเลือด 100 มิลลิลิตร หน้าที่สำคัญอีกประการหนึ่งของฮีโมโกลบิน คือ รักษาคุณภาพเป็นกรดด่างของเลือดให้อยู่ในเกณฑ์พอดี ร่างกายของเรามีเม็ดเลือดแดงอยู่เป็นจำนวนมาก กล่าวคือ ในร่างกายของคนที่เป็นผู้ใหญ่จะมีเม็ดเลือดแดงอยู่ถึง 25 ล้านล้านเซลล์ เม็ดเลือดแดงมีอายุอยู่ในกระแสโลหิต ได้นานประมาณ 120 วัน หลังจากนั้น ก็จะถูกทำลายไปในตับและม้าม เมื่อเม็ดเลือดแดงเก่าถูกทำลายไป ไชกระดูกก็จะสร้างเม็ดเลือดแดงใหม่ขึ้นมาแทนที่ เม็ดเลือดแดงมีสีแดง เพราะมีส่วนประกอบสำคัญคือ ฮีโมโกลบินสารนี้เป็นสารประกอบของโปรตีนกับเหล็ก ฮีโมโกลบินจะมีสีแดงสดเมื่อมีออกซิเจนอยู่ด้วย แต่จะเปลี่ยนสีเป็นแดงแกมม่วง เมื่อได้ปล่อยออกซิเจนให้แก่เซลล์ต่างๆ ของร่างกาย แล้วรับเอาคาร์บอนไดออกไซด์จากเนื้อเยื่อและอวัยวะ ต่างๆ กลับไปยังปอด การที่เลือดในเส้นเลือดแดงมีสีแดงสด แต่เลือดในเส้นเลือดดำมีสีแดงแกมม่วง ก็เพราะเหตุดังกล่าวข้างต้น หน้าที่สำคัญของเม็ดเลือดแดง ได้แก่การนำออกซิเจนจากปอดไปเลี้ยงเนื้อเยื่อและอวัยวะต่างๆ แล้วนำเอาคาร์บอนไดออกไซด์กลับไปยังปอด (ทัศนยานี จันทนยังยง 2539 : 216-217)

ฮีโมโกลบินเป็นโปรตีนสังยุค(conjugated protein) ที่มีฮีม(heme) เป็นหมู่พรอสเทติก (prosthetic group) และพอลิเพปไทด์ที่เรียกว่า โกลบิน(globin) ซึ่งประกอบด้วยหน่วยย่อยที่ไม่

เหมือนกันคือ แอลฟา(α) และเบตา(β) ในลักษณะของ tetramer ($\alpha_2\beta_2$) แต่ละหน่วยย่อย มีฮีโมอยู่ 1 หมู่ ซึ่งมีเหล็ก[Fe(II)] อยู่ตรงกลางจับอยู่กับพอร์ไฟริน(porphyrin) และส่วนของโปรตีน ด้วยพันธะโคออร์ดิเนต อะตอมของเหล็กนี้เองเป็นบริเวณที่จับกับออกซิเจน(O_2 -binding site) (สรรเสริญ ทรัพย์โตษก 2541 : 214)



ภาพที่ 1 แสดง โมเลกุลจำลองของฮีโมโกลบินและเหล็กจับอยู่กับฮีโม

ที่มา : [Hemoglobin](http://porpax.bio.miami.edu/~cmallery/150/chemistry/hemoglobin.jpg) [Online], accessed 1 October 2009. Available from <http://porpax.bio.miami.edu/~cmallery/150/chemistry/hemoglobin.jpg>

เม็ดเลือดขาว (White Blood Cell) (ชาดา สืบหลินวงศ์ 2539 : 236-237)

ในกระแสเลือดมีเม็ดเลือดขาวอยู่ประมาณ 5,000-10,000 เซลล์ในเลือดหนึ่งมิลลิเมตร เม็ดเลือดขาวมีขนาดใหญ่กว่าเม็ดเลือดแดงเกือบสองเท่าและมีนิวเคลียส สามารถจำแนกได้ 5 ชนิด ต่างๆ กันโดยอาศัยคุณลักษณะในการติดสีที่ไข้อม และลักษณะของนิวเคลียสเมื่อส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

1. Neutrophils มีนิวเคลียสหลายกระเปาะ (lobe) มีหน้าที่จับกินเชื้อโรค และกำจัดสิ่งแปลกปลอม ภายในมี granules ซึ่งบรรจุเอนไซม์
2. Lymphocytes เป็นเซลล์ขนาดเล็ก นิวเคลียสเกือบเต็มเซลล์ มีหน้าที่ทำลายสิ่งแปลกปลอม โดยวิธีสร้าง antibodies หรือสารชนิดอื่น
3. Eosinophils เป็นเซลล์ที่มี granules ติดสีแดง (เมื่อย้อมด้วย Wright's stain) ซึ่ง

ภายในมีเอนไซม์และสารเคมีที่ใช้ในการควบคุมการอักเสบ การแพ้ และการทำลายปรสิต (parasites)

4. Basophils เป็นเซลล์ที่มี granules ใหญ่ ติดสีน้ำเงิน (เมื่อย้อมด้วย Wright's stain) ซึ่งภายในบรรจุสารจำพวก histamine heparin และสารอื่นๆ ซึ่งมีผลทำให้เกิด อาการของการแพ้ เช่น เส้นเลือดขยายตัว อาการบวม

5. Monocytes เป็นเซลล์ขนาดใหญ่ นิวเคลียสก้อนเดียว หน้าที่ในกระแสเลือดยังไม่ทราบแน่ชัดแต่จะเคลื่อนที่เข้าไปในเนื้อเยื่อจับกินเชื้อโรคและสิ่งแปลกปลอม

เกล็ดเลือด (Platelet)

เกล็ดเลือด เชื่อว่ามีกำเนิดมาจากไซโตพลาสซึมของเมกาคาริโอไซท์ ซึ่งเป็นเซลล์ที่มีขนาดใหญ่ที่สุด อยู่ในไขกระดูกคือมีขนาดประมาณ 35-160 ไมโครเมตร ภายในไซโตพลาสซึมมีเม็ดแกรนูล นอกจากนั้นแล้ว ไซโตพลาสซึมยังมีขาเทียม (pseudopods) เล็ก ๆ ยื่นออกมาเป็นจำนวนมาก และต่อมากจะหลุดออกมาเป็นเกล็ดเลือด มีจำนวนประมาณ 150,000 - 450,000 เซลล์ ในจำนวนเลือดหนึ่งมิลลิลิตร เกล็ดเลือดมีชีวิตอยู่ในกระแสโลหิตได้นานประมาณ 8-11 วัน มีหน้าที่สำคัญเกี่ยวกับการห้ามเลือดโดยตรง นอกจากนั้นยังสามารถจับเชื้อโรคขนาดเล็กมาก เช่น ไวรัส ได้ด้วย เกล็ดเลือดจึงเป็นอีกส่วนหนึ่งของเลือดที่ช่วยต่อต้านเชื้อโรค (ทัศนยานี จันทนียงยง 2539 : 219)

เกล็ดเลือดมีหน้าที่สำคัญในการห้ามเลือด โดยจะรวมตัวเป็นก้อนแข็งอุดตรงบริเวณที่หลอดเลือดถูกตัดหรือฉีกขาด ทำให้เลือดหยุดไหล กลไกการทำงานของเกล็ดเลือดพอสรุปได้ดังนี้

1. เมื่อเส้นเลือดขาด เกล็ดเลือดจะเกาะกับเนื้อเยื่อของเส้นเลือดที่อยู่ใต้ผิวหนัง คือ Collagen
2. หลังจากเกาะแล้วเกล็ดเลือดจะปล่อยสารเคมีใน granules ออกมา ที่สำคัญคือ ADP (Adenosine diphosphate)
3. ADP จะทำให้เกล็ดเลือดที่อยู่ใกล้กันมาเกาะกลุ่มกัน (aggregate) เกิดเป็น hemostatic plug ต่อมาเมื่อเซลล์เกล็ดเลือดจะแตกออกทำให้ผนังด้านในพบกับเลือด ผนังด้านในนี้มี "Platelet factor 3" (PF 3) ซึ่งมีความสำคัญในปฏิกิริยาการแข็งตัวของเลือด (ชาดา สืบหลินวงศ์ 2542 : 237-238)

พลาสมา (Plasma) (ชานา สืบหลินวงศ์ 2542 : 240-241)

พลาสมาเป็นสารละลายที่มีตัวถูกละลายหลายชนิดคือ คาร์โบไฮเดรต โปรตีน ไขมัน กลีโกลิแร่หลายชนิด และสารโมเลกุลเล็กอื่นๆ ที่เป็น metabolites จากสารอาหารข้างต้น ส่วนประกอบที่มีจำนวนมากที่สุดคือ โปรตีน (plasma proteins) ในพลาสมามีโปรตีนเป็นส่วนประกอบหลายชนิดแต่ละชนิดมีหน้าที่ต่างกันออกไปพอสรุปได้ดังนี้

1. เป็นสารอาหาร ได้แก่กรดอะมิโนต่างๆ ที่ดูดซึมจากลำไส้ผ่านมาในเลือดและกระจายสู่อวัยวะต่างๆ ที่ต้องการใช้
2. ควบคุมปริมาณน้ำในส่วนต่างๆ ของร่างกายกับในเลือด น้ำจะอยู่ในเลือดหรือจะซึมออกนอกเส้นเลือดขึ้นกับความดันโลหิต (hydrostatic pressure) และความเข้มข้นของโปรตีนในเลือด
3. ขนส่งสารต่างๆ สารหลายชนิดจะไหลเวียนไปกับเลือดได้ แต่ถ้าสารนั้นละลายน้ำได้ไม่ดียังต้องเกาะกับโปรตีนในเลือดไป เช่น สเตอรอยด์ฮอร์โมนต่างๆ ลิปิด วิตามินที่ละลายในไขมัน อีออนของโลหะ และยาหลายชนิด
4. ทำให้เลือดแข็งตัวเกิดเป็นลิ่มได้ โปรตีนกลุ่มนี้คือ Coagulation factors หลายตัว
5. ป้องกันร่างกาย โปรตีนที่ทำหน้าที่นี้คือ โปรตีนภูมิคุ้มกัน (antibodies) ซึ่งทำงานร่วมกับเม็ดเลือดขาวในการต่อสู้กำจัดเชื้อโรค และยังทำงานร่วมกับกลุ่มโปรตีนที่เรียกว่า คอมพลีเมนต์ (complements)
6. เป็นบัฟเฟอร์ โปรตีนส่วนมากมีประจุเป็นลบที่ pH 7.4 ดังนั้นจึงเป็นส่วนสำคัญที่จะจับไอออน H^+ เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงปริมาณกรดในเลือด ทำให้รักษา pH ของเลือดไว้ได้
7. เป็นเอนไซม์ โปรตีนหลายชนิดในพลาสมาที่เป็นเอนไซม์สำหรับปฏิกิริยาต่างๆ

โปรตีนในพลาสมาส่วนใหญ่จะสร้างจากตับ บางชนิดเป็นโปรตีนอย่างง่าย แต่หลายชนิดเป็นโปรตีนเชิงซ้อนมีส่วนประกอบอื่นมาเกาะ เช่น คาร์โบไฮเดรต ลิปิด Fe^{2+} Cu^{2+} หรือ Zn^{2+} มาเกาะกลายเป็น glycoprotein lipoprotein และ metalloprotein ตามลำดับ โปรตีนในพลาสมาจะแยกได้เป็นสองชนิด คือ อัลบูมิน (Albumin) และ โกลบูลิน (Globulin) โดยอาศัยการตกตะกอนในสารละลายเกลือที่มีความเข้มข้นต่างกัน ถ้าแยกโดยอิเล็กโตรโฟรีซิส (electrophoresis) จะพบว่าในส่วนที่เป็น โกลบูลิน มีชนิดย่อยอีกมาก ในอิเล็กโตรโฟรีซิสนั้น อัลบูมิน จะวิ่งได้ไกลสุด โกลบูลินที่วิ่งได้ไกลรองลงมาให้ชื่อว่าเป็น α_1 α_2 β_1 β_2 และ γ ตามลำดับ

อัลบูมิน (albumin) เป็นโปรตีนที่มีจำนวนมากที่สุดคือประมาณ 2.5-4 g/100 ml น้ำหนักโมเลกุลประมาณ 66,000 ดาลตัน นับว่าเป็นโปรตีนขนาดเล็กจึงวิ่งได้ไกลในอิเล็กโตรโฟรีซิส

เนื่องจากมีเป็นจำนวนมากจึงเป็นโปรตีนสำคัญในการรักษาปริมาณน้ำในเลือด คือ มี colloid osmotic pressure สูง เป็นตัวนำสารต่างๆ ให้ไหลเวียนไปในเลือดได้ เช่น นำ bilirubin ไปที่ตับ นำ กรดไขมันไปยังเซลล์ไขมัน นำ urate Ca^{2+} Mg^{2+} ไปกำจัดที่ไตหรือไปยังอวัยวะที่ต้องการใช้ ยาหลายชนิดเมื่อเข้าสู่ร่างกายจะต้องเกาะอัลบูมินจึงจะไปทั่วร่างกายได้ เช่น sulfa penicillin ในผู้ที่มีอัลบูมินในเลือดต่ำกว่า 2 g/100 ml จะมีอาการบวมเพราะน้ำออกจากเส้นเลือดไปอยู่ในเนื้อเยื่อใต้ ผิวหนัง ในช่องท้อง ฯลฯ ซึ่งพบในโรคตับ โรคไต ชนิดที่เสียโปรตีนในปัสสาวะ

โกลบูลิน (Globulin) แบ่งเป็นโกลบูลินชนิดย่อยๆ อีกหลายชนิด โกลบูลินที่สำคัญได้แก่

1. อิมมูโนโกลบูลิน (Immunoglobulin) เป็นส่วนที่ทำหน้าที่เกี่ยวกับภูมิคุ้มกัน (immunity) คือเป็นภูมิคุ้มกันต่อเชื้อโรค เรียกโดยทั่วไปว่าแอนติบอดี (antibodies) ทำหน้าที่จับกับ เชื้อโรคในส่วนที่เป็นแอนติเจน (antigen) เมื่อจับกันแล้วจะเกิดเป็น Antigen-Antibody complex ซึ่ง จะถูกเม็ดเลือดขาวทำลายต่อไป หรือเป็นตัวกระตุ้นระบบคอมพลีเมนต์ (complements) ซึ่งมีการ กระตุ้นเป็นลูกโซ่ แล้วทำให้เกิดการแตกสลายของเซลล์ที่ complex นั้นเกาะอยู่

2. คอมพลีเมนต์โปรตีน เป็นกลุ่มของโกลบูลิน มี 11 complements คือ C_{1q} C_{1r} C_{1s} C_2 C_3 C_4 C_5 C_6 C_7 C_8 C_9 ระบบคอมพลีเมนต์นี้มีบทบาทสำคัญในระบบภูมิคุ้มกัน และยัง สามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ถึงพยาธิสภาพของโรคได้ด้วย

3. ไฟบริโนเจน (Fibrinogen) เป็นโกลบูลิน ทำหน้าที่เป็น coagulation factor (factor I)

4. ลิโปโปรตีน (Lipoproteins) มีหน้าที่ขนส่งลิปิด

5. ซีรัมเอนไซม์ (Serum enzymes) เอนไซม์ที่พบในเลือดและซีรัม เช่น LDH CPK SGOT SGPT และอื่นๆ มักพบได้ในปริมาณที่ค่อนข้างน้อย ยังไม่ทราบหน้าที่แน่ชัด เอนไซม์กลุ่ม ที่ทำหน้าที่เกี่ยวกับการแข็งตัวของเลือด (coagulation enzymes) ถือเป็นเอนไซม์เฉพาะของเลือดและ พลาสมา โดยที่ปริมาณหรือระดับของเอนไซม์ในเลือดคนปกติจะมีค่อนข้างต่ำ

ระบบบัฟเฟอร์ในเลือด (Buffer system of the blood) (ธาดา สืบหลินวงศ์ 2542 : 245-246)

เลือดมี pH ประมาณ 7.4 อยู่เกือบตลอดเวลา เพื่อให้เซลล์ต่างๆ ทำงานได้อย่างเหมาะสม ทั้งนี้เพราะระบบบัฟเฟอร์คอยปรับความเป็นกรดและด่างของเลือดอยู่ตลอดเวลา ในเลือดมีระบบ บัฟเฟอร์หลายระบบทำงานร่วมกันดังนี้

1. ไบคาร์บอเนต บัฟเฟอร์ (Bicarbonate buffer) ประกอบด้วย H_2CO_3 และ HCO_3^- เป็นระบบบัฟเฟอร์ที่สำคัญที่สุดของร่างกาย

2. ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ (Phosphate buffer) ประกอบด้วย HPO_4^{2-} และ H_2PO_4^- ใน อัตราส่วน 4:1 พบทั้งในพลาสมาและเม็ดเลือดแดง

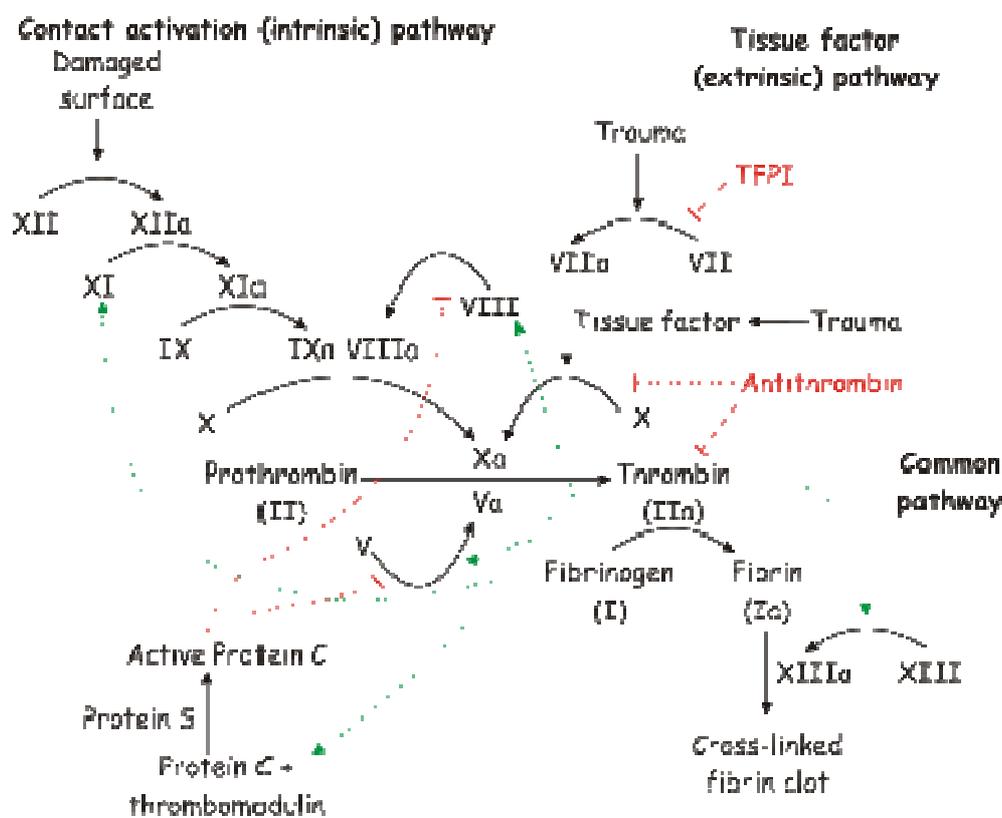
3. โปรตีน บัฟเฟอร์ (Protein buffer) โปรตีนเป็นสารที่มีประจุที่ pH 7.4 ถ้ามี H⁺ เพิ่มขึ้น โปรตีนเหล่านี้จะจับ H⁺ ไว้ ทำให้ pH ของเลือดไม่เปลี่ยนแปลง ประจุลบของโปรตีนเกิดจากหมู่ COO⁻ บน side chains ของกรดอะมิโน ฮีโมโกลบินเป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่เป็นบัฟเฟอร์ที่สำคัญภายในเม็ดเลือดแดง

การแข็งตัวของเลือด (Blood Clotting) (ธาดา สืบหลินวงศ์ 2542 : 237-239)

การแข็งตัวของเลือดเป็นกระบวนการที่ช่วยป้องกันการสูญเสียเลือดจากร่างกาย เกิดขึ้นได้ต้องอาศัย 2 ปัจจัย คือ เกล็ดเลือด และกลุ่มของโปรตีนในพลาสมา กระบวนการนี้เริ่มขึ้นเมื่อเส้นเลือดฉีกขาด ทำให้สารเคมีในเลือดกับสารในผนังเส้นเลือดพบกัน เกิดการกระตุ้นให้กลุ่มโปรตีนสำหรับการแข็งตัวในเลือดทำงาน โปรตีนที่สำคัญตัวหนึ่ง คือ ไฟบริโนเจน (fibrinogen) ซึ่งปกติจะละลายอยู่ในพลาสมา เมื่อถูกกระตุ้นจะเปลี่ยนเป็นไฟбрิน (fibrin) ซึ่งเป็นเส้นและไม่ละลายน้ำ เส้นไฟบรินเหล่านี้จะสานกันเป็นตาข่าย ดักจับเกล็ดเลือดและเม็ดเลือดทำให้เลือดไหลออกช้าลง จนหยุดในที่สุด เป็นการปิดปากแผล

โปรตีนในเลือดที่เกี่ยวข้องกับการแข็งตัวของเลือดมีอยู่มากกว่า 10 ชนิด เรียก Coagulation Factors แต่ละชนิดมีชื่อเรียกสั้นๆ เช่น Factor I Factor II Factor III จนถึง Factor XIII แฟคเตอร์ (Factor) ต่างๆ เหล่านี้ส่วนใหญ่สร้างขึ้นที่ตับ แล้วปล่อยเข้าสู่กระแสเลือด สำหรับการสังเคราะห์ Factor II, VII, IX และ X ต้องอาศัยวิตามินเคด้วย ดังนั้น คนที่ขาดวิตามินเคก็จะขาดปัจจัยเหล่านี้ จึงมีภาวะเลือดออกไม่หยุดได้ แต่ละปัจจัยเมื่อถูกกระตุ้น (activation) แล้วจะมีสภาพเป็น active enzyme เขียนย่อว่า a ต่อท้าย เช่น factor X จะเป็น Xa การแข็งตัวของเลือดเกิดขึ้นจากการกระตุ้นปัจจัยเหล่านี้ซึ่งเป็นปฏิกิริยาต่อเนื่องกันเป็นทอดๆ และหลายปฏิกิริยาจำเป็นต้องใช้ Ca²⁺ ขั้นตอนการแข็งตัวของเลือด (Coagulation Pathway) สามารถแบ่งออกได้เป็น 3 ขั้นตอน คือ

1. Intrinsic pathway มีการกระตุ้น Factor XII XI IX VIII
2. Extrinsic pathway มีการกระตุ้น Factor VII โดย Factor III
3. Common pathway เป็นทางร่วมของ intrinsic และ extrinsic pathway โดยเริ่มที่ Factor X ถูกกระตุ้นเป็น Xa หลังจากนั้นจึงร่วมกับ Factor V Platelet factor 3(PF3) และ Ca²⁺ กระตุ้น prothombin (Factor II) ให้เปลี่ยนเป็น Thombin (IIa) จากนั้น Thombin จะกระตุ้น Fibrinogen เกิดเป็น Fibrin monomer ซึ่งไม่ละลายน้ำ Fibrin monomer เหล่านี้จะเกาะกันเองเป็น Fibrin polymer คือเป็นสายยาวและสานไปมาดักจับเกล็ดเลือด เม็ดเลือดแดง และเม็ดเลือดขาวที่วิ่งผ่านทำให้เกิดเป็นก้อนอุดบริเวณที่เลือดออกค้างแสดงในแผนภูมิ



ภาพที่ 2 แผนภูมิการเกิดปฏิกิริยาต่อเนื่องของกระบวนการแข็งตัวของเลือด

ที่มา : [Coagulation](http://en.wikipedia.org/wiki/Coagulation) [Online]. accessed 1 October 2009. Available from <http://en.wikipedia.org/wiki/Coagulation>

การเก็บพยานวัตถุ

อรรถพล แซ่มสุวรรณวงศ์ (2546 : 131-136) ได้กล่าวถึงหลักปฏิบัติในการเก็บรวบรวมพยานวัตถุไว้ว่า ขณะทำการตรวจค้นหาพยานหลักฐาน เมื่อพบสิ่งใดที่ใช้เป็นพยานวัตถุได้ ผู้เก็บมีหลักการที่ควรยึดปฏิบัติเป็นลำดับดังนี้

1. บันทึกตำแหน่งและสภาพของพยานวัตถุ

เมื่อตรวจพบสิ่งใดระหว่างการตรวจสถานที่เกิดเหตุ ก่อนจะจับต้องหรือหยิบขึ้นมาต้องมีกรบันทึกตำแหน่งและสภาพของพยานวัตถุนั้นให้เรียบร้อยเสียก่อน

2. ถ่ายภาพพยานวัตถุที่ตรวจพบไว้

พยานวัตถุทุกชิ้นจะต้องทำการถ่ายภาพไว้ก่อนทำการเก็บและควรถ่ายภาพทั้งในระยะไกลและใกล้ การถ่ายภาพระยะไกลเพื่อยืนยันตำแหน่งที่พบ และแสดงความสัมพันธ์ของพยานวัตถุนั้นกับสภาพโดยรอบ ส่วนการถ่ายในระยะใกล้เพื่อให้เห็นพยานวัตถุจริงที่จะทำการเก็บ

ซึ่งการถ่ายภาพระยะใกล้ควรมีมาตรวัดระยะกำกับทุกครั้งเพื่อจะได้ทราบขนาดที่แน่นอนของวัตถุจากภาพถ่าย

3. ทำคำหนังสือลักษณะ

ทำคำหนังสือลักษณะลงบนพยานวัตถุที่ตรวจพบหรือบนภาชนะที่ใช้บรรจุ เพื่อเป็นหลักฐานว่าเป็นสิ่งที่ตรวจพบในคดีใด เมื่อใด โดยผู้ใด การทำคำหนังสือควรทำที่พยานวัตถุทุกชิ้นและทำในตำแหน่งที่จะไม่กระทบกระเทือนต่อการตรวจพิสูจน์

4. เก็บรวบรวม

เป็นขั้นตอนสุดท้ายของการปฏิบัติต่อพยานวัตถุเพื่อนำไปดำเนินการทางคดีต่อไป ขั้นตอนนี้มีความสำคัญเพราะหากบกพร่องอาจทำให้เกิดการสูญหายหรือการแปรสภาพของพยานวัตถุที่จะตามมาได้หากผู้เก็บรวบรวมทำไม่ถูกหลักวิธี ในการเก็บพยานวัตถุจะต้องเก็บพยานวัตถุที่สูญหายหรือเสียหายได้ง่ายเป็นอันดับแรก ในกรณีที่มีพยานวัตถุหลายชิ้นต้องแยกบรรจุไม่นำมาเก็บไว้ในที่เดียวกันเพราะอาจทำให้เกิดการสับสนและพยานวัตถุบางชนิดอาจเสียหายไป

วิธีการเก็บเลือด

1. เลือดเปียก

1.1 ปริมาณมากหรือเป็นกองเลือด

1.1.1 ใช้ที่หยอดตา (eyedropper) หรือหลอดฉีดยาดูดเก็บของเหลวใส่ไว้ในภาชนะบรรจุที่ผ่านการฆ่าเชื้อโรค (sterile) ปริมาณที่ใช้สำหรับการตรวจพิสูจน์ประมาณ 5 มิลลิลิตร

1.1.2 รีบน้ำส่งตรวจพิสูจน์ทันทีทันใด ถ้าไม่สามารถทำได้ให้แช่ไว้ในตู้เย็น หรือถุงน้ำแข็งแต่ห้ามนำไปแช่แข็งโดยเด็ดขาด

1.1.3 ในบางประเทศศาลอาญานุญาตให้ใช้สารเคมี เช่น โซเดียมอะไซด์ ใส่ลงไปเพื่อป้องกันเลือดเสียได้

1.2 ปริมาณน้อย

1.2.1 ใช้สำลีชนิด 100 เปอร์เซนต์ หรือผ้ากอซ กระดาษซับ ผ้าขาวสะอาด กระดาษเยื่อ ใดๆอย่างหนึ่ง ซับเก็บขึ้นมา

1.2.2 นำไปฝังลมให้แห้ง ห้ามผึ่งแดด เพื่อป้องกันไม่ให้โลหิตเสียหรือเสื่อมสภาพ

1.2.3 เก็บในหลอดทดลองหรือภาชนะอื่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อโรคแล้ว

2. กราบเลือด (แห้ง)

2.1 บนผิววัสดุไม่ดูดซึม

2.1.1 ถ้ามีปริมาณของเลือดแห้งไม่เพียงพอ ให้ใช้ใบมีดโกนที่สะอาดขูดออกจากผิวของวัสดุ กรณีที่ไม่สามารถใช้วิธีการขูดได้ ให้ใช้กระดาษซับ กระดาษเยื่อ สำลี ผ้ากอซ ใดๆอย่างหนึ่งที่สะอาด ขนาดพอสมควร ชุบน้ำเกลือ (น้ำเกลือผสม ร้อยละ 0.9) หรือน้ำกลั่นปิดตรงกราบเลือดจนกระทั่งเลือดซึมซับออกมาที่กระดาษ (สังเกตจากสี) และนำกระดาษผึ่งลมให้แห้ง วิธีนี้ต้องนำของกลางตัวอย่าง (Control Sample) ส่งไปตรวจพิสูจน์พร้อมกับของกลางปัญหาด้วย

2.1.2 เก็บไว้ในภาชนะที่ผ่านการฆ่าเชื้อโรค

2.2 บนพื้นผิววัสดุดูดซึม เช่น ไม้ที่เคลือบผิว สิ่งของที่ทําจากเส้นใย

2.2.1 นำวัสดุที่มีกราบเลือดส่งตรวจพิสูจน์ทั้งชิ้น เช่น เสื้อผ้า ท่อนไม้ที่สงสัยว่าคนร้ายใช้ตีผู้ตาย

2.2.2 ให้แยกบรรจุหีบห่อ เช่น เสื้อผ้าผู้ตาย ต้องไม่เก็บรวมกับเสื้อผ้าผู้ต้องสงสัย และเก็บไว้ในภาชนะที่ผ่านการฆ่าเชื้อโรค ถ้าวัตถุนั้นมีขนาดใหญ่เกินไปไม่สะดวกในการนำส่งตรวจพิสูจน์ทั้งชิ้นให้แยกหรือถอดหรือตัดเฉพาะส่วนที่มีกราบเลือดติดอยู่ปริมาณเพียงพอ นำส่งตรวจพิสูจน์

อุปกรณ์เก็บเลือด เช่น ใบมีดโกน มีด สำลี ใช้ได้สำหรับรอยเลือดเดียวเท่านั้น เมื่อจะทำการเก็บรอยเลือดใหม่ก็ต้องเปลี่ยน เพื่อป้องกันการปนเปื้อน นอกจากนี้ควรระมัดระวังอย่าจับต้องอุปกรณ์ตรงบริเวณที่จะสัมผัสกับเลือดของกลาง เนื่องจากสารจากร่างกายอาจปนเปื้อนกับเลือดของกลางที่ทำการเก็บ

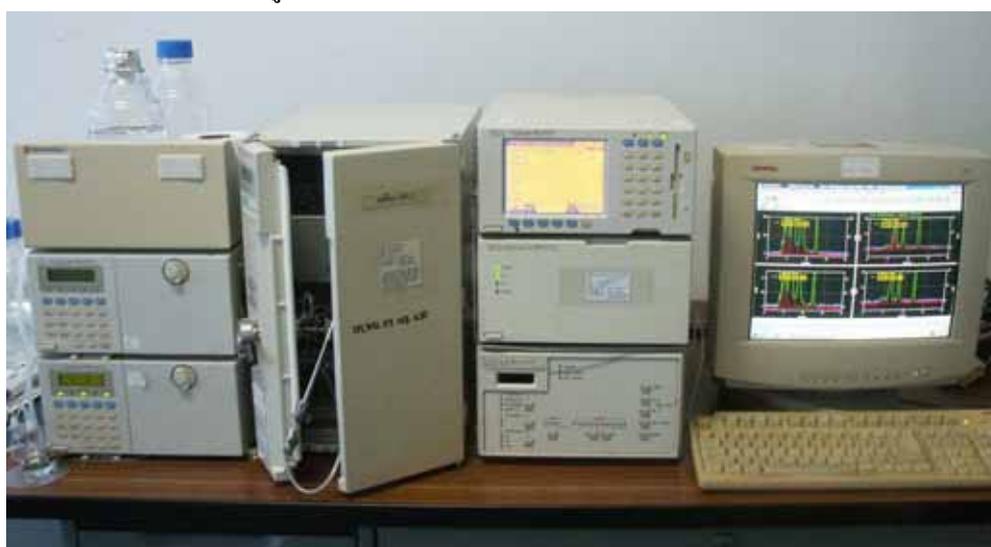
โครมาโตกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC)

โครมาโตกราฟีเป็นเทคนิคที่ใช้แยกและวิเคราะห์สารให้บริสุทธิ์ก่อนนำไปวิเคราะห์เชิงคุณภาพหรือเชิงปริมาณเพื่อกำจัดสารที่ปนเปื้อนมากับสารละลายตัวอย่าง ปัจจุบันเทคนิคนี้มีความนิยมใช้กันอย่างแพร่หลายในสาขาต่างๆ เช่น เคมี ชีวเคมี การเกษตร เกษตรกรรม การแพทย์ วิศวกรรมเคมี เทคโนโลยีชีวภาพ

โครมาโตกราฟีเป็นคำที่เรียกกันมาตั้งแต่ปลายคริสต์ศตวรรษที่ 19 โครมาโตกราฟีเป็นคำที่มาจากภาษากรีกสองคำ คือ chromatō แปลว่าสี และ graphy แปลว่าเขียนหรือบันทึก โดย ไมเคิล ทวิตต์ (Michael Tswett) นักพฤกษศาสตร์ชาวรัสเซีย เป็นคนแรกที่ใช้เทคนิคทำการศึกษาทางฟิสิกส์และเคมีของคลอโรฟิลล์ โดยใช้สารดูดซับ (absorbent) บรรจุลงในคอลัมน์ แล้วใช้ตัวทำละลายอินทรีย์เป็นตัวชะ สารคลอโรฟิลล์จะถูกแยกออกเป็นแถบๆ (band) ซึ่งแถบแต่ละแถบมีสี

ต่างๆ กัน ปัจจุบันโครมาโตกราฟีได้พัฒนาไปอย่างรวดเร็ว และสามารถใช้แยกสารผสมทั้งที่มีสี และไม่มีสีออกจากกัน ไมเคิล ชวิตซ์ ได้ให้คำจำกัดความของโครมาโตกราฟีว่า เป็นการแยกองค์ประกอบของผสมบนสารดูดซับที่บรรจุอยู่ในคอลัมน์ซึ่งอยู่ในระบบที่มีการเคลื่อนที่ ส่วน International Union of Pure and Applied Chemistry ได้ให้คำจำกัดความของโครมาโตกราฟีว่า โครมาโตกราฟีเป็นวิธีการขั้นแรกที่ใช้แยกองค์ประกอบของตัวอย่าง โดยอาศัยการกระจายตัวระหว่างสองวัฏภาค (phase) วัฏภาคแรกเป็นวัฏภาคนิ่ง (stationary phase) ซึ่งอาจเป็นของแข็งหรือของเหลวที่เคลือบบนของแข็งหรือเจล (gel) ที่บรรจุอยู่ในคอลัมน์ หรือกระจายตัวเป็นชั้นบางๆ หรือกระจายตัวเป็นฟิล์ม ส่วนอีกวัฏภาคเป็นวัฏภาคไหล (mobile phase) ซึ่งอาจเป็นก๊าซหรือของเหลว

โครมาโตกราฟีสามารถจำแนกได้ตามพื้นฐานของการแยกหรืออาศัยลักษณะปรากฏทางกายภาพ การจำแนกตามพื้นฐานของการแยกได้แก่ แอดซอร์บชันโครมาโตกราฟี-นอร์มอลเฟส โครมาโตกราฟี (absorption chromatography-normal phase chromatography) รีเวอร์สเฟสโครมาโตกราฟี (revers-phase chromatography) อีออนแพร์โครมาโตกราฟี (ion-pair chromatography) อีออนเอ็กซ์เชนจ์โครมาโตกราฟี (ion exchange chromatography) และโครมาโตกราฟีแบบอื่นๆ ส่วนการแยกโดยอาศัยลักษณะปรากฏทางกายภาพ ได้แก่ โครมาโตกราฟีแบบคอลัมน์ (column chromatography, CC) โครมาโตกราฟีแบบกระดาษ (paper chromatography, PC) โครมาโตกราฟีแบบเยื่อบาง (thin layer chromatography, TLC) โครมาโตกราฟีแบบก๊าซ (gas chromatography, GC) และโครมาโตกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง (high performance liquid chromatography, HPLC) เป็นต้น (พัฒนา เหล่าไพบูลย์ 2547 : 1-2)



ภาพที่ 3 เครื่องโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC)

โครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง หรือ HPLC ใช้แยกสารเคมีภายใต้ความดันของของเหลว เป็นเทคนิคการวิเคราะห์สารเชิงคุณภาพวิเคราะห์ (qualitative analysis) และปริมาณวิเคราะห์ (quantitative analysis) ที่นิยมใช้มากวิธีหนึ่ง โดยสามารถใช้กับงานด้านต่าง ๆ อย่างกว้างขวาง เช่นในการวิเคราะห์ทางอาหาร ยา ยาม่าแมลง ทางด้านการแพทย์ สมุนไพร และทางด้านสิ่งแวดล้อม เป็นต้น สามารถตรวจวิเคราะห์ปริมาณต่ำๆได้ในระดับไมโครกรัม (μg) ถึงพิโคกรัม (pg) เมื่อเลือกใช้เครื่องตรวจวัดที่เหมาะสม

HPLC เป็นเทคนิคแยกสารผสมแบบใช้เครื่องสูบแรงดันสูง (high pressure pump) สูบตัวทำละลายซึ่งทำหน้าที่เป็นเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) พาสารตัวอย่างที่ถูกฉีดเข้าทางช่องฉีดสาร (injector) ผ่านอนุภาคที่เป็นเฟสอยู่กับที่ (stationary phase) ซึ่งบรรจุอยู่ในคอลัมน์ (column) สารผสมตัวอย่างจะเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์และถูกแยกออกมา ผ่านเข้าสู่เครื่องตรวจวัด (detector) ในเวลาที่ต่างกัน สัญญาณที่วัดได้จะอยู่ในรูปสัญญาณไฟฟ้าตามเวลาและปริมาณของสารแต่ละตัวที่ตรวจวัดได้ จากนั้นสัญญาณจะถูกส่งไปยังเครื่องบันทึกสัญญาณ เพื่อแสดงผลออกมาเป็นโครมาโตแกรม (chromatogram)

โครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง เป็นการแยกสารโดยใช้คอลัมน์โครมาโตกราฟี (Column chromatography) และใช้สารละลายที่เหมาะสมเป็นเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) ซึ่งอาศัยเครื่องสูบ (pump) ทำหน้าที่สูบให้ตัวทำละลายเคลื่อนที่เข้าไปในคอลัมน์ (column) ที่บรรจุเฟสคงที่ (stationary phase) ตัวทำละลายจะไปแยกสารผสมออกจากกัน ซึ่งสารต่างชนิดกันจะมีความสามารถในการละลายในตัวทำละลายต่างกัน จากนั้นทำการตรวจวัดหาปริมาณสารที่ต้องการ

หลักการแยกสาร

ของเหลวความดันสูงจะสร้างแรงพา (impelling force) ดันสารต่างๆ ในสารตัวอย่างผ่านไปบนตัวกลางที่ไม่เคลื่อนที่ หรือเคลื่อนที่ได้เล็กน้อยซึ่งเรียกว่า เฟสคงที่ (stationary phase) ซึ่งเฟสคงที่จะสร้างแรงหน่วง (retention force) ต่อสารชนิดต่างๆ ซึ่งแตกต่างกันขึ้นอยู่กับขนาด รูปร่าง ประจุ ความจำเพาะ (specificity) การดูดซับ (adsorption) การละลาย (solubility) ดังนั้น ความแตกต่างกันของแรงหน่วงจึงทำให้โมเลกุลของสารแต่ละชนิดเคลื่อนที่ออกมาจากคอลัมน์ซึ่งบรรจุเฟสคงที่ในเวลาหน่วง (retention time) ที่ต่างกัน

ชนิดของโครมาโตกราฟีของเหลว

โครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงแบบคอลัมน์สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ตามชนิดของเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) และเฟสคงที่ (stationary phase) ดังนี้

1. ของเหลว-ของแข็ง โครมาโตกราฟี (liquid-solid chromatography) ใช้ของเหลวเป็นเฟสเคลื่อนที่และใช้ของแข็งเป็นเฟสคงที่ ซึ่งแบ่งย่อยออกเป็น 4 ชนิด คือ

1.1. เจลฟิльтраชันโครมาโตกราฟี (gel filtration chromatography) ใช้เฟสคงที่เป็นเม็ดเจลที่มีรูขนาดต่างๆ บรรจุในคอลัมน์ ทำให้โมเลกุลของสารที่มีขนาดเล็กเคลื่อนที่เข้าไปในโมเลกุลของเจล เป็นผลให้เคลื่อนที่ออกมาจากคอลัมน์ได้ช้ากว่าสารตัวอย่างที่มีโมเลกุลใหญ่กว่า

1.2. โครมาโตกราฟีแลกเปลี่ยนไอออน (ion exchange chromatography) เป็นการใช้เฟสหนึ่งที่มีประจุแลกเปลี่ยน (counter ion) เมื่อเกิดการแลกเปลี่ยนประจุกับโมเลกุลของสารตัวอย่างที่มีประจุ โมเลกุลของสารตัวอย่างนั้นจะถูกจับไว้ในคอลัมน์ หลังจากนั้นจึงเปลี่ยนคุณสมบัติของของเหลวซึ่งเป็นเฟสเคลื่อนที่ เช่น การเปลี่ยนพีเอช การเพิ่มปริมาณไอออนแลกเปลี่ยน จะทำให้โมเลกุลของสารตัวอย่างเคลื่อนที่ออกมาจากคอลัมน์ในอัตราเร็วที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับจำนวนประจุ และความแรงของประจุที่จับกับเฟสเคลื่อนที่

1.3. แอฟฟินิตีโครมาโตกราฟี (affinity chromatography) แยกสารออกจากกันโดยอาศัยความแตกต่างของความจำเพาะทางชีวภาพ (biological specificity) โดยการสร้างเฟสคงที่ที่มีความจำเพาะกับสารที่ต้องการแยก เช่น เอมไซม์กับซับสเตรท แอนติเจนกับแอนติบอดี เมื่อเฟสเคลื่อนที่พาโมเลกุลของสารที่ต้องการแยกผ่านมา เฟสคงที่จะจับเฉพาะโมเลกุลที่มีความจำเพาะไว้ หลังจากนั้นจึงเปลี่ยนคุณสมบัติของเฟสเคลื่อนที่ เช่น เพิ่มความเข้มข้นของเกลือ หรือเติมตัวแย่งจับเฟสคงที่ลงไป ซึ่งจะทำให้โมเลกุลของสารที่ต้องการถูกขับออกมาจากคอลัมน์

1.4. โครมาโตกราฟีแบบดูดซับ (adsorption chromatography) เป็นการแยกสารโดยใช้เฟสคงที่ที่เป็นตัวดูดซับ (adsorbent) ที่ไม่ทำปฏิกิริยากับสารตัวอย่าง และไม่ละลายในเฟสเคลื่อนที่ เช่น แป้ง เซลลูโลส และซิลิกาเจล ซึ่งการดูดซับอาศัยความมีสภาพขั้ว (polarity) และจำนวนหมู่ที่ทำให้เกิดสภาพมีขั้ว (polarity group) ของเฟสคงที่และสารตัวอย่าง ส่วนการไล่สารต่างๆ ออกจากคอลัมน์อาศัยการเปลี่ยนสภาพมีขั้วของเฟสเคลื่อนที่ กล่าวคือถ้าเฟสเคลื่อนที่มีสภาพมีขั้วสูง สารที่ละลายน้ำได้ดีกว่าจะเคลื่อนที่ออกมาจากคอลัมน์ได้เร็วกว่า

2. ของเหลว-ของเหลว โครมาโตกราฟี (liquid-liquid chromatography) หรือพาดิชันโครมาโตกราฟี (partition chromatography) เป็นวิธีการแยกสารที่ใช้ของเหลวเป็นเฟสเคลื่อนที่และใช้ของเหลวที่เคลือบอยู่บนของแข็งเป็นเฟสคงที่ ซึ่งสามารถเคลื่อนที่ได้อย่างช้าๆ แยกสารออกจากกันโดยอาศัยความแตกต่างในการละลายของสารตัวอย่างในของเหลวซึ่งเป็นเฟสคงที่ และ

ของเหลวซึ่งเป็นเฟสเคลื่อนที่ นิยมใช้สำหรับแยกสารที่มีคุณสมบัติใกล้เคียงกันออกจากกัน เช่น การแยกกรดอะมิโนชนิดต่างๆ ออกจากกัน

สำหรับของแข็งที่ใช้เป็นตัวค้ำจุน (supporter) นิยมใช้ซิลิกาเจลแต่อาจใช้ แป้ง เซลลูโลส หรือ อลูมินา แทนได้ ส่วนเฟสคงที่ที่เคลือบบนของแข็งอาจเป็นน้ำ บัฟเฟอร์ กรดแก่ ด่างแก่ แอลกอฮอล์ หรือไนโตรมีเทน ฯลฯ

โดยปกติจะใช้เฟสคงที่มีสภาพมีขั้วสูงเพื่อแยกสารที่มีสภาพขั้วสูงออกจากกันและใช้เฟสเคลื่อนที่ที่มีสภาพขั้วต่ำกว่ามาไล่สารต่างๆ ออกจากคอลัมน์ โดยสารที่มีสภาพขั้วสูงกว่าจะออกมาทีหลัง เรียกวิธีนี้ว่า โครมาโตกราฟีแบบปกติ (normal phase chromatography) แต่ในบางกรณีจะใช้เฟสคงที่มีสภาพขั้วต่ำ เช่น สารอินทรีย์ประเภท n-alkyl ซึ่งมีคาร์บอน 8 หรือ 18 อะตอม เพื่อแยกสารที่มีสภาพขั้วต่ำออกจากกัน และใช้เฟสเคลื่อนที่ที่มีสภาพมีขั้วสูงกว่ามาไล่สารที่ต้องการออกมาจากคอลัมน์ โดยสารที่มีสภาพขั้วต่ำกว่าจะออกมาช้ากว่า เรียกว่า โครมาโตกราฟีแบบผันกลับ (reversed phase chromatography)

นอกจากนี้โครมาโตกราฟีทั้งสองชนิดยังอาจใช้วิธีเติมสารที่มีประจุตรงข้ามลงในเฟสเคลื่อนที่ เช่น เติมเตตระเมทิลแอมโมเนียมคลอไรด์ลงในเฟสเคลื่อนที่เมื่อสารตัวอย่างมีประจุบวก หรือเติมกรดเปอร์คลอริกลงในเฟสเคลื่อนที่เมื่อสารตัวอย่างมีประจุลบ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการแยกสาร เรียกวิธีนี้ว่า ion-pair chromatography สำหรับกลไกที่ทำให้สามารถแยกสารได้ดีขึ้น เกิดจากการที่ไอออนที่มีประจุต่างกันรวมกันกลายเป็นสารที่ไม่มีประจุหรือมีประจุลดลง แล้วเคลื่อนตัวเข้าสู่เฟสคงที่หรือเฟสเคลื่อนที่ที่มีสภาพขั้วต่ำทำให้สารตัวอย่างเคลื่อนที่ได้ช้าลง

เครื่องมือโครมาโตกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง (พัฒนา เหล่าไพบูลย์ 2547:33-69)

เครื่องมือโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ประกอบด้วยส่วนสำคัญดังนี้

1. วัฏภาคไหล (mobile phase)
2. ปั๊ม (pump)
3. อินเจคเตอร์ (injector) หรือตำแหน่งฉีดสารตัวอย่าง
4. คอลัมน์ (column)
5. เตาอบ (oven) หรือเครื่องควบคุมอุณหภูมิ (temperature controller)
6. ตัวตรวจวัด (detector)
7. เครื่องประมวลผล (integrator)

วัฏภาคไหล (mobile phase)

วัฏภาคไหล หรือตัวชะ (eluent) หรือตัวทำละลาย (solvent) มีหน้าที่ช่วยในการแยกสารละลาย วัฏภาคไหลที่ดีต้องมีอัตราส่วนผสมของสารที่ใช้เป็นวัฏภาคไหลคงที่ ไม่มีตะกอน และไม่มีฟองอากาศละลายอยู่ในตัววัฏภาคไหล ซึ่งสิ่งเหล่านี้มีผลกระทบต่อการทำงานของหัวฉีด ดังนั้น วัฏภาคไหลจะต้องถูกกรองผ่านกรอง (membrane filter) ขนาด 0.45 ไมครอนทุกครั้งก่อนใช้งาน เพื่อกำจัดตะกอน มิฉะนั้นจะทำให้เกิดการอุดตันในระบบได้ ซึ่งมีผลทำให้ความดันสูงผิดปกติ และเป็นอันตรายต่อคอลัมน์ (พัฒนา เหล่า ไพบูลย์ 2547:34)

สารละลายที่ใช้เป็นวัฏภาคไหล มีความจำเพาะแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของสารที่ต้องการแยกแต่ควรมีคุณสมบัติพื้นฐานที่เหมือนกัน คือ มีความบริสุทธิ์สูงปราศจากสิ่งเจือปนและไม่ทำปฏิกิริยากับเฟสคงที่ คอลัมน์ ตัวฉีด ตัวตรวจวัด และสารที่ต้องการแยกจนทำให้สารที่ต้องการแยกเสื่อมสภาพไป นอกจากนี้ยังต้องการคำนึงถึงความหนืดและความปลอดภัยของสารละลายด้วยการใช้สารละลายไล่สารต่างๆ ออกจากคอลัมน์ อาจพบได้ใน 2 ลักษณะ คือ

1. ไอโซเครติก อีลูชัน (isocratic elution) เป็นการใส่สารละลายเพียงชนิดเดียวที่มีความเข้มข้นคงที่ ไล่สารต่างๆ ออกจากคอลัมน์
2. เกรเดียนท์ อีลูชัน (gradient elution) เป็นการใส่สารละลายมากกว่า 1 ชนิดหรือสารละลายชนิดเดียว แต่มีความเข้มข้นต่างๆ กัน ไล่สาร ออกจากคอลัมน์ ซึ่งพบว่ามักมีประสิทธิภาพในการแยกสารต่างๆ ออกจากกันได้ดีกว่า (วัชร ชาติกิตติคุณวงศ์ 2544 : 188)

ปั๊ม (Pump)

ปั๊มที่ใช้ในระบบนี้ต้องทำจากวัสดุที่ทนต่อสารเคมีและการกัดกร่อนได้ดี โดยปกติปั๊มมักทำจากเหล็กกล้าไร้สนิม โดยทั่วไปแรงดันสูงสุดที่ปั๊มทำงานได้อยู่ที่ 5,000 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว (psi) ปั๊มต้องปราศจากการเต้น (pulse-free) หรือมีพัลซเดมเปอร์ (pulse damper) ติดอยู่กับตัวปั๊ม เพื่อให้การไหลของวัฏภาคไหลสม่ำเสมอตลอดเวลาการวิเคราะห์และไม่ส่งผลให้เกิดสัญญาณรบกวน (nois) ต่อตัวตรวจวัด อัตราการไหลของวัฏภาคไหลที่ปั๊มสามารถควบคุมได้มีค่าตั้งแต่ 0.01 ถึง 10.0 มิลลิลิตรต่อนาที สำหรับใช้ในงานวิเคราะห์ หรืออาจสูงถึง 100 มิลลิลิตรต่อนาที สำหรับใช้ในการเตรียมตัวอย่าง ถ้าตัวปั๊มสามารถควบคุมการไหลของวัฏภาคไหลเพียงชนิดเดียวเรียกว่าไอโซเครติกปั๊ม (isocratic pump) ในขณะที่ถ้าตัวปั๊มสามารถควบคุมการไหลของวัฏภาคไหลได้ครั้งละมากกว่า 1 ชนิด เรียกว่าเกรเดียนท์ปั๊ม (gradient pump)



ภาพที่ 4 ปั๊ม (Pump) HPLC

อินเจคเตอร์ (injector)

การนำสารละลายตัวอย่างเข้าที่ตำแหน่งคอลัมน์เป็นสิ่งสมควรพิจารณาเป็นพิเศษ เนื่องจากการนำสารละลายตัวอย่างเข้าที่ตำแหน่งคอลัมน์อย่างไม่ถูกวิธี จะเป็นสาเหตุทำให้สารละลายตัวอย่างเกิดการกระจายตัวที่ตำแหน่งอินเจคเตอร์ และส่งผลให้เกิดการกระจายตัวของแถบ (band-broadening) และสูญเสียอำนาจการแยก (resolution) ในโครมาโตแกรมได้ อินเจคเตอร์มีอยู่ 2 แบบคือ แบบคอลัมน์อินเจคชัน (on-column injection) และแบบอินเจคชันวาล์ว (injection valves)

คอลัมน์ (column)

คอลัมน์เป็นหัวใจสำคัญของโครมาโตกราฟี คอลัมน์แต่ละชนิดมีความสามารถในการแยกสารชนิดต่างๆ ออกจากกันได้ แต่ไม่มีคอลัมน์ใดคอลัมน์หนึ่งที่สามารถแยกสารทุกชนิดได้ในเวลาเดียวกันดังนั้นการแยกสารละลายตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ให้ได้ผลออกมาดีหรือไม่ขึ้นอยู่กับวัสดุที่บรรจุในคอลัมน์และวิธีการบรรจุ (พัฒนา เหล่าไพบูลย์ 2547 : 74-75)



ภาพที่ 5 คอลัมน์ (column) HPLC

วัสดุที่บรรจุในคอลัมน์นั้น มีทั้งชนิด รูปร่าง ขนาด และมีรูพรุน ต่างๆ กัน ผิวหน้าของอนุภาคสามารถปรับเปลี่ยนได้โดยวิธีทางเคมีหรือกายภาพ เพื่อให้สามารถที่จะใช้กับรูปแบบต่างๆ ของโครมาโตกราฟีได้ ซิลิกาเจล (silica gel) จะเป็นเฟสอยู่กับที่หลักสำหรับ adsorption chromatography นอกจากนี้ยังมีโลหะออกไซด์อื่นๆ เช่น alumina , zirconium ตัวดูดซับที่เป็นพอลิเมอร์ เช่น styrene divinyl benzene โดยมาจะใช้เป็นตัวรองรับสำหรับ bonded phases

ซิลิกาได้รับความนิยมมากเพราะสามารถทนต่อแรงดันได้สูงเมื่อใช้ในคอลัมน์ขนาด 10-30 cm ที่บรรจุด้วยอนุภาคขนาด 3-10 μm สามารถหาได้ง่ายและมีราคาไม่แพง และมีให้ในลักษณะที่ขนาด รูปร่างและสภาพรูพรุนต่างๆ ข้อเสียคือความไม่เสถียรของซิลิกาที่อุณหภูมิสูง หรือต่ำเกินไป

สารที่บรรจุในคอลัมน์โดยทั่วไปสามารถแบ่งได้เป็น

1. Macro Porous

โดยปกติจะมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางอยู่ในช่วง 50-60 μm ใช้มากในระดับสเกลการเตรียมสารเนื่องจากมีความจุสูง ราคาถูก และบรรจุง่าย แต่จะมีประสิทธิภาพต่ำมาก

2. Pellicular Column

ประกอบด้วยเม็ดแก้วเคลือบด้วยชั้นบางๆ ของเฟสอยู่กับที่ มีประสิทธิภาพมากและง่ายต่อการบรรจุ (ซึ่งถูกนำมาใช้อย่างมากใน guard column) แต่มีความจุต่ำและราคาแพง

3. Microparticle Packings

สารบรรจุที่ใช้โดยทั่วๆ ไปในเทคนิคโครมาโตกราฟีสมัยใหม่ ขนาดของอนุภาคจะอยู่ในช่วง 3-5 และ 10 μm เส้นผ่านศูนย์กลางที่มีขนาดเล็กลง ประสิทธิภาพจะสูงขึ้น ทำให้แยกองค์ประกอบได้มากขึ้นต่อหน่วยเวลา แต่มีความจุต่ำ สารบรรจุประเภทนี้ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 5-10 μm จะถูกนำมาใช้มากสำหรับงานวิเคราะห์ที่มีสมรรถนะสูง (วัชร ชาติกิตติคุณวงศ์ 2544 : 197-198)

เตาอบ (oven) (พัฒนา เหล่าไพบูลย์ 2547 : 57-58)

เตาอบ หรือ เครื่องควบคุมอุณหภูมิ มีหน้าที่ในการควบคุมอุณหภูมิของคอลัมน์ ซึ่งการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิมิผลต่อเวลาชะของสารละลายตัวอย่าง โดยเฉพาะเมื่อใช้แยกสารละลายตัวอย่างแบบอไอออนเอ็กซ์เชงโครมาโตกราฟี (ion exchange chromatography) และรีเวอร์สเฟสโครมาโตกราฟี (revers-phase chromatography) ในบางกรณีการเพิ่มอุณหภูมิขึ้น 6 องศาเซลเซียสสามารถทำให้เวลาชะลดลงถึงร้อยละ 30

เครื่องควบคุมอุณหภูมิที่ใช้มีอยู่ 2 ประเภท คือ เตาอบแบบให้ความร้อนด้วยอากาศ (forced air ovens) และเตาอบแบบหุ้มคอลัมน์ (column jackets)

เตาอบแบบให้ความร้อนด้วยอากาศ (forced air ovens)

เตาอบลักษณะนี้ควบคุมอุณหภูมิโดยวงจรถวลีเทอร์มิสแตร์ซึ่งสามารถควบคุมอุณหภูมิได้ตั้งแต่อุณหภูมิห้องถึง 150 องศาเซลเซียส อย่างไรก็ตามการควบคุมอุณหภูมิของคอลัมน์ในช่วงอุณหภูมิสูงๆ ไม่ค่อยมีความจำเป็นในระบบโครมาโตกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง โดยทั่วไปสามารถควบคุมอุณหภูมิในช่วงอุณหภูมิห้องถึง 90 องศาเซลเซียส

เตาอบแบบหุ้มคอลัมน์ (column jackets)

เตาอบแบบหุ้มคอลัมน์เป็นเตาอบที่ทำจากแก้วหรือเหล็กกล้าไร้สนิมหุ้มคอลัมน์ไว้ ความร้อนจากอ่างน้ำร้อน (water bath) จะส่งผ่านตามท่อเข้าสู่เตาอบแบบหุ้มคอลัมน์

ปัจจุบันผู้ผลิตเครื่องควบคุมอุณหภูมิของคอลัมน์บางบริษัท ได้ผลิตเครื่องควบคุมอุณหภูมิโดยให้วัฏภาคไหล ไหลผ่านกล่องให้ความร้อน (heating box) ที่มีการควบคุมอุณหภูมิให้คงที่ตลอดการวิเคราะห์แทนการควบคุมอุณหภูมิที่ตัวคอลัมน์ ดังนั้นขณะทำการวิเคราะห์ การเปิดกล่องเพื่อตรวจสอบคอลัมน์เพียงระยะเวลาสั้นๆ จะไม่มีผลกระทบต่อโครมาโตแกรมที่ได้

ตัวตรวจวัด (detector) (พัฒนา เหล่าไฟบูลย์ 2547 : 58-69)

โดยทั่วไปตัวตรวจวัดที่ดีควรมีคุณสมบัติในการตอบสนองเร็ว มีความไวในการตรวจวัดสูง มีความจำเพาะเจาะจงกับสารที่ตรวจวัด มีการตอบสนองที่เหมือนกันเมื่อวัดสารชนิดเดียวกันในแต่ละครั้ง มีการตอบสนองที่เป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณสารนั้นๆ การตอบสนองไม่ควรขึ้นกับชนิดของวัฏภาคไหลที่ใช้ หรือผลจากอุณหภูมิ หรืออัตราเร็วของการไหลของวัฏภาคไหล ไม่ทำลายตัวทำละลายและไม่ทำให้เกิดการกระจายตัวของแถบ นอกจากนี้ตัวตรวจวัดต้องมีความสะดวกในการใช้งานและราคาไม่แพงนัก

ตัวตรวจวัดที่ใช้ส่วนใหญ่เน้นที่การพัฒนาในเรื่องความไว (sensitivity) และระบบตรวจวัดแบบออนไลน์ (on-line) ในโครมาโตกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูงบ่อยครั้งที่คุณสมบัติทางกายภาพของสารละลายตัวอย่างและวัฏภาคไหลมีความคล้ายคลึงกันมาก คุณสมบัติดังกล่าวนี้นำไปสู่การพัฒนาตัวตรวจวัดที่อาศัยพื้นฐาน 2 แบบ คือ

1. การวัดความแตกต่างของคุณสมบัติทั่วไประหว่างสารละลายตัวอย่างและวัฏภาคไหล เรียกว่า ตัวตรวจวัดคุณสมบัติส่วนใหญ่ (bulk property) ได้แก่ มาตรฐานหักเห (refractive index detector) ตัวตรวจวัดวิสโคเมตริก (viscometric detector) และตัวตรวจวัดคอนดักทีวิตี (conductivity detector) เป็นต้น

2. การวัดคุณสมบัติที่จำเพาะ (specific) ต่อสารละลายตัวอย่างทั้งที่มีและไม่มีการนำเอาวัฏภาคไหลออกก่อนตรวจวัด เรียกว่า ตัวตรวจวัดคุณสมบัติตัวถูกละลาย (solute property detector) ได้แก่ ตัวตรวจวัดยูวี (UV detector) ตัวตรวจวัดเปลวไอออไนเซชัน (flame ionization detector, FID) และตัวตรวจวัดอิเล็กตรอนแคปเจอร์ (electron capture detector, ECD) เป็นต้น

ตัวตรวจวัดมาตรฐานหักเห (refractive index detector)

มาตรฐานหักเห หรือ ตัวตรวจวัดอาร์ไอ (RI detector) เป็นตัวตรวจวัดที่มีทั้งระบบอยู่กับที่ (static system) และระบบไหลผ่านโพลเซลล์ (flow-through cells) ลักษณะของมาตรฐานหักเห นั้นลำแสงจะส่องกระทบกับโพลเซลล์ (flow cell) ที่เป็นรูปสามเหลี่ยมสองอันเข้าคู่กัน ลำแสงดังกล่าวจะถูกสะท้อนกลับผ่านเซลล์ โดยมีกระจกวางอยู่ด้านหลังเซลล์อ้างอิง (reference cell) ซึ่งมีวัฏภาคไหลอยู่ภายในเซลล์ ส่วนอีกเซลล์หนึ่งเป็นเซลล์วิเคราะห์ (analytical cell) ซึ่งมีวัฏภาคไหลของสารละลายตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ออกจากคอลัมน์ เมื่อทั้งเซลล์อ้างอิงและเซลล์วิเคราะห์มีวัฏภาคไหลอยู่ภายในเซลล์ การเปลี่ยนทิศทางของแสงที่เกิดขึ้นในแต่ละเซลล์มีค่าเท่ากัน ดังนั้นระบบอยู่ที่มีการมองเห็นเป็นศูนย์ (optical zero) การปรากฏของสารตัวอย่างที่ถูกชะออกจากคอลัมน์ผ่านเซลล์วิเคราะห์จะเป็นสาเหตุที่ทำให้ลำแสงเบี่ยงเบนเมื่อผ่านเซลล์วิเคราะห์ และเป็นสาเหตุที่ทำให้

ให้ลำแสงเบี่ยงเบนจากการมองเห็นที่เป็นศูนย์ ลำแสงดังกล่าวจะถูกส่งสัญญาณออกมาโดยผ่านเครื่องบันทึกผลหรือเครื่องประมวลผล

ตัวตรวจวัดยูวี (UV detector)

ตัวตรวจวัดยูวีเป็นตัวตรวจวัดที่นิยมใช้มากที่สุดในโครมาโตกราฟีแบบของเหลวแรงดันสูง ตัวตรวจวัดนี้สามารถใช้กับสารละลายตัวอย่างที่มีคุณสมบัติดูดกลืนแสงได้ในช่วง 190 ถึง 900 นาโนเมตร สารละลายตัวอย่างต่อไปนี้สามารถใช้กับการตรวจวัดยูวีได้ เช่น โอลีฟิน (olefins) อะโรมาติก (aromatics) และสารประกอบที่ประกอบด้วย $C = O$, $C = S$, $-N = O$ และ $-N = N-$ ตัวตรวจวัดนี้มีแหล่งให้พลังงานรังสีคือ หลอดไอปรอทความดันต่ำ (low pressure mercury vapour lamp) ซึ่งมีแถบแสง (spectrum) ที่เด่นที่ 254 นาโนเมตร ส่วนแถบแสงอื่นๆ จะต้องมีตัวกรองเพื่อให้ได้แสงเอกรงค์ (monochromatic light) ก่อน การใช้แหล่งให้พลังงานรังสีที่เป็นไอปรอทความดันปานกลางและใช้ตัวกรองที่เหมาะสม สามารถใช้วัดสารละลายตัวอย่างได้ที่มีความยาวคลื่น 254 280 313 334 และ 365 นาโนเมตร

ปกติปริมาตรของโพลเซลล์ในตัวตรวจวัดยูวีมีขนาด 8 ไมโครลิตร มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 มิลลิเมตร และยาว 10 มิลลิเมตร ตัวตรวจวัดยูวีบางรุ่นสามารถหาคิวภาคไหลและสแกน (scan) หาความยาวคลื่นที่เหมาะสมของตัวถูกละลายในการตรวจวัดตัวถูกละลายนั้นๆ ได้ นอกจากนี้ตัวตรวจวัดชนิดนี้บางรุ่นสามารถวัดการดูดกลืนแสงของสารละลายตัวอย่างได้ทีเดียวสองความยาวคลื่น ตัวตรวจวัดแบบนี้เหมาะสำหรับวัดปริมาณสารตัวอย่างที่ประกอบด้วยองค์ประกอบที่สามารถดูดกลืนแสงได้ที่มีความยาวคลื่นต่างกัน

ตัวตรวจวัดวิสโคเมตริก (Viscometric detector)

ตัวตรวจวัดวิสโคเมตริกเป็นตัวตรวจวัดที่อาศัยหลักการวัดความหนืด ตัวตรวจวัดชนิดนี้นิยมใช้ในการวัดสารโพลิเมอร์ (polymer material) ตัวตรวจวัดวิสโคเมตริกเป็นตัวตรวจวัดที่ไวต่อการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิ และมีขีดจำกัดในการตรวจวัดเช่นเดียวกับมาตรดัชนีหักเห ปัจจุบันตัวตรวจวัดชนิดนี้มีใช้น้อยในระบบโครมาโตกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง

ตัวตรวจวัดคอนดักทิวิตี (Conductivity detector)

ความสามารถในการนำไฟฟ้าของสารละลาย ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของไอออนที่มีอยู่ในสารละลายนั้น ดังนั้นมิเตอร์วัดการนำไฟฟ้าสามารถนำมาใช้เป็นตัวตรวจวัดในโครมาโตกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูงได้ โดยการวัดไอออนที่ถูกชะออกจากคอลัมน์ที่ใช้วิเคราะห์สารละลายตัวอย่าง โครงสร้างของโพลเซลล์ที่ใช้ในตัวตรวจวัดชนิดนี้ไม่ยุ่งยากซับซ้อน โดยทั่วไปประกอบด้วยหลอดเหล็กกล้าไร้สนิมสองหลอดซึ่งยึดติดกับประเก็น และมีช่องทะลุผ่านประเก็นกับหลอดดังกล่าวซึ่งทำหน้าที่เป็นอิเล็กโทรด (electrode) สารละลายตัวอย่างที่ถูกชะออกจากคอลัมน์

จะไหลผ่านโพลีเมอร์และถูกทิ้งไป กระแสไฟฟ้าที่ไหลผ่านระหว่างอิเล็กโทรดทั้งสองตัว จะขึ้นอยู่กับคุณสมบัติในการนำไฟฟ้าที่เปลี่ยนไปของสารละลายตัวอย่างที่ถูกชะออกมา ดังนั้นกระแสไฟฟ้าที่เปลี่ยนแปลงไปจะส่งสัญญาณไปยังเครื่องบันทึกผลหรือเครื่องประมวลผล

ตัวตรวจวัดแบบสารเรืองแสง (Fluorescence photometer detector)

ตัวตรวจวัดแบบสารเรืองแสง เป็นตัวตรวจวัดที่มีความจำเพาะกับสารที่เรืองแสงเท่านั้น ตัวตรวจวัดชนิดนี้มีความไวสูงและสามารถนำไปประยุกต์ใช้กับสารที่ไม่เรืองแสงได้ เช่น สารสเตียรอยด์ (steroids) ซึ่งสามารถทำให้สารที่ไม่เรืองแสงเกิดการเรืองแสงได้เมื่อให้ความร้อนกับกรดซัลฟิวริก

ตัวตรวจวัดชนิดนี้มีตัวกรองหลายความยาวคลื่น (multiwavelength filter) ซึ่งตัวกรองกระตุ้น (excitation filter) จะเป็นตัวเลือกความยาวคลื่นหรือช่วงความยาวคลื่นที่สารละลายตัวอย่างสามารถถูกกระตุ้นได้ สารละลายตัวอย่างที่เรืองแสงจะปล่อยพลังงาน (emit energy) ออกมาที่ความยาวคลื่นสูงกว่าและผ่านไปยังตัวกรอง การปลดปล่อย (emission filter) เพื่อกำจัดรังสีตกกระทบ และตรวจวัดด้วยโฟโตมัลติพลีเออร์ (photomultiplier) ตัวตรวจวัดชนิดนี้มีความไวมากกว่าตัวตรวจวัดที่อาศัยหลักการดูดกลืนแสง (absorbance detector) ถึง 100 เท่า แต่เส้นมาตรฐานจะไม่เป็นเส้นตรง (non-linear) เหมือนกับตัวตรวจวัดที่อาศัยหลักการดูดกลืนแสง

ตัวตรวจวัดอีแวพออเรทีฟไลท์สแคทเทอริง (Evaporative light scattering detector)

ตัวตรวจวัดแบบอีแวพออเรทีฟไลท์สแคทเทอริง เป็นตัวตรวจวัดที่สามารถนำมาใช้แทนตัวตรวจวัดทั่วๆ ไปที่ใช้กับโครมาโตกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง ตัวตรวจวัดชนิดนี้สามารถนำมาใช้ในการวิเคราะห์สารต่างๆ หลายชนิด เช่น สารปฏิชีวนะ (antibiotic) คาร์โบไฮเดรต (carbohydrate) ลิพิด (lipid) และโพลิเมอร์ (polymer) เป็นต้น ข้อดีของตัวตรวจวัดชนิดนี้เหนือกว่าตัวตรวจวัดยูวี และตัวตรวจวัดแบบวัดสารเรืองแสง คือ การตอบสนองของตัวตรวจวัดไม่ขึ้นกับคุณสมบัติทางแสงและชนิดของสาร แต่การตอบสนองจะแปรผันโดยตรงกับมวลของสารตัวอย่าง นอกจากนี้ข้อดีที่เหนือกว่ามาตรฐานหักเห คือ สามารถใช้กับวัฏภาคไหลที่เป็นเกรเดียนต์ได้ ซึ่งมาตรฐานหักเหไม่สามารถใช้ได้เพราะจะทำให้เส้นฐานเบี่ยงเบน

หลักการทำงานของตัวตรวจวัดแบบอีแวพออเรทีฟไลท์สแคทเทอริง มี 3 ขั้นตอน คือ การทำให้เป็นละออง (nubilization) การระเหยของวัฏภาคไหล (mobile phase evaporative) และการตรวจวัด (detection)

สารละลายตัวอย่างหลังจากถูกแยกโดยคอลัมน์จะไหลมาพร้อมกับวัฏภาคไหล และถูกพ่นที่ตำแหน่งตัวพ่น (nubilizer) ให้เป็นละอองขนาดเล็กด้วยก๊าซไนโตรเจน ที่มีอัตราการไหล 2 ลิตรต่อนาที ละอองขนาดเล็กสม่ำเสมอที่เกิดขึ้นจะเคลื่อนที่ผ่านท่อที่มีความร้อนในระดับที่

ทำให้วัฏภาคไหลระเหยจนหมด แต่ละองของสารตัวอย่างไม่ระเหย ละอองของสารตัวอย่างที่ผ่านออกจากท่อร้อนจะเคลื่อนที่ไปยังแนวแสงเลเซอร์ ซึ่งเมื่อแสงตกกระทบกับอนุภาคของละอองจะเกิดการกระเจิง (scattering) ของแสงขึ้น ตัววัดที่เป็นซิลิคอนไดโอด (silicon diode) จะวัดปริมาณของแสงที่กระเจิงที่มุม 90 องศา ทำให้ปริมาณของแสงที่วัดได้เป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณของอนุภาคของละออง และเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณสารละลายตัวอย่าง

โครงสร้างที่สำคัญภายในของตัวตรวจวัดแบบอีแวพอเรทีฟไลต์สแคทเทอริงมี 2 แบบ คือ แบบสพลิททิง (splitting) ที่มีตัวกระทบ (impactor) วางกั้นทิศทางการไหลของละออง และแบบนอนสพลิททิง (non-splitting) ที่มีตัวกระทบวางขนานกับทิศทางการไหลของละออง ซึ่งแบบสพลิททิงนั้น ละอองของสารละลายตัวอย่างจะถูกแยกทิ้งบางส่วน ส่วนที่เหลือจะเข้าสู่เซลล์เพื่อตรวจวัด ในขณะที่แบบนอนสพลิททิงนั้น ละอองของสารละลายตัวอย่างทั้งหมดจะถูกส่งผ่านไปยังเซลล์เพื่อตรวจวัด การเลือกใช้แบบสพลิททิงหรือนอนสพลิททิงนั้นขึ้นอยู่กับธรรมชาติของสารละลายตัวอย่าง และชนิดของวัฏภาคไหล ในกรณีสารละลายตัวอย่างไม่ระเหย ตัวตรวจวัดอีแวพอเรทีฟไลต์สแคทเทอริง แบบนอนสพลิททิงจะมีความไวในการวิเคราะห์สูงกว่าแบบ สพลิททิง เนื่องจากละอองของสารตัวอย่างทั้งหมดจะไหลเข้าสู่เซลล์เพื่อตรวจวัด อย่างไรก็ตามวิธีใช้ตัวตรวจวัดแบบนอนสพลิททิงนี้ไม่เหมาะที่จะนำมาใช้กับสารละลายตัวอย่างที่สามารถระเหยได้บ้าง เนื่องจากอาจมีบางส่วนสูญเสียไประหว่างการระเหย ซึ่งทำให้ความไวในการวิเคราะห์ลดลง ดังนั้นเพื่อแก้ไขปัญหาดังกล่าว การใช้ตัวตรวจวัดอีแวพอเรทีฟไลต์สแคทเทอริงแบบนอน-สพลิททิง ควรตั้งอุณหภูมิต่ำในการวิเคราะห์หรืออาจใช้ตัวตรวจวัดอีแวพอเรทีฟไลต์สแคทเทอริงแบบนอนสพลิททิง โดยใช้วัฏภาคไหลที่เป็นสารอินทรีย์สูงๆ (highly organic mobile phase) ซึ่งเป็นพวกที่ไม่มีขั้ว (non-polar) ที่อัตราไหลปกติหรือใช้วัฏภาคไหลที่มีน้ำเป็นองค์ประกอบสูงๆ (highly aqueous mobile phase) ซึ่งเป็นพวกที่มีขั้ว (polar) ที่อัตราการไหลต่ำๆ

ตัวตรวจวัดแบบอื่นๆ (Other detectors)

ตัวตรวจวัดแบบอื่นๆ ที่ใช้ในโครมาโตกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง นอกเหนือจากที่กล่าวมาแล้วมีอยู่หลายชนิด เช่น ตัวตรวจวัดแบบลวดเคลื่อนที่ (moving wire detector) ตัวตรวจวัดแบบอิเล็กตรอนแคปเจอร์ (electron capture detector) ตัวตรวจวัดแบบกัมมันตภาพรังสี (radioactivity detector) ตัวตรวจวัดแบบอิเล็กโตรเคมีคัล (electrochemical detector) ตัวตรวจวัดแบบแมสสเปกโตรมิเตอร์ (mass spectrometer) และตัวตรวจวัดโดยอาศัยพื้นฐานเลเซอร์ (laser-base detection) ตัวตรวจวัดแบบลองไลฟ์ลูมิเนสเซนซ์ (long-live luminescence detection) และตัวตรวจวัดแบบโฟโตเทอร์มอล (photothermal detection)

เครื่องประมวลผล (integrator) (พัฒนา เหล่าไพบูลย์ 2547 : 107)

โครมาโตแกรมที่ได้จากสัญญาณตัวตรวจวัดสามารถนำมาจำแนกชนิดของสารได้โดยการวัดเวลาชะ (retention time) นอกจากนี้ความสูงของพีก (peak height) หรือพื้นที่ใต้พีก (peak area) ที่ได้จากสัญญาณตัวตรวจวัดสามารถใช้เป็นข้อมูลในการวิเคราะห์ปริมาณขององค์ประกอบของสารละลายตัวอย่างได้ โดยนำมาคำนวณเปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐาน การวัดความสูงของพีกสามารถหาได้โดยตรงแต่การหาพื้นที่ใต้พีกนั้นมีวิธีการหาหลายวิธีด้วยกัน วิธีการหาพื้นที่ใต้พีกอาจหาโดยการวัดพื้นที่สามเหลี่ยม (triangulation) หรือการใช้เครื่องวัดพื้นที่ (planimeter) หรือวิธีการตัดและชั่งน้ำหนัก (cut and weight methods) อย่างไรก็ตามวิธีดังกล่าวมีข้อเสียคือใช้เวลาค่อนข้างมาก และมีแนวโน้มที่จะเกิดความผิดพลาดเนื่องจากผู้วัดได้ การใช้เครื่องประมวลผล (integrator) ร่วมกับเครื่องบันทึกผล (recorder) สามารถลดระยะเวลาที่ใช้ในการวัดได้ และมีความถูกต้องมากกว่าวิธีการวัดจากผู้วัด ดังนั้นการใช้เครื่องประมวลผลอิเล็กทรอนิกส์แบบตัวเลข (digital electronic integrator) จึงเป็นที่นิยม

ข้อควรปฏิบัติในการใช้เครื่องโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (พัฒนา เหล่าไพบูลย์ 2547 : 109-110)

สิ่งที่ควรระมัดระวังอย่างยิ่งในการใช้เครื่องโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงคือการดูแลรักษาคอลัมน์ให้มีอายุการใช้งานนานที่สุด และมีประสิทธิภาพในการแยกสาร การใช้งานที่ผิดหรือขาดการดูแลจะทำให้คอลัมน์ซึ่งมีราคาค่อนข้างแพงเสียหายแบบถาวร ข้อควรปฏิบัติในการใช้เครื่องโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง มีดังนี้

1. กรองสารตัวอย่างก่อนฉีดเข้าสู่คอลัมน์เพื่อป้องกันคอลัมน์อุดตัน
2. ระวังการเกิดฟองอากาศในเข็มที่ใช้ดูดสารตัวอย่างหรือสารมาตรฐาน
3. ล้างเข็มฉีดสารตัวอย่างและสารมาตรฐานทุกครั้งทั้งก่อนและหลังการใช้งาน
4. ใช้เฉพาะสารเคมีเกรด HPLC เท่านั้น สำหรับเป็นเฟสเคลื่อนที่
5. น้ำกลั่นควรมีความบริสุทธิ์สูงโดยการกลั่น 2-3 ครั้ง รวมทั้งภาชนะต่างๆ ที่ใช้ในการวิเคราะห์ต้องล้างให้สะอาด

การวิเคราะห์ต้องล้างให้สะอาด

6. สารละลายที่ใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่ ควรมีการกรองสิ่งสกปรกออกก่อนใช้งาน
7. สารละลายที่ใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่ ควรทำการกำจัดแก๊สออกก่อนใช้งาน โดยใช้เครื่องอัลตราโซนิก หรือเครื่องดูดสุญญากาศ
8. ตรวจสอบพีเอชของเฟสเคลื่อนที่ให้อยู่ในช่วงพีเอช 2-7 เพื่อป้องกันซิลิกาในคอลัมน์ถูกทำลาย

9. ล้างทำความสะอาดคอลัมน์ทุกครั้งหลังจากใช้งานเสร็จ

10. ก่อนเก็บคอลัมน์ในระยะยาว ควรล้างทำความสะอาดคอลัมน์ด้วยสารละลายที่ผู้ผลิตกำหนด ซึ่งโดยทั่วไปนิยมใช้สารละลายดังนี้

10.1 คอลัมน์ที่เฟสคงที่ชนิดซิลิกา นิยมใช้เมทิลีนไซยาไนด์ หรือ เมทิลีนไฮดรอกไซด์ กับคอลัมน์แบบเฟสย้อนกลับ และใช้เฮกเซน หรือเฮปเทนผสมกับไอโซโพรพิลแอลกอฮอล์ในอัตราส่วน 97:3 โดยปริมาตรสำหรับเก็บคอลัมน์แบบเฟสธรรมดา

10.2 คอลัมน์ที่บรรจุเฟสคงที่ชนิดพอลิไสตรีนไดไวนิลเบนซีนโคพอลิเมอร์ (polystyrene divinyl benzene copolymer) นิยมเก็บในน้ำกลั่นซึ่งมีโซเดียมเอ-ไซด์ 0.02 %

11. ก่อนเลิกใช้งาน ควรปิดเครื่องมือตามลำดับก่อนหลัง ดังนี้ ปิดตัวบันทึกผล ปิดตัวตรวจวัด ปิดตัวฉีด ปิดเครื่องสูบ

12. ในกรณีที่เปลี่ยนขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายในคอลัมน์ต้องปรับอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ เพื่อให้ความเร็วของเฟสเคลื่อนที่และเวลาหน่วงมีค่าเท่าเดิม

การบำรุงรักษาเครื่องโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (พัฒนา เหล่าไพบูลย์ 2547 : 110-113)

การใช้เครื่องโครมาโตกราฟีสมรรถนะสูงนั้น จำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องดูแลบำรุงรักษาเป็นอย่างดี โดยเฉพาะในส่วนของคอลัมน์ ซึ่งหากไม่บำรุงรักษาเป็นอย่างดีแล้วอาจทำให้เกิดการอุดตัน และเสื่อมสภาพของคอลัมน์ได้ ซึ่งการดูแลรักษาคอลัมน์ของเครื่องโครมาโตกราฟีสมรรถนะสูงนั้นมีข้อควรปฏิบัติดังนี้

1. การทำคอลัมน์ให้กลับสภาพเดิม (column regeneration) ในการใช้งานคอลัมน์เป็นเวลานานจะมีสารปนเปื้อนเข้าไปสะสมอยู่ในคอลัมน์เป็นจำนวนมาก ซึ่งไม่สามารถล้างออกด้วยวิธีการตามปกติ จึงจำเป็นต้องทำให้ประสิทธิภาพของคอลัมน์กลับสู่สภาพเดิม เช่น คอลัมน์ที่เฟสคงที่เป็นซิลิกาชนิดเฟสธรรมดาให้ล้างด้วยเฮกเซน เมทิลีนคลอไรด์ ไอโซโพรพานอล และเฟสเคลื่อนที่ ตามลำดับ โดยการสูบล้างสารละลายแต่ละชนิดเข้าไปในคอลัมน์ย้อนทิศทางการไหลปกติของคอลัมน์ โดยใช้ปริมาตรอย่างละ 50 มิลลิลิตร

2. ตรวจสอบอัตราการไหลจริงของคอลัมน์ โดยการใช้กระบอกตวงวัดปริมาตรของสารละลายที่ไหลออกมาจริงจากคอลัมน์ในเวลาที่กำหนด เพื่อตรวจสอบความผิดปกติของคอลัมน์และความถูกต้องของมาตรวัดอัตราการไหลของเครื่องมือ

3. ล้างตัวกรองในระบบทุกๆ เดือน หรือเมื่อเครื่องแสดงอาการอุดตัน

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การประมาณอายุของคราบเลือด โดย real – time revers transcriptase PCR

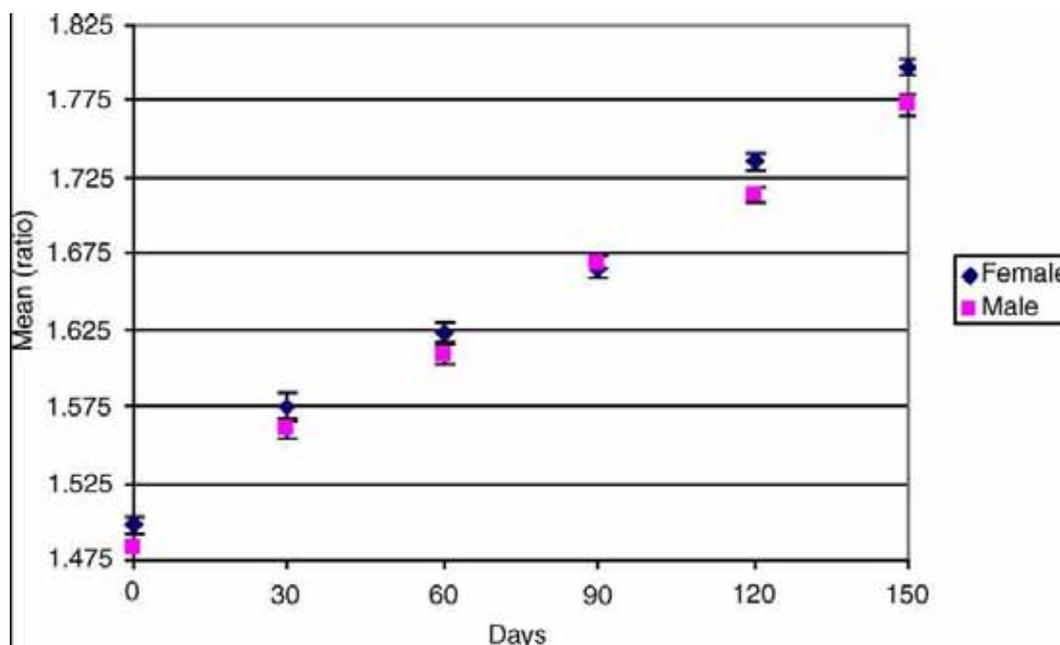
การประมาณอายุของตัวอย่างทางชีววิทยา ความเสถียรของ RNA ต่อเวลาที่ผ่านไปได้อูกนำมาตรวจสอบ RNA เป็นตัวเลือกที่ดีสำหรับการศึกษาด้วยหลายๆเหตุผลได้แก่ RNA มีอยู่หลากหลายชนิดมาก RNA เปลี่ยนแปลงอย่างมีความสัมพันธ์ และความแตกต่างกันระหว่าง species สามารถใช้ประโยชน์จากการทดสอบ species-specific tests. การใช้ RT – PCR ในการวิจัยที่มีมาก่อนหน้านี้ ได้แสดงให้เห็นว่า glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase mRNA (GAPDH mRNA) สามารถตรวจวัดได้จากตัวอย่างเลือดที่มีอายุมากถึง 6 เดือน (Bauer 1999 : 1232–1236) ผลลัพธ์เหล่านี้แสดงให้เห็นว่า RNA ในตัวอย่างเลือดที่แห้งแล้วอาจมีความเสถียรเพียงพอสำหรับการสืบสวนทางนิติวิทยาศาสตร์ งานวิจัยเร็วๆนี้แสดงให้เห็นว่า RNA ชนิดต่างๆ มีอัตราการสลายตัวที่แตกต่างกัน inducible gene IL-3 mRNA ถูกพบว่าสลายตัวได้เร็วกว่า mRNA ของ GAPDH housekeeping gene ในเนื้อเยื่อปอดของหนูที่ตายแล้ว RNA มีอยู่หลายๆแบบที่แตกต่างกัน (mRNA, tRNA, rRNA) และมีสมมติฐานว่า RNA ชนิดต่างๆจะมีอัตราการเสื่อมสภาพที่ต่างกัน ด้วยทำให้สัดส่วนของชนิด RNA เปลี่ยนไปตามระยะเวลา เพื่อที่จะทดสอบสมมติฐานเกี่ยวกับการเสื่อมสภาพของ RNA ต่างชนิดกัน ภายนอกร่างกาย ที่อัตราซึ่งแตกต่าง

Stacey et al. (2005) ได้เปรียบเทียบความสัมพันธ์ระหว่างเสถียรภาพของ rRNA และ mRNA และได้รายงานไว้ว่าอัตราส่วนของโมเลกุล RNA สองประเภท (beta - actin mRNA และ 18 S rRNA) ในคราบเลือดของเลือดมนุษย์ที่ทำการทดลองมีการเปลี่ยนแปลงแบบเป็นเชิงเส้นในช่วงระยะเวลาการศึกษา 150 วัน ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าอัตราส่วนความสัมพันธ์ของ RNA ทั้งสองชนิดที่แตกต่างกันคือ 18S และ β -actin สามารถนำไปใช้ประมาณอายุของคราบเลือดได้

การทดลองได้ทำขึ้น โดยเลือดถูกนำมาจากบุคคล 8 คน (เพศชาย 4 คน และเพศหญิง 4 คน) ที่มีเชื้อสายเป็นชาวยุโรป เพศชายมีอายุตั้งแต่ 21 – 55 ปี เพศหญิงมีอายุตั้งแต่ 22 – 36 ปี เลือด 10 ml ถูกเก็บไว้ใน non-coated BD Vacutainers (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA) โดยแบ่งเลือดของแต่ละผู้บริจาคออกเป็นสามส่วน แต่ละส่วนควมมาทีละ 10 μ l หยดลงทันทีบนผ้าฝ้าย 100% ขึ้นเดียวกัน และเก็บไว้ที่ 25 °C ความชื้นสัมพัทธ์ 50% ใน EC22560 Environmental chamber (Lab-Line, Melrose Park, IL) ผ้าแต่ละชิ้นใช้สำหรับแต่ละบุคคล เลือดถูกเก็บสามครั้งต่อสัปดาห์โดยสุ่มเลือกมาทีละสองคน ขั้นตอนการเก็บเลือดจะเสร็จสิ้นในเวลา 4 สัปดาห์ ตัวอย่างถูกเอาออกจาก chamber และดำเนินการเมื่อได้อายุตามที่ต้องการคือ 30 , 60 , 120 และ 150 วัน

สกัด RNA ด้วย TRI Reagent BD (Molecular Research Center, Cincinnati, Ohio) จากตัวอย่างเลือดแห้งที่มีอายุหลากหลาย แต่ละตัวอย่างจากคราบเลือด 10 μ l ด้วยเหตุนี้ ตัวอย่าง RNA รวมทั้งเก้าจะถูกแยกออกแต่ละช่วงเวลา โดยเติมน้ำ 200 μ l , polyaracyl (Molecular Research Center, Cincinnati, Ohio) 3 μ l และเติม TRI Reagent BD จนมีปริมาตรเป็น 750 μ l คราบเลือดแห้ง ถูกตัดออกจากชิ้นผ้าและใส่ลงในสารละลาย จากนั้น vortex แล้วทิ้งไว้ที่ 50 $^{\circ}$ C นาน 10 min เติม 1-bromo-3-chloropropane 100 μ l (Molecular Research Center, Cincinnati) ลงในแต่ละตัวอย่าง แล้ว vortexed นาน 15 sec. ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นปล่อยทิ้งไว้ (23 $^{\circ}$ C) นาน 3 min. แล้ว centrifuged นาน 15 min (12,000 X g) ที่ 4 $^{\circ}$ C ถ่ายสารละลายชั้นบน (containing the RNA) ใส่ในหลอดทดลองอันใหม่ (~ 500 μ l) เติม isopropanol เย็น 500 μ l ที่ระหว่างชั้นของสารละลาย จะมีโมเลกุลของ DNA ซึ่งนำไปสกัดแยกต่อไป ตัวอย่างถูกพลิกกลับ 2 ครั้ง และ incubate ที่อุณหภูมิห้องนาน 7 min จากนั้น centrifuged 8 min (12,000 X g) ที่ส่วนที่เป็นของเหลวด้านบน และล้างตะกอน RNA ด้วย 1 ml ของ 75% ethanol (EtOH) vortex ตัวอย่าง และ centrifuged นาน 5 min ที่ส่วนที่เป็นของเหลวด้านบน (liquid supernatant) และนำ RNA pellets ไปทำให้แห้งด้วยลม (air-dry) นาน 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ทำให้ RNA ลอยตัวกลับมาอีกครั้งโดยเติม 40 μ l ของ RNase free water (Fisher Scientific, Pittsburgh, Pennsylvania) และทิ้งไว้ที่ 55 $^{\circ}$ C นาน 10 min RNA ปลอมแปลงที่แยกออกมาจากฝ้ายที่ไม่มีคราบเลือดใช้เป็น negative control ด้วยทุกครั้ง

ผลการวิเคราะห์คราบเลือดทั้ง 8 ตัวอย่างในช่วงเวลา 150 วัน โดย real-time reverse transcription PCR ได้แสดงไว้ในภาพที่ 6 อัตราส่วนระหว่าง Ct value ของ 18 S กับ β -actin แปรผันตรงกับอายุของเลือดทั้งในเพศหญิงและเพศชาย แม้ว่าความแตกต่างระหว่างเพศจะมีผลอยู่บ้าง แต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อใช้ตัวอย่างในปริมาณนี้ จำนวนวันที่เพิ่มขึ้นมีผลต่ออัตราส่วนของยีนทั้งสองอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.0001$) และค่า $R^2 = 78.2\%$ (ข้อมูลจากทั้งเพศชายและเพศหญิงถูกนำมาวิเคราะห์รวมกัน)



ภาพที่ 6 การวิเคราะห์อัตราส่วน (ratio) ที่เปลี่ยนแปลงตามอายุของคราบเลือด แสดงให้เห็นการเปลี่ยนแปลงของระดับ RNA ตามอายุของคราบเลือด ข้อมูลแสดงให้เห็นอัตราส่วนของ 18 S rRNA กับ β -actin mRNA ซึ่งหาค่าโดย real-time reverse transcription PCR
ที่มา : Stacey Anderson et al., “A method for determining the age of a bloodstain.” *Forensic Science International* 148,1 (February 2005) : 40.

จากภาพที่ 6 แสดงอัตราการสลายตัวของ RNA ทั้งสองชนิดในเลือดแห้งในระยะเวลา 150 วัน ภายใต้สภาวะที่ควบคุม ค่า Ct ของ 18 S ไม่ปรากฏให้เห็นการเปลี่ยนแปลงในช่วงระยะเวลา 150 วัน แต่ค่า Ct ของ β -actin ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ตามระยะเวลา เชื่อได้ว่าสัดส่วนของ 18 S rRNA ต่อ β -actin mRNA จะเพิ่มขึ้นตามระยะเวลา

ทั้ง 18 S และ β -actin ถูกพิจารณาว่าเป็น “housekeeping genes” ซึ่งแสดงออกใน cell ทุกชนิดและพบในปริมาณสูง ซึ่งเชื่อว่า RNA products ของพวกมันจะพบได้ที่วัตถุพยานในที่เกิดเหตุ การแสดงออกในทุกเซลล์ของยีนเหล่านี้ แสดงว่าการวิเคราะห์สามารถประยุกต์ใช้กับเนื้อเยื่ออื่นๆ ได้นอกจากเลือด การเปรียบเทียบระหว่างตัวอย่างเลือด จากคนเดียวกัน และระหว่างบุคคลต่างกัน สามารถชี้ให้เห็นถึงความสัมพันธ์ที่คงที่ของ housekeeping genes

ผลที่ได้สนับสนุนสมมติฐานที่ว่าด้วยความแตกต่างในอัตราการสลายของ RNA ภายนอกร่างกาย ชี้ให้เห็นว่า β -actin mRNA มีความคงทนน้อย และเสื่อมสภาพเร็วกว่า 18 S rRNA สำหรับคราบเลือดที่อยู่บนร่างกาย ใช้ real-time reverse transcription polymerase chain

reaction ในการตรวจหา 18 S rRNA และ β -actin mRNA พร้อมกัน แสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ของอัตราส่วนของ RNA ที่สามารถใช้ประมาณอายุของคราบเลือด ซึ่งการพิสูจน์ผลที่ได้จากแนวคิดที่ว่าเราสามารถคาดการณ์สภาพของ RNA ทั้งสองได้ ความแม่นยำและถูกต้องแสดงถึงศักยภาพที่จะสามารถใช้ตรวจหลักฐานทางชีววิทยาอื่น ๆ ด้วย เป็นวิธีการหาอายุของคราบเลือดที่ได้ผลดีกว่าเทคนิคที่ใช้มาก่อนหน้านี้ตามเหตุผลที่ได้กล่าวมา โดยการหา RNA ratio การวิเคราะห์ไม่ขึ้นกับขนาดของตัวอย่าง ตัวอย่างเพียงเล็กน้อยก็เพียงพอที่จะทดสอบ ด้วยเลือดเพียง 1 μ l ก็เข้าสู่กระบวนการได้ แล้วยังสามารถประยุกต์ใช้กับเนื้อเยื่ออื่นๆ ได้นอกเหนือจากเลือด primers และ probe ที่จำเพาะต่อ species ช่วยกรองสัญญาณผิดพลาดจากการปนเปื้อน ซึ่งหลายๆ วิธีพนักงานสอบสวนต้องหาวิธีที่จะกำจัดการปนเปื้อน วิธีการนี้แยก DNA ในขั้นตอนเดียวกับการแยก RNA เป็นการระบุเอกลักษณ์บุคคลและหาว่าตัวอย่างทางชีววิทยาถูกทิ้งไว้เมื่อใดโดยการเตรียมขั้นตอนเดียวกัน การประมาณช่วงเวลาสามารถทำได้ในระยะเวลาไม่เกิน 150 วัน

การประมาณอายุของคราบเลือด โดย AFM (Atomic Force Microscopy)

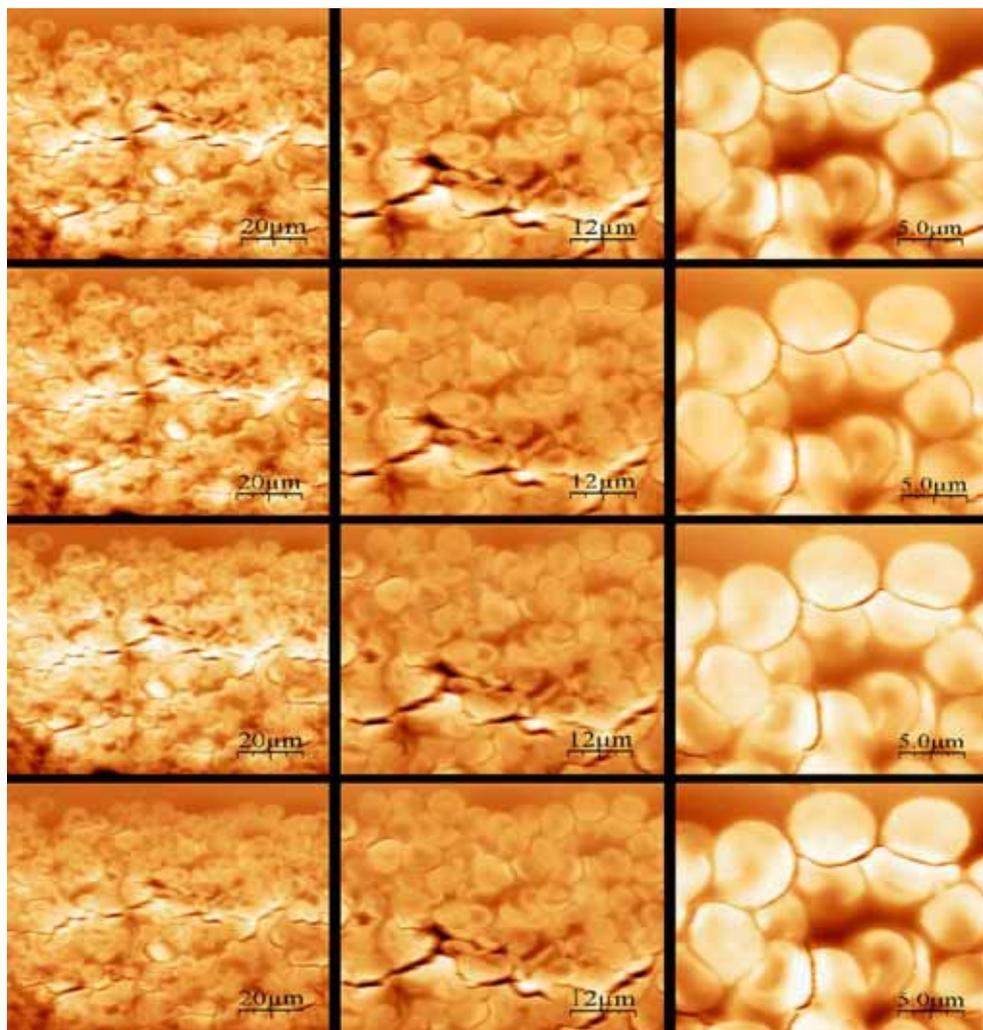
Strasser et al. (2006) ใช้วิธีการทาง Force spectroscopy สำหรับการประมาณอายุของหยดเลือด ซึ่งสามารถนำมาใช้ในงานด้านนิติวิทยาศาสตร์ได้ โดยใช้ AFM (Atomic Force Microscopy) เพื่อการถ่ายภาพที่มีความละเอียดสูงในการถ่ายภาพเซลล์เม็ดเลือดแดง และระบุความยืดหยุ่นที่เปลี่ยนแปลงไปได้ในระดับ nanometer scale ในขั้นตอนการวิเคราะห์ได้นำหยดเลือดใส่ลงไปใน slide แก้วหลังจากที่ทำให้หยดเลือดแห้งแล้วเริ่มทำการตรวจสอบโดย AFM ในขั้นตอนแรกจะแสดงรูปภาพของเซลล์เม็ดเลือดแดงจำนวนหลายเซลล์ ซึ่งสามารถระบุได้ง่ายเนื่องจากรูปร่างของเซลล์เม็ดเลือดแดงมีลักษณะคล้ายโดนัท ลำดับต่อมาเป็นการศึกษารูปร่างลักษณะของเซลล์เม็ดเลือดแดงในระยะเวลา 4 สัปดาห์ ซึ่งไม่สามารถเห็นการเปลี่ยนแปลงใดๆ ขั้นตอนที่สองจะใช้ AFM ทดสอบความยืดหยุ่นโดยบันทึกแนวของความโค้งที่เปลี่ยนแปลง ซึ่งจะทำการวัดเวลาที่เลือดกำลังแห้งที่ระยะเวลา 1.5 ชั่วโมง, 30 ชั่วโมง และ 31 วัน ภายใต้สภาวะแวดล้อมคงที่ ณ อุณหภูมิห้อง (20 °C) และที่ความชื้นสัมพัทธ์ 30% หลังจากนั้นนำค่าที่วัดความยืดหยุ่นดังกล่าวมาเขียนกราฟเทียบกับระยะเวลา ทำกระบวนการทั้งหมดซ้ำหลาย ๆ ครั้ง จากการทดลองแสดงว่าความยืดหยุ่น (Elasticity pattern) จะลดลงเมื่อระยะเวลาผ่านไปนานขึ้น ซึ่งมีความเป็นไปได้อย่างมากว่าเนื่องมาจากความเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นภายในหยดเลือดขณะที่กำลังแห้งและจากการเปลี่ยนแปลงในกระบวนการแข็งตัวของเลือด จากข้อมูลเบื้องต้นแสดงให้เห็นถึงความเป็นไปได้ของวิธีการนี้ที่จะนำมาใช้ในการสร้างกราฟมาตรฐาน (Calibration Curves) ซึ่งสามารถนำมาใช้ในการประมาณอายุของหยดเลือดได้

การเตรียมตัวอย่างเลือดสำหรับการตรวจสอบด้วย AFM (Atomic Force Microscope) จะใช้เลือดเพียงเล็กน้อย (2-3 หยด) จากอาสาสมัครผู้ที่มีสุขภาพดี เจาะเลือดจากปลายนิ้วโดยใช้ blood lancets หยดเลือดลงบน slide แก้ว และทำให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง

ในการทดลองนี้ จะใช้เครื่อง AFM (Atomic Force Microscope) Topometrix Accurex ในการถ่ายภาพเซลล์เม็ดเลือดแดง และวัดความยืดหยุ่นของเลือด ที่ความชื้นสัมพัทธ์ 30% และใช้ Software SPIP (Image Metrology, Denmark) ในการวิเคราะห์ภาพถ่ายของหยดเลือดบริเวณเดียวกัน ที่อายุต่างกันคือ 1.5 ชั่วโมง, 1 สัปดาห์, 2 สัปดาห์ และ 4 สัปดาห์

ในการวิเคราะห์ภาพถ่ายของเซลล์เม็ดเลือดแดงในระดับโมเลกุล และใช้ในการคำนวณหาค่าความยืดหยุ่นที่เปลี่ยนแปลงไปตามอายุของเลือดที่เพิ่มขึ้น โดยบันทึกแนวของความโค้งที่เปลี่ยนแปลงไปหลังจากที่ทำให้เลือดแห้งแล้ว 1.5 ชั่วโมง 30 ชั่วโมง และ 31 วัน ภายใต้สภาวะแวดล้อมที่คงที่ โดยที่ทำการทดลอง ณ อุณหภูมิห้อง ความชื้นสัมพัทธ์ 30% หลังจากนั้น นำค่าที่วัดความยืดหยุ่นดังกล่าวมาเขียนกราฟเทียบกับระยะเวลา โดยทำกระบวนการทั้งหมดซ้ำหลาย ๆ ครั้ง

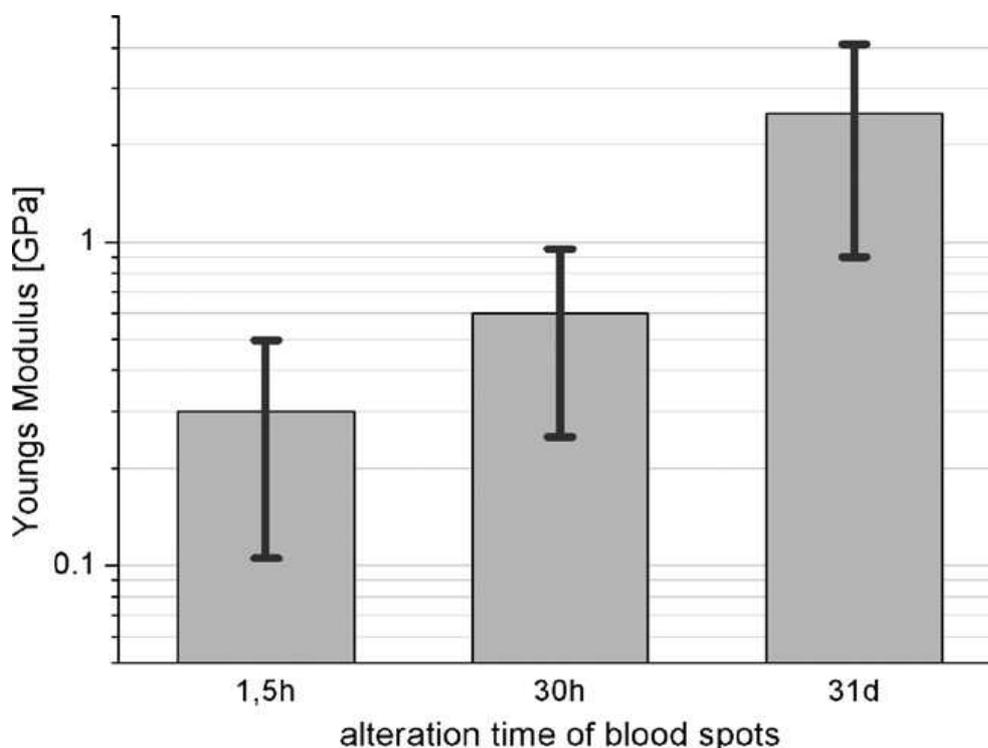
ภาพที่ 7 แสดงผลของการสืบสวนสอบสวนเกี่ยวกับโครงสร้างของหยดเลือดที่แห้งถูกทำให้แห้งแล้วโดยเทคนิค AFM. โดยที่ภาพถูกแบ่งออกเป็นแถวและหลัก (rows and columns) ซึ่งแถวแรกสแกนหลังจากเลือดถูกทิ้งไว้ให้แห้งเป็นเวลา 1.5 ชั่วโมง แถวที่สองหลังจากเลือดถูกทิ้งไว้ให้แห้งเป็นเวลา 1 สัปดาห์ แถวที่สามหลังจากเลือดถูกทิ้งไว้ให้แห้งเป็นเวลา 2 สัปดาห์ และแถวที่สี่หลังจากเลือดถูกทิ้งไว้ให้แห้งเป็นเวลา 4 สัปดาห์ ซึ่งจากการศึกษาผลที่ได้เป็นรูปโครงสร้างของหยดเลือดแห้งที่ไม่แสดงให้เห็นการเปลี่ยนแปลงที่แตกต่างกันตามการเปลี่ยนแปลงของระยะเวลาที่หยดเลือดนั้นๆ ถูกทิ้งไว้



ภาพที่ 7 ผลของการสืบสวนสอบสวนเกี่ยวกับโครงสร้างของหยดเลือดแห้งโดย AFM.

ที่มา : Stefan Strasser et al., “Age determination of blood spots in forensic medicine by force Spectroscopy.” *Forensic Sci. Int* 170, 1 (July 2007) : 11.

การถ่ายภาพตัวอย่างเลือดโดย AFM แสดงให้เห็นว่าไม่มีลักษณะโครงสร้างภายนอกใด ๆ ที่แตกต่างกันเลยในแต่ละภาพที่มีอายุแตกต่างกัน จะสังเกตเห็นรอยแตกบนหยดเลือดอยู่บ้างซึ่งเกิดขึ้นแต่แรก และไม่มีการเปลี่ยนแปลงไม่ว่าจะดูที่กำลังขยายมากหรือน้อย สรุปว่าลักษณะโครงสร้างพื้นผิวภายนอกไม่มีการเปลี่ยนแปลงตามเวลาที่เปลี่ยนไป ดังนั้น รูปร่างจึงไม่สามารถนำมาใช้ในการประมาณอายุของหยดเลือดได้



ภาพที่ 8 เปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงของความยืดหยุ่นจากผลของการเปลี่ยนแปลงเวลา คราบเลือด ถูกวัดค่าความยืดหยุ่นหลังจากมีอายุได้ 1.5 ชั่วโมง 30 ชั่วโมง และหลังจาก 31 วัน
ที่มา : Stefan Strasser et al., “Age determination of blood spots in forensic medicine by force Spectroscopy.” *Forensic Sci. Int* 170, 1 (July 2007) : 12.

ผลของการทดสอบความยืดหยุ่นของตัวอย่างเลือดที่ศึกษา แสดงให้เห็นอย่างชัดเจนว่ามีความแข็งแรงเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาของเลือดที่เพิ่มขึ้น ดังนั้นความยืดหยุ่นของเลือดจะลดลงตามอายุของเลือดที่เพิ่มขึ้น ซึ่งผลสรุปนี้สามารถนำมาใช้ในการกำหนดหาอายุของหยดเลือดได้

จากการบันทึกภาพโดย AFM (Atomic Force Microscope) ตลอดช่วงเวลาที่ทำการศึกษาไม่พบว่ามีเปลี่ยนแปลงและไม่มีแตกต่างใดๆ เกิดขึ้นเลย แต่ผลการทดสอบความยืดหยุ่นของตัวอย่างเลือดที่ศึกษา แสดงให้เห็นอย่างชัดเจนว่ามีความแข็งแรงเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาของเลือดที่เพิ่มขึ้น ดังนั้นความยืดหยุ่นของเลือดจะลดลงตามอายุของเลือดที่เพิ่มขึ้น ซึ่งผลสรุปนี้สามารถนำมาใช้ในการกำหนดหาอายุของหยดเลือดได้

อย่างไรก็ตาม ในการทดลองนี้ยังมีข้อจำกัดบางอย่าง เช่น การสังเกตความเปลี่ยนแปลงของกลุ่มเม็ดเลือดแดง ซึ่งอาจมีผลกระทบจากส่วนประกอบอื่น ๆ ของเลือด ดังนั้นผู้ทำการทดลองจึงได้เสนอแนะสำหรับการทดลองในขั้นที่สูงขึ้นต่อไปคือให้มีการศึกษาในลักษณะเดียวกัน แต่ให้

ทำการศึกษาในระดับเซลล์เม็ดเลือดแดงเดี่ยว ๆ เพื่อให้ได้ผลที่ชัดเจนและถูกต้องแม่นยำยิ่งขึ้น เพื่อที่จะได้สามารถนำความรู้ไปประยุกต์ใช้ในการปฏิบัติงานในด้านที่เกี่ยวข้องต่อไป

การประมาณอายุของคราบเลือด โดย High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

การใช้ HPLC ในการทดสอบคราบเลือดเคยประสบความสำเร็จมาแล้ว โดยเฉพาะ สำหรับการระบุสปีชีส์ (species) โดยวิเคราะห์ฮีโมโกลบินที่สกัดจากคราบเลือด (Andrasko and Rosen 1994 : 1018-1025) นอกจากนี้ Inoue et al. (1991) ได้รายงานการลดลงตามระยะเวลาของ อัตราส่วนระหว่างพื้นที่พีคของแอลฟาโกลบิน (α - globin peak area) ต่อพื้นที่พีคของฮีม (heam peak area) ในคราบเลือด และหลังจากนั้นได้รายงานการพบพีคที่มีพื้นที่เพิ่มขึ้นตามระยะเวลา โดยเรียกว่าพีค "X" ซึ่งไม่สามารถตรวจพบพีคนี้ได้เลือดสด (Inoue et al. 1992 : 17-27)

Inoue et al. (1992) ได้ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนในคราบเลือด โดยเก็บตัวอย่างเลือดจากอาสาสมัครจำนวนแปดคน ตัวอย่างเลือดที่ได้เก็บไว้ใน ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) โดยอาสาสมัครทุกคนไม่พบว่ามีความผิดปกติของฮีโมโกลบิน เลือดตัวอย่างถูกหยดลงบน กระดาษกรอง (Toyo Roshi, Ltd., No. 1, Tokyo, Japan) และทำให้แห้งโดยผึ่งทิ้งไว้ข้ามคืนใน สภาวะปกติ แต่ละตัวอย่างถูกเก็บไว้ที่ 6 สภาวะ คือ ภายใตแสงฟลูออเรสเซนต์ และในที่มืด โดย เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 37° C ที่อุณหภูมิห้อง และที่ 4° C

กระดาษกรองที่มีคราบเลือด (จากเลือดสดประมาณ 5 μ l) ถูกตัดให้เป็นชิ้นเล็กๆ แล้วแช่ ในน้ำกลั่น 250 μ l นำไป centrifuged ที่ 11750 x g นาน 20 นาที

สารเคมี

Trifluoroacetic acid (TFA , amino acid sequencing grade)

Dimethylsulfoxide (amino acid sequencing grade)

Acetonitrile (HPLC grade) จาก Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan)

น้ำปราศจากไอออน

Hemin (bovine, type I) จาก Sigma Chemical Co. (St. Louis, Missouri) ละลายใน dimethylsulfoxide ให้มีความเข้มข้นเป็น 5 mM จากนั้นเจือจางด้วย 0.1% TFA ใน 36% acetonitrile ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.1 mM

เครื่อง HPLC

เครื่อง HPLC ที่ใช้เป็น Shimadzu LC-6A liquid chromatography (Kyoto, Japan) ประกอบด้วย

LC-6A pump 2 ตัว

SCL-6A system controller

SIL-6A auto injector

CTO-6A column oven ตั้งอุณหภูมิที่ 35° C

SPD-7AV UV-VIS spectrophotometric detector ตั้งค่าความยาวคลื่นที่ 220 nm.

Shimadzu C-R4A integrator คำนวณค่า peak areas และ retention times

สถานะที่ใช้

ใช้คอลัมน์ μ Bondasphere 5 μ C18-300 A° (3.9 x 150 mm, Nihon Millipore Ltd., Tokyo, Japan) ไม่มีการใช้ทั้ง precolumns และ guard columns

ตัวทำละลายประกอบด้วย

Solvent A สารผสมระหว่าง 0.1% TFA ในน้ำ กับ 0.1% TFA ใน acetonitrile ด้วยอัตราส่วน 95:5

Solvent B สารผสมระหว่าง 0.1% TFA ในน้ำ กับ 0.1% TFA ใน acetonitrile ด้วยอัตราส่วน 40:60

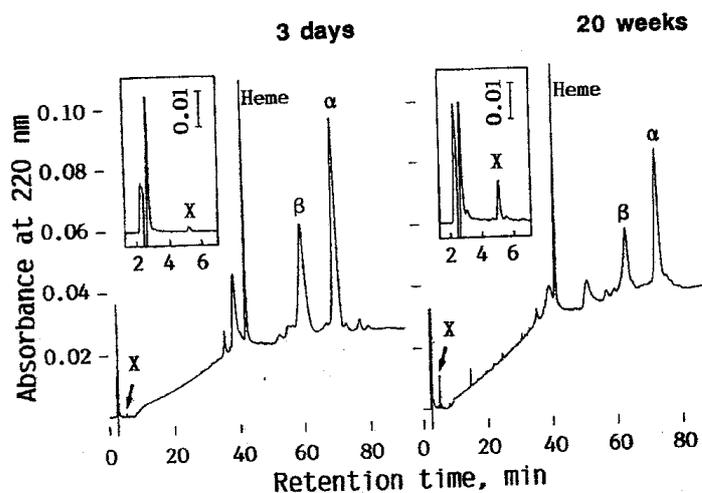
ทำการวิเคราะห์ด้วยระบบ gradient โดยปรับสถานะดังนี้ 10-65% Solvent B ที่ 30 min และ 65-75% Solvent B ที่ 60 min flow rate 0.6 ml/min

ปริมาณของสารสกัดจากคราบเลือดที่ฉีดเข้าคอลัมน์ เปลี่ยนแปลงไประหว่าง 6-40 μ l ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารสกัด

การ Identify ฮีม (heme) และสายโซ่โกลบิน (globin chain)

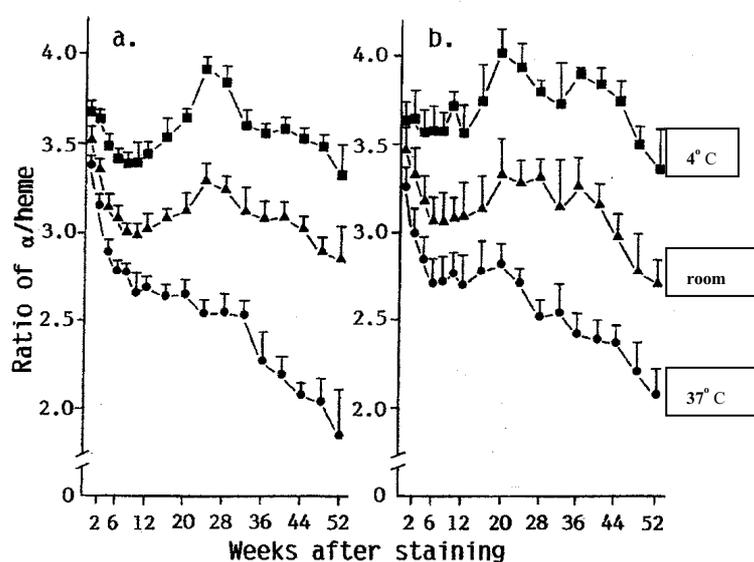
การ Identify พีคของฮีม (heme) ทำโดยเปรียบเทียบ retention time และ absorption spectra ระหว่างสารละลายมาตรฐานกับ สารสกัดจากคราบเลือด โดย Shimadzu SPD-M6A photodiode array UV-VIS detector การ Identify พีคของสายโซ่โกลบิน (globin chain) ทำโดยเปรียบเทียบพีคที่ปรากฏ พีคที่ไม่ปรากฏ และสัดส่วนของพีคในสารละลายที่ทราบความเข้มข้นของฮีโมโกลบิน

ภาพที่ 9 แสดงให้เห็น โครมาโตแกรมที่ได้จากสารสกัดจากคราบเลือด ที่ช่วงเวลาต่างๆ พีคหลักๆ ที่เห็นแยกออกมาจากพีคอื่นๆ อย่างเด่นชัดได้แก่ heme และสายโซ่ β กับ α -globin นอกจากนี้ยังสามารถตรวจพบพีคเล็กๆ ที่ retention time ประมาณ 5 นาที และตั้งชื่อว่า “X” โดยที่ความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่พีคนี้กับเวลาที่ตรวจพบได้ในสารสกัดจากคราบเลือดมีค่าเพิ่มขึ้น แต่ไม่สามารถตรวจพบได้ในเลือดสด



ภาพที่ 9 โครมาโตแกรมของสารสกัดจากคราบเลือด ซึ่งเก็บไว้ภายใต้แสงฟลูออเรสเซนซ์ ที่ 37°C ในช่วงเวลาต่างๆ

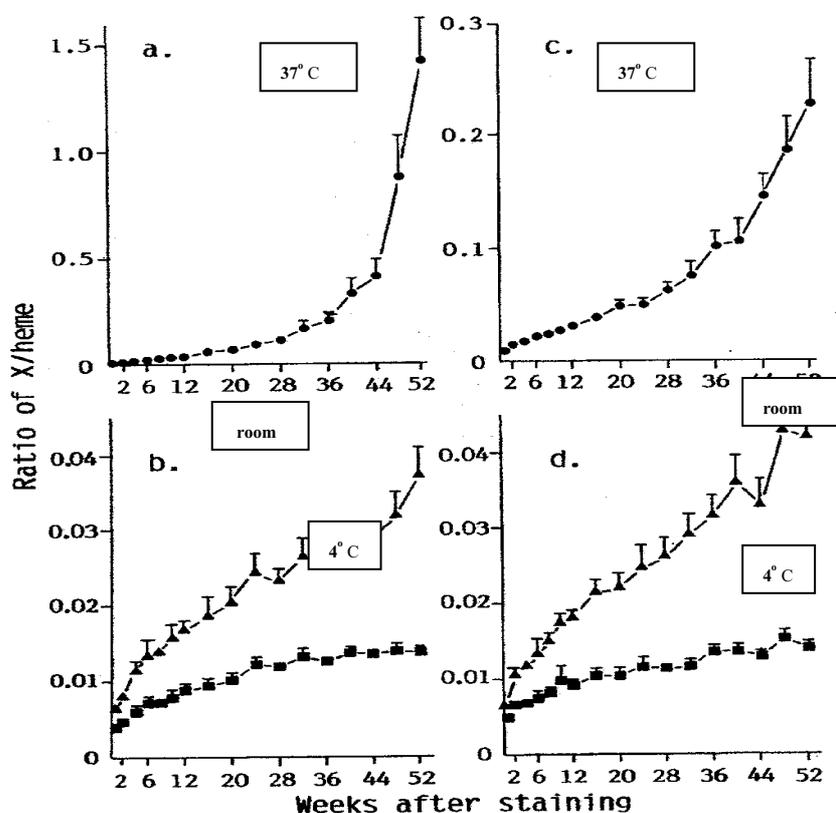
ที่มา : Hiroyuki Inoue et al., "A New Marker for Estimation of Bloodstain Age by High Performance Liquid Chromatography." *Forensic Sci. Int* 57 (August 1992) : 20.



ภาพที่ 10 ความสัมพันธ์ระหว่างอายุของคราบเลือดกับอัตราส่วนพื้นที่ใต้พีคของสายโซ่แอลฟาต่อพื้นที่พีคของฮีม จากโครมาโตแกรมของสารสกัดจากคราบเลือด

ที่มา : Hiroyuki Inoue et al., "A New Marker for Estimation of Bloodstain Age by High Performance Liquid Chromatography." *Forensic Sci. Int* 57 (August 1992) : 23.

จากภาพที่ 10 แสดงให้เห็นการเปลี่ยนแปลงตามระยะเวลาของอัตราส่วนพื้นที่ฟีกของสายโซ่แอลฟาต่อพื้นที่ฟีกของฮีม (α /heme ratios) จากโครมาโตแกรมของคราบเลือดที่เก็บไว้ภายใต้สภาวะต่างๆ โดยที่กราฟ (a) เป็นโครมาโตแกรมของคราบเลือดที่เก็บไว้ภายใต้แสงฟลูออเรสเซนต์ และกราฟ (b) เป็นโครมาโตแกรมของคราบเลือดที่เก็บไว้ในที่มืด ที่อุณหภูมิ 37°C ที่อุณหภูมิห้อง และที่ 4°C เป็นเวลา 52 สัปดาห์ พบว่าโดยทั่วไปอัตราส่วนจะลดลงตามระยะเวลา แม้ว่ามันจะแสดงให้เห็นแนวโน้มที่สูงขึ้นในบางช่วงเวลา ของคราบเลือดที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง และที่ 4°C



ภาพที่ 11 ความสัมพันธ์ระหว่างอายุของคราบเลือดกับอัตราส่วนพื้นที่ฟีกของ X ต่อพื้นที่ฟีกของฮีม จากคราบเลือดที่เก็บไว้ภายใต้แสงฟลูออเรสเซนต์(a,b) และในที่มืด(c,d) ที่อุณหภูมิ 37°C องศาเซลเซียส ที่อุณหภูมิห้อง และที่ 4°C องศาเซลเซียส เป็นเวลา 52 สัปดาห์

ที่มา : Hiroyuki Inoue et al., "A New Marker for Estimation of Bloodstain Age by High Performance Liquid Chromatography." *Forensic Sci. Int* 57 (August 1992) : 25.

Andrasko and Rosen (1994) ได้รายงานการใช้ HPLC ในการวิเคราะห์ฮีโมโกลบินในคราบเลือด ด้วย reversed phase large pore columns (5 μm particle size, C_4 -phase, 300 \AA pore size) โดยใช้วิเคราะห์สารสกัดจากคราบเลือดของสิ่งมีชีวิตสปีชีส์ต่างๆ สำหรับคราบเลือดของมนุษย์นั้น ดำเนินการโดยเก็บตัวอย่างเลือดจากเส้นเลือดดำของผู้ใหญ่ ตัวอย่างเลือดเหล่านี้ถูกแช่แข็งและเก็บรักษาไว้ที่ -67°C สำหรับใช้หลายๆ ปี คราบเลือดตัวอย่างได้มาโดยหยดเลือดสด หรือเลือดที่ทำให้ละลายจากการแช่แข็งแล้วลงบนกระดาษกรอง (Munktell No. 3) และทำให้แห้งโดยทิ้งไว้ข้ามคืน

ชิ้นของคราบเลือดที่มีเลือดติดอยู่ประมาณ 4 μl ถูกตัดออกจากกระดาษกรองและแช่ในน้ำกลั่น 200 μl นาน 15 min ที่อุณหภูมิ 37°C แบ่งมา 10 μl (เทียบได้กับเลือดสดประมาณ 0.2 μl) สำหรับทำการวิเคราะห์

เครื่อง HPLC

เครื่อง HPLC ที่ใช้เป็นเครื่อง Varian model 5000 liquid chromatography ประกอบด้วย

1. ตัวตรวจวัด

1.1 แบบ variable wavelength detector (model 100) โดยตั้งค่าความยาวคลื่นที่ 220 nm

1.2 แบบ fixed wavelength detector (Water Model 440) โดยตั้งค่าความยาวคลื่นที่ 254 nm

1.3 Perkin Elmer fluorescence detector (LC 240) ทำงานที่ excitation wavelength 275 nm และ emission wavelength ที่ 345 nm

2. เชื่อมต่อกับ Hewlett Packard HP 3396 A integrator

3. สัญญาณจาก UV-VIS detector แสดงผลและบันทึกผลด้วย Omega Data system จาก Perkin Elmer

สถานะที่ใช้

ใช้คอลัมน์สองชนิดในการวิเคราะห์ ได้แก่ Supercosil LC-304 (4.6 x 250 mm, 5 μm particle size, 300 \AA pore size, Lebkemi AB) และ Vydac 414TP54 (4.6 x 250 mm, 5 μm particle size, 300 \AA pore size, Scandinaviska GeneTec AB) คอลัมน์ทั้งสองเป็น large pore C_4 -column และ guard columns ใช้ Supelguard ขนาด 2 cm. ภายในบรรจุ Supelcosil LC-304 ขนาด 5 μm โดยใช้เหมือนกันทั้งสองคอลัมน์

ตัวทำละลายประกอบด้วย

Solvent A สารผสมระหว่าง 0.1% TFA ในน้ำ กับ 0.1% TFA ใน acetonitrile ด้วยอัตราส่วน 80:20

Solvent B สารผสมระหว่าง 0.1% TFA ในน้ำ กับ 0.1% TFA ใน acetonitrile ด้วยอัตราส่วน 40:60

สำหรับ Supercosil column ทำการวิเคราะห์ด้วยระบบ gradient เฟสเคลื่อนที่ผสมกันระหว่าง Solvent A กับ Solvent B โดยปรับสภาวะดังนี้

40% B ในเวลาที่ 0

50% B ในเวลาที่ 30

55% B ในเวลาที่ 60

และ 70% B ในเวลาที่ 90

สำหรับ Vydac column ทำการวิเคราะห์ด้วยระบบ gradient เฟสเคลื่อนที่ผสมกันระหว่าง Solvent A กับ Solvent B โดยปรับสภาวะดังนี้

43% B ในเวลาที่ 0

53% B ในเวลาที่ 30

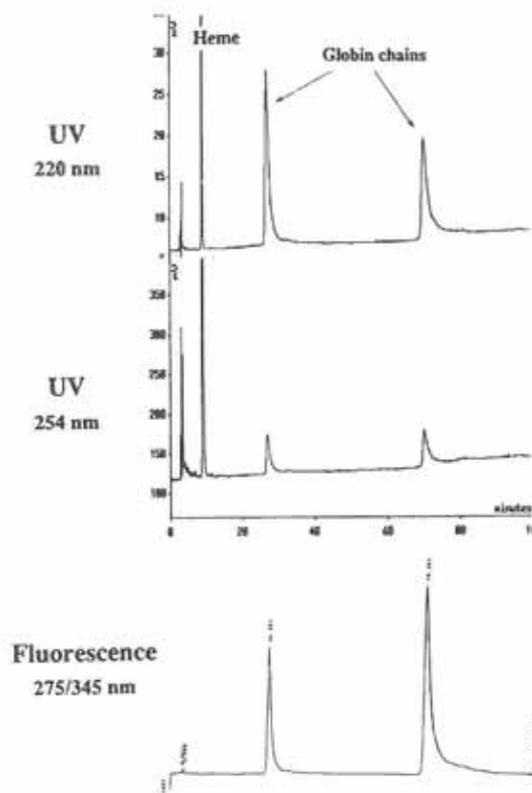
63% B ในเวลาที่ 60

และ 70% B ในเวลาที่ 70

หลังจากเสร็จสิ้นแต่ละครั้ง ระบบกลับมาที่สภาวะเริ่มต้นใน 5 min และคงอยู่ในสภาวะเริ่มต้นนี้ 10 min อุณหภูมิตามสภาวะแวดล้อม flow rate 1.0 ml/min

ผลการศึกษาพบว่า โครมาโตกราฟีสามารถแยกฮีโมโกลบินออกได้หลายพีคจากสารสกัดจากคราบเลือด และพีคหลักที่ตรวจพบที่ความยาวคลื่นสั้น ได้แก่ heme และ globin chain พีคของ heme สามารถตรวจพบได้ที่ retention time เดียวกันในทุกๆ สปีชีส์ และสามารถบ่งบอกได้ว่าคราบที่พบเป็นเลือดอย่างแท้จริง

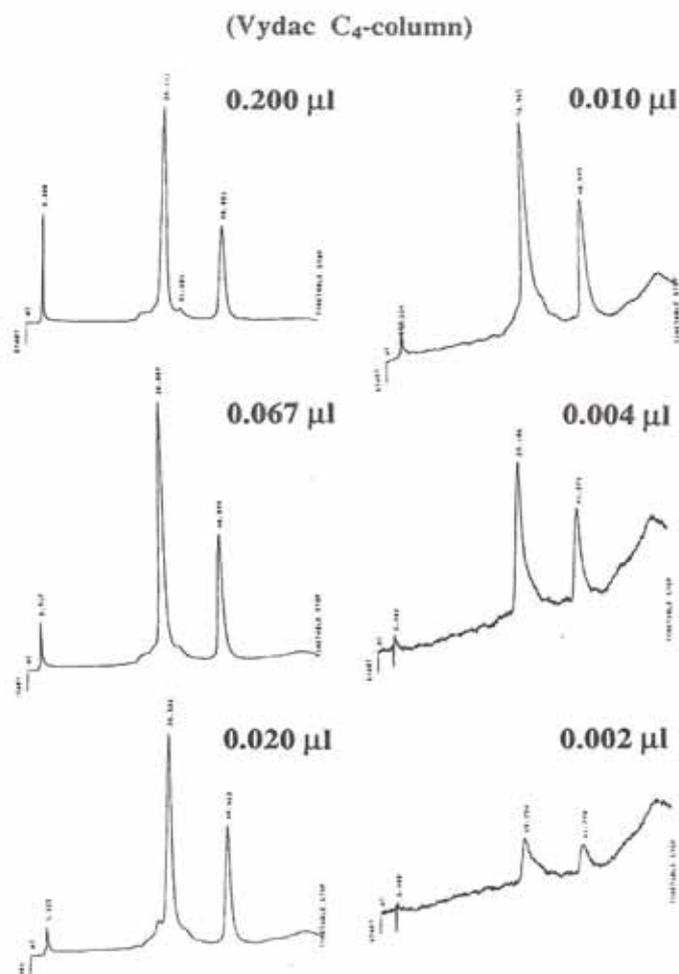
ภาพที่ 12 เป็นโครมาโตแกรมที่แสดงการแยกของสายโซ่โกลบิน (globin chain) ของกวาง จากสารตัวอย่างที่สกัดจากคราบเลือดบนกระดาษกรอง โดยใช้ Supercosil C₄ column ทำการวิเคราะห์ด้วยระบบ gradient ปริมาณตัวอย่างประมาณ 0.2 µl โครมาโตแกรมทั้งสามตรวจวัดที่ 220 nm 254 nm และ fluorescence detector (excitation wavelength 275 nm และ emission wavelength ที่ 345 nm) โดยที่พีคของ heme ไม่สามารถตรวจพบได้โดย fluorescence detector



ภาพที่ 12 การแยกของสายโซ่โกลบิน (globin chain) ของกวาง จากสารตัวอย่างที่สกัดจากคราบเลือดบนกระดาดยกรอง

ที่มา : Jan Andrasko and Bjorn Rosen, "Sensitive Identification of Hemoglobin in Bloodstains from Different Species by Highperformance Liquid Chromatography with Combined UV and Fluorescence Detection." *J. Forensic Sci* 39,4 (July 1994) : 1020.

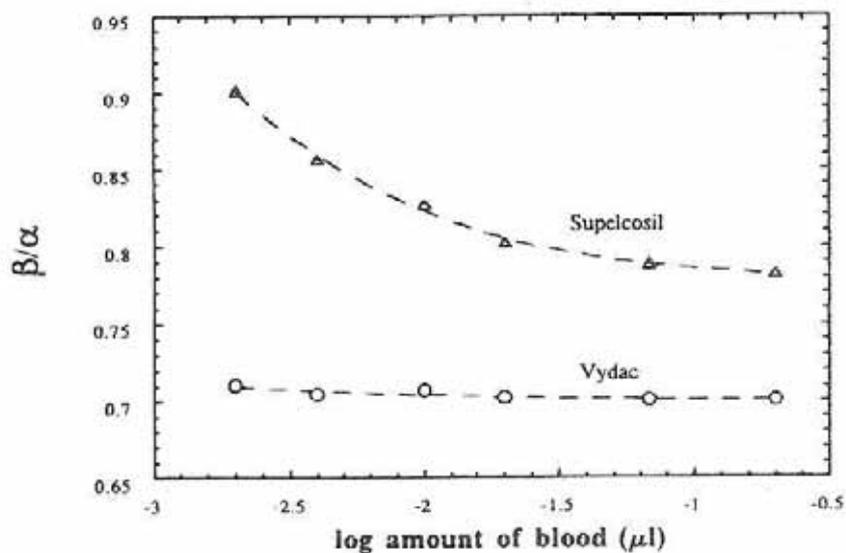
ภาพที่ 13 เป็นโครมาโตแกรมที่ได้จากการวิเคราะห์เลือดของมนุษย์ปริมาณต่างๆ ตั้งแต่ 0.2 μl ถึง 0.002 μl โดยตรวจวัดด้วย fluorescence detector ใช้ Vydac C_4 column พบว่า retention time ของ globin peak เพิ่มขึ้นเล็กน้อยที่ความเข้มข้นต่ำๆ โดยพีคแรกที่ถูกชะออกมาคือ β -globin และพีคที่สองคือ α -globin เหมือนกันกับที่ตรวจวัดด้วย UV detector จะเห็นได้ว่าพีคของ β - และ α -globin ลดลงอย่างเป็นเชิงเส้นจนถึง 0.004 μl ค่า detection limit อยู่ที่ประมาณ 0.001-0.002 μl ปริมาณที่ต่ำกว่านี้ อาจเกิดการสูญเสียในคอลัมน์



ภาพที่ 13 เลือดของมนุษย์ปริมาณต่างๆ ที่ตรวจวัดด้วย fluorescence detector

ที่มา : Jan Andrasko and Bjorn Rosen, "Sensitive Identification of Hemoglobin in Bloodstains from Different Species by Highperformance Liquid Chromatography with Combined UV and Fluorescence Detection." *J. Forensic Sci* 39,4 (July 1994) : 1022.

จากภาพที่ 13 แสดงให้เห็นว่าโครมาโตแกรมที่ได้จาก Vydac column มีคุณภาพที่ดีกว่าที่ได้จาก Supercosil column เมื่อฉีดสารในปริมาณน้อยมากๆ กับ Supercosil column ค่า retention time ของ globin peak (โดยเฉพาะ β -globin)เพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัดเมื่อปริมาณเลือดที่ฉีดลดลง β -globin peak จะขยายกว้างและการแยกระหว่าง globin peak ลดลงเมื่อความเข้มข้นลดลง ผลกระทบนี้จะลดปัญหาหลงมากเมื่อใช้ Vydac column



ภาพที่ 14 เปรียบเทียบระหว่าง Supercosil และ Vydac large pore column

ที่มา : Jan Andrasko and Bjorn Rosen, "Sensitive Identification of Hemoglobin in Bloodstains from Different Species by Highperformance Liquid Chromatography with Combined UV and Fluorescence Detection." *J. Forensic Sci* 39,4 (July 1994) : 1023.

จากภาพเป็นการเปรียบเทียบระหว่าง Supercosil และ Vydac large pore column ในการวิเคราะห์สารสกัดจากคราบเลือดมนุษย์ ในปริมาณเท่าๆกัน ในช่วงระหว่าง 0.002-0.2 μl แสดงให้เห็นการเปลี่ยนแปลง ของอัตราส่วนระหว่าง retention time ของ globin peak (β/α) ตามปริมาณเลือด การเปลี่ยนแปลงนี้เกิดขึ้นน้อยมากสำหรับ Vydac column ซึ่งศึกษาในช่วงความเข้มข้นเดียวกัน

Andrasko (1997) รายงานการใช้ HPLC ศึกษาสารสามชนิด ที่เกิดขึ้นจากการเสื่อมสภาพของฮีโมโกลบิน เรียกว่า "X" "Y" และ "Z" โดยศึกษาที่อุณหภูมิ 0 °C อุณหภูมิห้อง (22-23 °C) และที่ 37 °C พบว่าสามารถใช้บอกอายุของคราบเลือดบนผ้า (cotton) ได้เมื่อทราบอุณหภูมิที่คราบเลือดถูกเก็บไว้

Andrasko ทำการศึกษาตัวอย่างคราบเลือดที่ได้จากการหยดเลือดลงบนผ้า cotton และบางการทดลองทำบนกระดาษกรอง คราบเลือดถูกทำให้แห้งที่อุณหภูมิที่เก็บตัวอย่าง โดยตัวอย่างจะถูกเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 0 °C อุณหภูมิห้อง (22-23 °C) และ 37 °C สำหรับทำการวิเคราะห์ด้วย HPLC คราบเลือดถูกตัดเป็นชิ้นเล็กๆ (ประมาณ 2 x 2 mm) แช่ในน้ำปราศจากไอออน 100 μl ที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 20 min แบ่งมา 10 μl สำหรับวิเคราะห์โดย HPLC ด้วยระบบที่แตกต่างกัน 2 ระบบ คือ

ระบบ A ทำการทดลองโดยใช้เครื่อง HPLC ของ Varian รุ่น 500 Liquid Chromatograph สภาวะที่ใช้คือ

1. ตัวตรวจวัด

1.1 แบบ variable wavelength detector (model 100) โดยตั้งค่าความยาวคลื่นที่ 220 nm

1.2 แบบ fixed wavelength detector (Water Model 440) โดยตั้งค่าความยาวคลื่นที่ 254 nm

2. คอลัมน์ ใช้ “protein” column – Vydac 214TP54 (250 by 4.6 mm ID 5 μ m particle size, 300 \AA pore size, Scandinaviska GeneTech)

3. Guard column ใช้ 2-cm Supelguard column with 5 μ m Supelcosil LC-304 packing

4. ตัวทำละลายประกอบด้วย

4.1 Solvent A - 95/5 acetonitrile/water กับ 0.1% TFA

4.2 Solvent B - 40/60 acetonitrile/water กับ 0.1% TFA

ทำการวิเคราะห์ด้วยระบบ gradient โดยปรับสภาวะดังนี้ 10-65% Solvent B ใน 0-30 นาที และ 65-75% Solvent B ใน 30-60 นาที flow rate 0.7 ml/min ทำการทดลองที่อุณหภูมิห้อง บันทึกสัญญาณจาก UV-detector ด้วย Omega data system จากบริษัท Perkin Elmer

ระบบ B ทำการทดลองโดยใช้เครื่อง HPLC ของ Hewlett Packard series II 1090 Liquid Chromatograph เชื่อมต่อกับ HP's HPLC^{3D} ChemStation สภาวะที่ใช้คือ

ตัวตรวจวัด ใช้ diode array detector ของ Hewlett Packard ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 220 nm 254 nm และ 395 nm

คอลัมน์ ใช้ 25 cm 5 μ m TSK gel ODS-120T (4.6 mm ID, Tosohaas Bioseparation Specialists) stainless steel

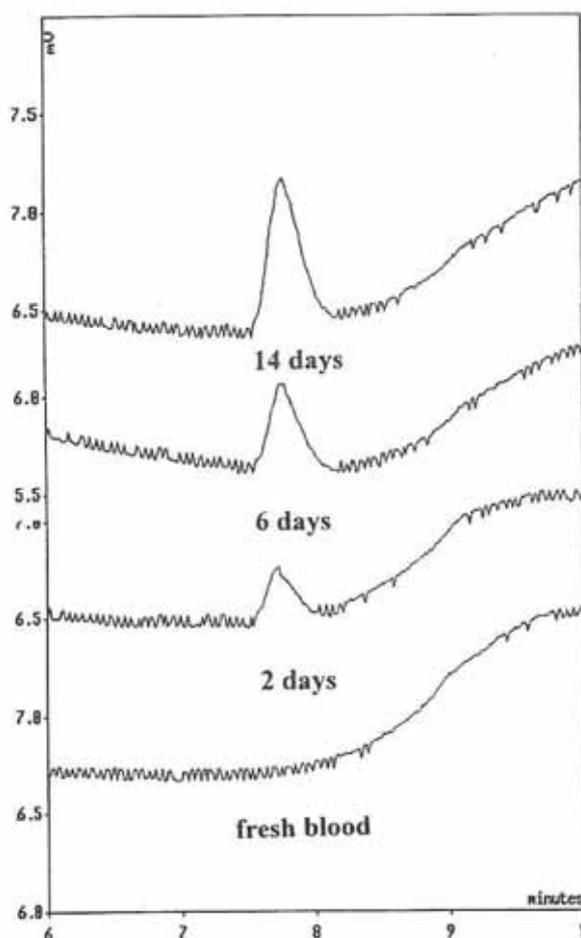
ตัวทำละลายประกอบด้วย

Solvent A - 30/70 acetonitrile/water กับ 10 mM KClO_4 ปรับ pH ให้เป็น 3.0 ด้วย perchloric acid

Solvent B - 100% acetonitrile

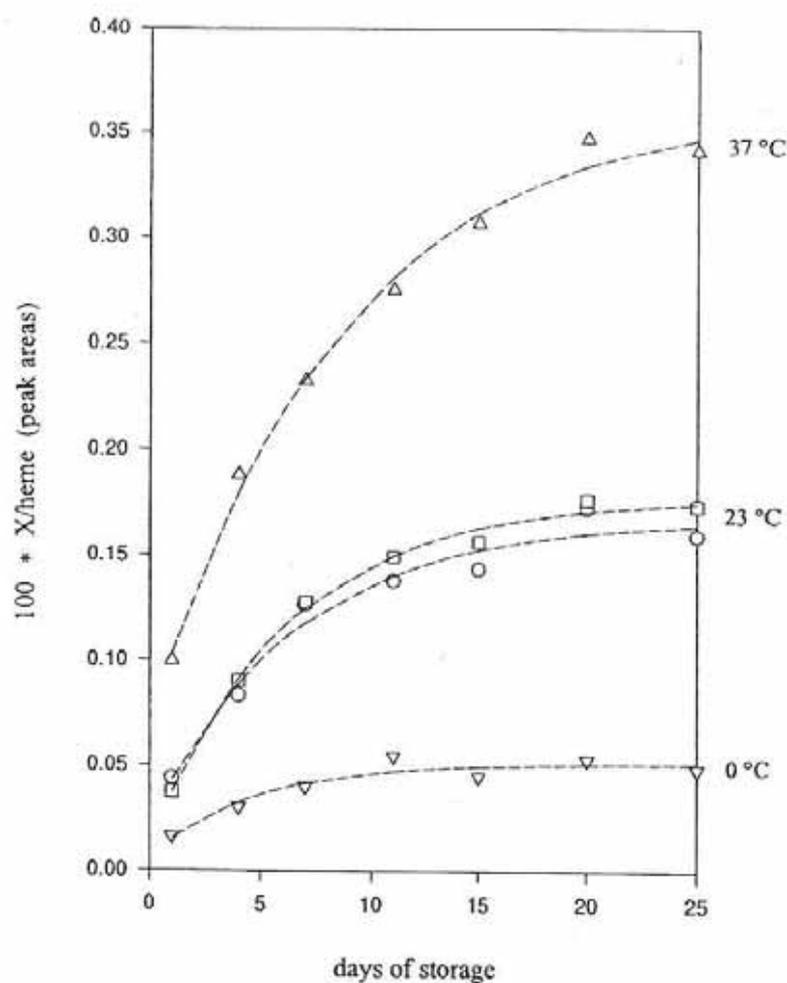
ทำการวิเคราะห์ด้วยระบบ gradient โดยเริ่มต้นจาก 100% Solvent A แล้วปรับให้เป็น 100% Solvent B ใน 30 นาที flow rate 0.8 ml/min ทำการทดลองที่อุณหภูมิห้อง

พบว่า การทดลองใน ระบบ A มีประโยชน์ในการแยกและตรวจวัดพีคที่มีความสัมพันธ์กับ heme และสายโซ่ α - β globin จากฮีโมโกลบินของมนุษย์ ในโครมาโตแกรมของสารสกัดจากคราบเลือด มีอยู่หนึ่งพีคที่ retention time ประมาณ 7 min ถูกตรวจวัดได้ที่ความยาวคลื่น 220 nm ซึ่งพีคนี้ไม่สังเกตพบในสารสกัดจากเลือดสด และเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ตามระยะเวลาที่เก็บคราบเลือด ซึ่งแสดงให้เห็นในภาพที่ 15 พีคนี้ตั้งชื่อว่า “X” สอดคล้องกับที่มีรายงานจากการสังเกตของ Inoue และคณะ (Inoue และคณะ, 1992) ค่าการเพิ่มขึ้นของพีค X ตามระยะเวลาในการเก็บ ได้ทำการวิเคราะห์ที่อุณหภูมิแตกต่างกัน 3 อุณหภูมิ คือ ที่ 0°C อุณหภูมิห้อง (22-23°C) และ 37°C โดยคราบเลือดถูกทำให้แห้งโดยปล่อยให้แห้งที่อุณหภูมิที่เก็บตัวอย่าง



ภาพที่ 15 การปรากฏของพีค X ที่ตรวจวัดได้โดย HPLC วิเคราะห์ด้วย ระบบ A ที่ 220 nm
ที่มา : Jan Andrasko, “The estimation age of bloodstains by HPLC analysis.” *J. Forensic Sci* 42,
4 (July 1997) : 602.

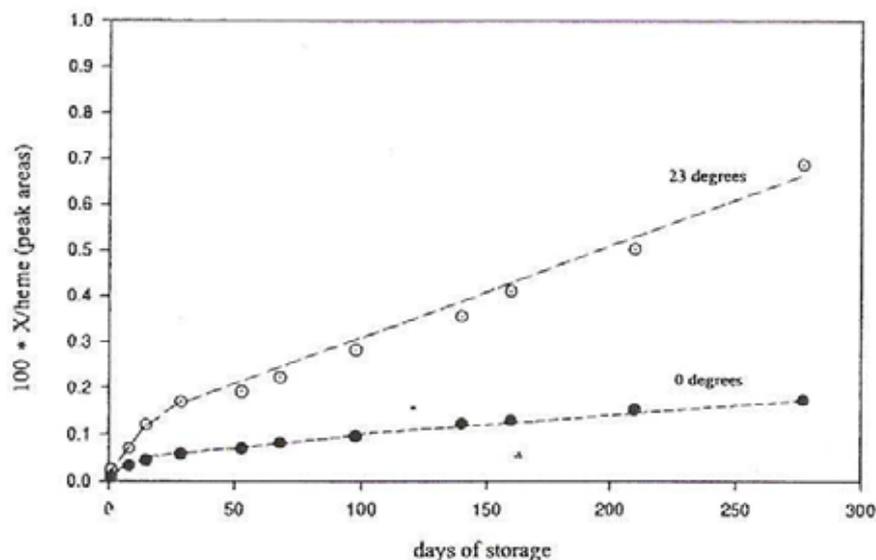
อัตราส่วนระหว่างพื้นที่พีคของ X (ตรวจวัดที่ 220 nm) ต่อพื้นที่พีคของ heme (ตรวจวัดที่ 254 nm) ที่เปลี่ยนแปลงไปตามระยะเวลา ของคราบเลือดที่ถูกเก็บไว้นานขึ้นเรื่อยเป็นระยะเวลาหนึ่งเดือน พื้นที่พีคของ X เพิ่มขึ้นอย่างไม่เป็นเชิงเส้น และสามารถประมาณค่าได้จากสมการ exponential ($Y = a \times (1 - \exp(-b/t))$, เมื่อ t เป็นเวลา a และ b เป็นค่าคงที่) ไม่พบว่ามี ความแตกต่างกันของพื้นที่พีคทั้งคราบเลือดที่อยู่บนผ้าและบนกระดาษกรอง ดังที่แสดงในภาพที่ 16 (ภาพที่ 16 มีสอง curves ถูกบันทึกที่อุณหภูมิห้อง) โดยตัวอย่างที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องที่ถูกบันทึกไว้เป็นคราบเลือดบนผ้า cotton (○) และบนกระดาษกรอง (□)



ภาพที่ 16 การเพิ่มขึ้นของอัตราส่วนระหว่างพีค X (ตรวจวัดที่ 220 nm) กับพีค heme (ตรวจวัดที่ 254 nm) โดย HPLC ระบบ A

ที่มา : Jan Andrasko, "The estimation age of bloodstains by HPLC analysis." *J. Forensic Sci* 42, 4 (July 1997) : 603.

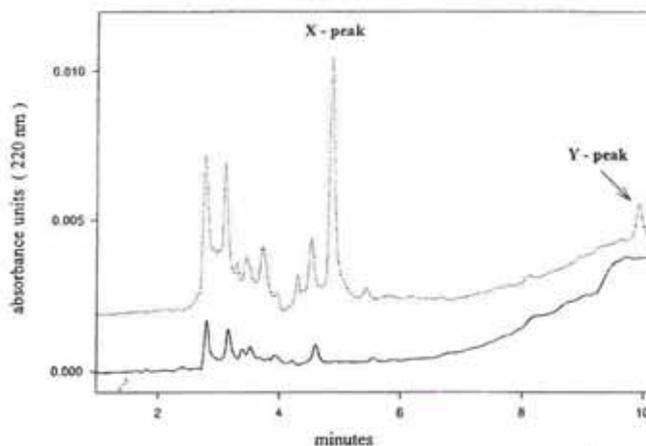
การเปลี่ยนแปลงของอัตราส่วนระหว่าง X/heme สำหรับคราบเลือดที่เก็บไว้ช่วงเวลาที่นานขึ้น หลังจากค่าที่ได้เพิ่มขึ้นอย่างไม่เป็นเชิงเส้นในประมาณ 30 วันแรก อัตราส่วนเริ่มเพิ่มขึ้นอย่างเป็นเชิงเส้นเมื่อเพิ่มระยะเวลาในการเก็บตัวอย่างไว้นานขึ้น



ภาพที่ 17 ความสัมพันธ์ระหว่าง พีค X กับ heme-peak (254 nm) สำหรับคราบเลือดที่เก็บไว้ที่ 23°C และ 0°C เมื่อเพิ่มระยะเวลาในการเก็บเป็นเกือบ 1 ปี

ที่มา : Jan Andrasko, "The estimation age of bloodstains by HPLC analysis." *J. Forensic Sci* 42, 4 (July 1997) : 603.

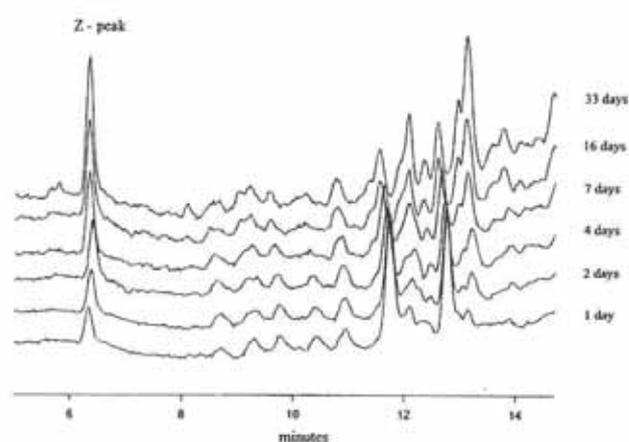
ผลการทำโครมาโตกราฟีใน ระบบ B โดยใช้ reversed phase C_{18} column โครมาโตแกรมที่ได้จากคราบเลือดที่สกัดด้วยน้ำ พบว่าบางพีคลดลงขณะที่บางพีคเพิ่มขึ้นตามอายุของคราบเลือด ในจำนวนพีคที่เพิ่มขึ้นมีหลายพีคที่สามารถใช้ประมาณอายุของคราบเลือดได้ ในการศึกษานี้ได้ติดตามพีคสามพีค ชื่อว่า "X" "Y" และ "Z" พีคเหล่านี้ไม่พบในตัวอย่างที่สกัดจากเลือดสด และเพิ่มขึ้นตามอายุของคราบเลือด



ภาพที่ 18 การปรากฏของพีค X และ Y ตรวจวัดที่ 220nm

ที่มา : Jan Andrasko, “The estimation age of bloodstains by HPLC analysis.” *J. Forensic Sci* 42, 4 (July 1997) : 603.

ภาพที่ 18 แสดงให้เห็นส่วนต้นๆ ของโครมาโตแกรมที่ตรวจวัดได้ที่ 220 nm สำหรับสารสกัดได้ได้จากเลือดสดและจากคราบเลือด ซึ่งเก็บไว้ที่ 37°C เป็นเวลา 20 วัน พีคที่สังเกตพบตามลำดับดังนี้ ที่ 4.9 min คือ พีค X พีค Y ที่ retention time 9.9 min (เส้นประ) เปรียบเทียบกับการวิเคราะห์จากเลือดสด (เส้นหนา) ส่วนพีค Z ไม่ได้ทำการตรวจวัดที่ความยาวคลื่นนี้เนื่องจากปกติจะตรวจวัดที่ 395 nm ซึ่งพบที่ retention time 6.3 min (ภาพที่ 19)

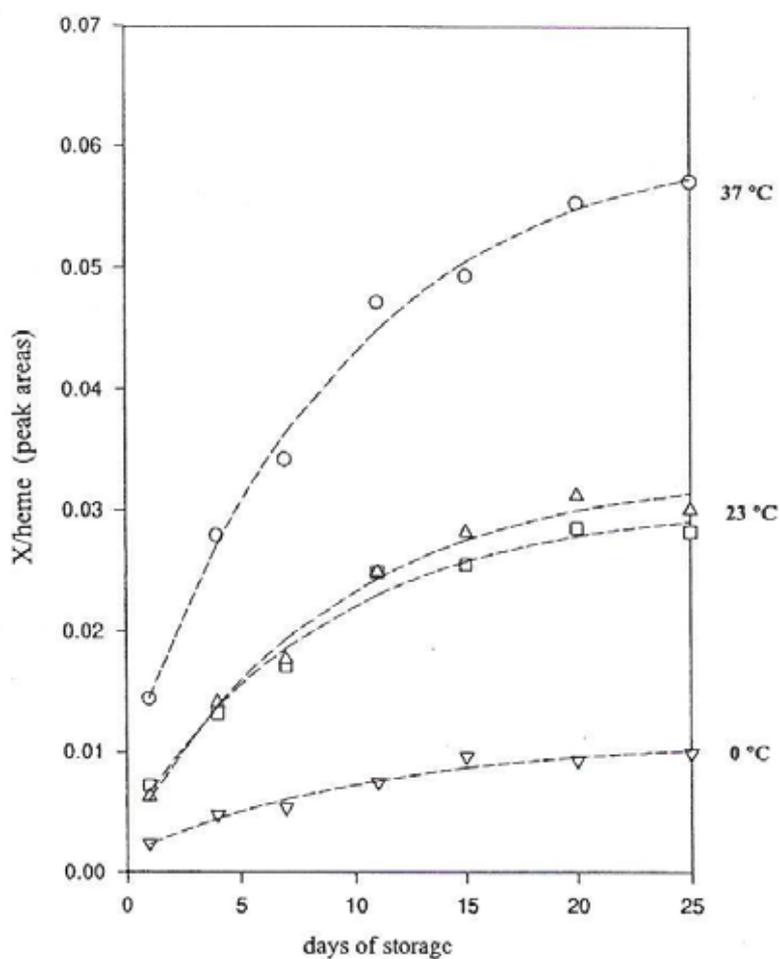


ภาพที่ 19 การปรากฏของพีค Z ตรวจวัดโดย HPLC ระบบ B ที่ 395 nm จากคราบเลือดบนผ้าที่ 37°C ที่ระยะเวลาต่างๆ

ที่มา : Jan Andrasko, “The estimation age of bloodstains by HPLC analysis.” *J. Forensic Sci* 42, 4 (July 1997) : 603.

การวิเคราะห์ใน ระบบ B สามารถตรวจวัดได้ทั้งพีคของ α และ β -globin จาก ฮีโมโกลบินของมนุษย์ ซึ่งถูกชะออกมาที่เวลา 15 และ 16 min (ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 220 nm) และพีคของ heme ถูกชะออกมาที่เวลา 19.5 min (ตรวจวัดได้ทั้งสามความยาวคลื่น ความยาวคลื่นสูงสุดที่วัดได้คือ 395 nm)

ภาพที่ 20 แสดงการเปลี่ยนแปลงของอัตราส่วนระหว่าง X/heme สำหรับคราบเลือดที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 0°C อุณหภูมิห้อง และ 37°C ผลที่ได้จากตัวอย่างที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องที่ถูกบันทึกไว้เป็นคราบเลือดบนผ้า cotton และบนกระดาษกรอง ตามลำดับ และไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญระหว่างคราบเลือดทั้งสองชนิด

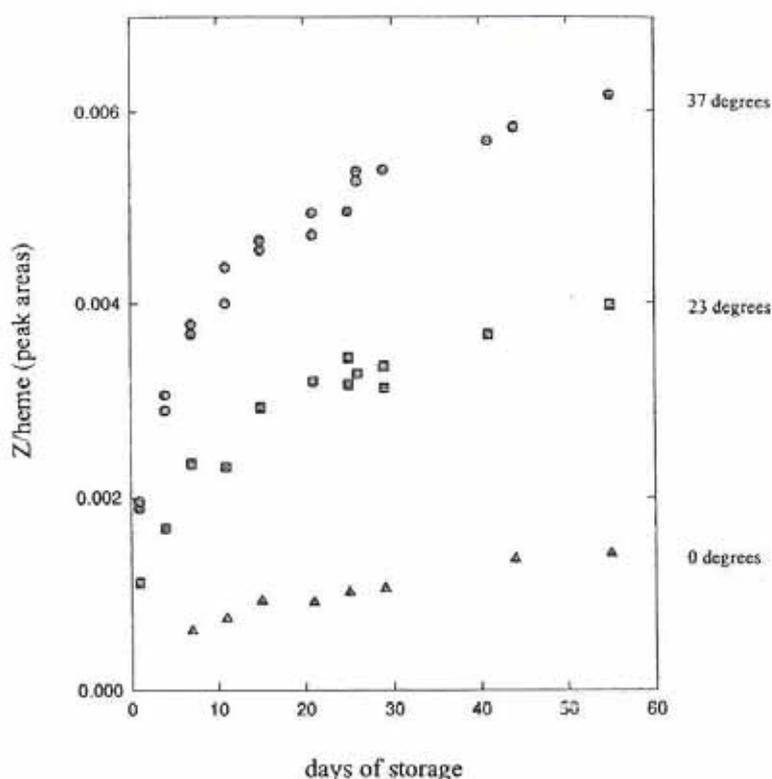


ภาพที่ 20 การเพิ่มขึ้นของพีค X/heme-peak ตามระยะเวลา ที่ตรวจวัด โดย ระบบ B จากคราบเลือดบนผ้าที่อุณหภูมิต่างๆ โดยตัวอย่างที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องที่ถูกบันทึกไว้เป็นคราบเลือดบนผ้า cotton (\square) และบนกระดาษกรอง (Δ)

ที่มา : Jan Andrasko, "The estimation age of bloodstains by HPLC analysis." *J. Forensic Sci* 42, 4 (July 1997) : 605.

อัตราส่วนของ Z/heme ซึ่งได้มาจากตัวอย่างเดียวกันกับที่ได้บรรยายไว้แล้วในภาพที่ 20 พืชนี้จะเกิดขึ้นน้อยมากในช่วงวันแรกๆ ของการเก็บและไม่สามารถตรวจวัดได้สำหรับตัวอย่างที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 0°C ทั้งภาพที่ 18 และ 19 มีลักษณะที่คล้ายกันกับภาพที่ 16 และ 17 (ระบบ A) กล่าวคือ มีการเพิ่มปริมาณอย่างรวดเร็วของผลิตภัณฑ์จากการสลายตัวในช่วงวันแรกๆ ของการเก็บ หลังจากนั้นการเพิ่มปริมาณเริ่มช้าลงและค่อนข้างเป็นเส้นตรง

การเพิ่มขึ้นของพืช X ในคราบเลือดที่เก็บไว้เป็นเวลาหนึ่งปีได้ทำการศึกษาโดย ระบบ B ได้ผล (เส้นกราฟที่แสดงอายุ) ทำนองเดียวกันกับที่ศึกษาโดย ระบบ A ซึ่งความแตกต่างของค่า peak ratio ระหว่างภาพที่ 16 และ 20 ขึ้นอยู่กับความจริงที่ว่า ระบบ A ใช้ตัวตรวจวัดที่แตกต่างกันสองชนิด ส่วนค่าที่ได้ในภาพที่ 20 ได้จาก diode array detector เพียงอย่างเดียว เพราะฉะนั้นจึงมีความถูกต้องเนื่องจากการใช้เครื่องมือ



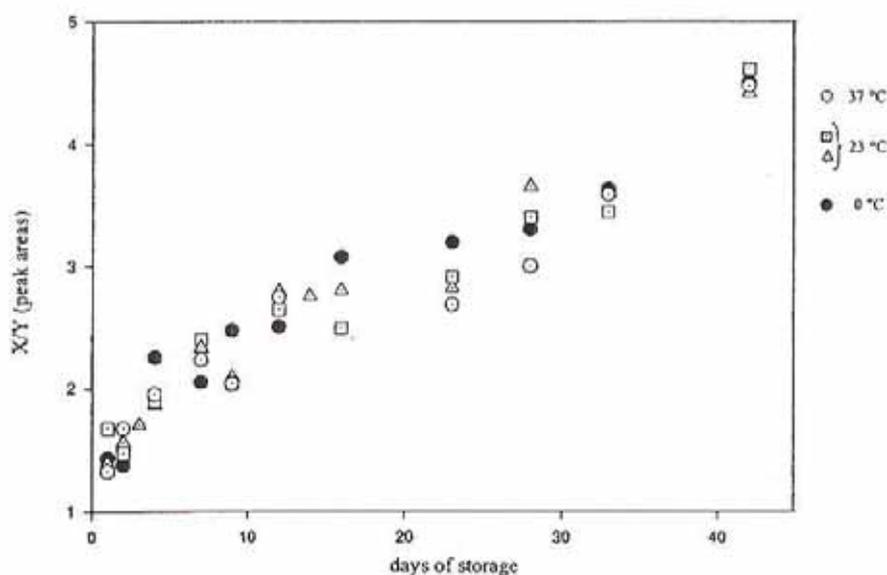
ภาพที่ 21 ความสัมพันธ์ระหว่างพืช Z (ตรวจวัดที่ 395 nm) กับ heme-peak (ตรวจวัดที่ 254 nm) ของคราบเลือดบนผ้าซึ่งเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่างๆ

ที่มา : Jan Andrasko, "The estimation age of bloodstains by HPLC analysis." *J. Forensic Sci* 42, 4 (July 1997) : 605.

ในบางการทดลอง คราบเลือดที่ถูกทำให้แห้งที่อุณหภูมิหนึ่งและภายหลังถูกนำไปเก็บไว้ที่อีกอุณหภูมิหนึ่งซึ่งต่างกัน เช่น คราบเลือดที่ถูกทำให้แห้งที่อุณหภูมิ 37°C (ประมาณ 1.5 ชั่วโมง) แล้วนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่ำกว่า ค่าที่ได้จากการทดลองจะมีความคลาดเคลื่อน

การเพิ่มขึ้นของพีค X Y และ Z ขึ้นอยู่กับอุณหภูมิ เชื่อว่าพื้นที่พีคของพีค X ซึ่งเก็บไว้ที่ 37°C มีขนาดมากกว่าที่ 0°C ประมาณ 6 เท่า สำหรับพีค Z ความแตกต่างน้อยกว่านั้น พื้นที่พีคที่ 37°C มีขนาดมากกว่าที่ 0°C ประมาณ 4 เท่า ถ้าหากรู้อุณหภูมิเฉลี่ยที่ตัวอย่างถูกเก็บไว้ ภาพที่ 20 และ 21 สามารถใช้ประมาณอายุของคราบเลือดได้โดยการเทียบกับกราฟ อัตราส่วนระหว่างพีคเดียวกันที่วัดที่อุณหภูมิต่างๆ ดูเหมือนไม่เปลี่ยนแปลงไปมากกับระยะเวลาในการเก็บ

ความพยายามที่จะปรับข้อมูลที่ได้เพื่อลดอิทธิพลจากอุณหภูมิ ขบวนการสลายตัวที่ทำให้เกิดพีคต่างๆ อาจจะไม่เกี่ยวข้องซึ่งกันและกัน และอาจเป็นไปได้ว่าสามารถใช้อัตราส่วนของพีคเหล่านี้ประมาณอายุอย่างหยาบๆ ของคราบเลือดได้หากรู้อุณหภูมิที่ตัวอย่างถูกเก็บไว้ แม้ว่าพีค X และ Z จะเพิ่มขึ้นตามอายุของคราบเลือดเป็นช่วงเวลาที่ยาวนาน แต่พีค Y แสดงพฤติกรรมที่แตกต่างกัน พีคนี้เกิดขึ้นเพียงช่วงสั้นๆ ของการเก็บ (1-2 วัน) หลังจากนั้นจะคงอยู่ยาวนานเป็นเวลานานโดยไม่มีการเปลี่ยนแปลง โดยที่พื้นที่พีคขึ้นอยู่กับอุณหภูมิที่ถูกเก็บไว้ และสามารถใช้เป็น temperature indicator ได้หนทางหนึ่ง

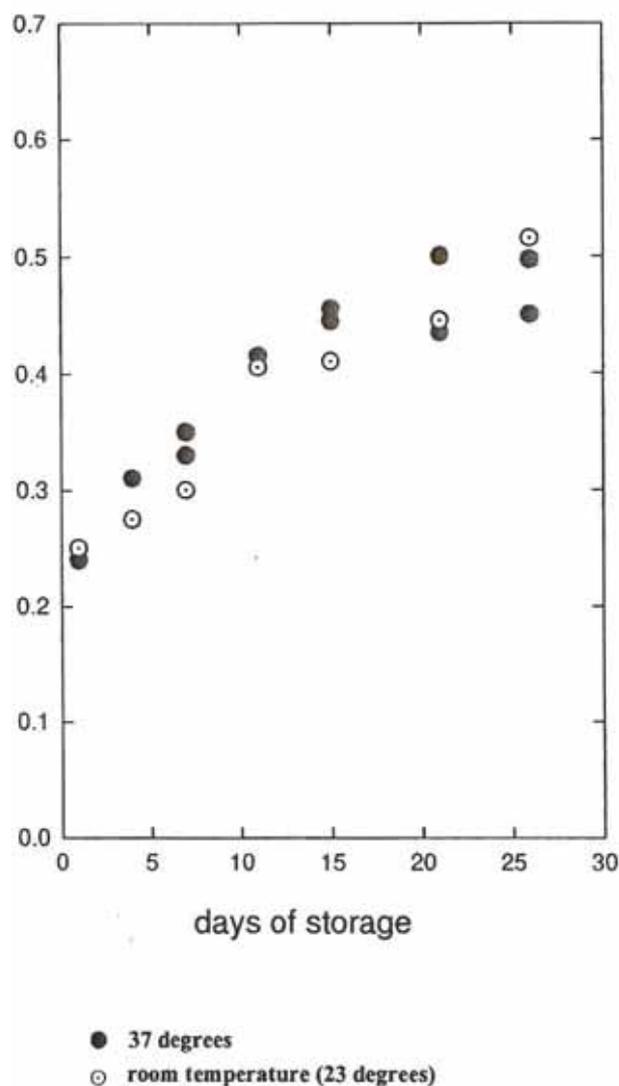


ภาพที่ 22 อัตราส่วนพื้นที่พีคของพีค X ต่อ Y จากคราบเลือดบนผ้าที่เก็บไว้ที่สามอุณหภูมิระหว่าง 0°C และ 37°C

ที่มา : Jan Andrasko, "The estimation age of bloodstains by HPLC analysis." *J. Forensic Sci* 42, 4 (July 1997) : 605.

การคำนวณอัตราส่วนพื้นที่พีคระหว่าง X/Y และ Z/Y จากผลการทดลองที่ได้จาก ระบบ B ที่สามอุณหภูมิแตกต่างกัน อัตราส่วนทั้งสองเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาที่เก็บ ภาพที่ 22 และ 23 แสดง ค่าอัตราส่วน X/Y และ Z/Y โดยผลการทดลองได้จากสารสกัดจากตัวอย่างเลือดตัวอย่างเดียว ความแม่นยำสามารถตรวจสอบโดยหาผลเฉลี่ยจากการฉีดตัวอย่างเดิมซ้ำๆ

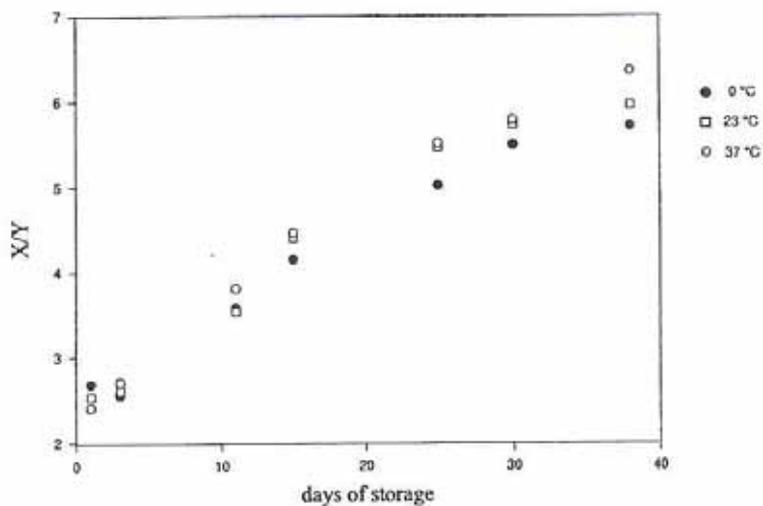
พีคที่เกิดขึ้นจากการสลายตัวของเลือดทั้ง X Y และ Z มีขนาดเล็กมากเมื่อเทียบกับพีคของ heme ซึ่งสามารถสังเกตได้จากมาตราส่วนของแกน Y (Y-axis) (ดูภาพที่ 20 และ 21) ความคลาดเคลื่อนที่เกิดขึ้นจากการทดลอง ในการประมาณค่า peak ratio มีค่อนข้างมาก นี่คือน่าสนใจที่สำคัญอย่างยิ่งต่อผลที่แสดงในภาพที่ 22 และ 23 เมื่ออัตราส่วนระหว่างพีคเล็กๆ สองพีคถูกนำมาคำนวณ การฉีดซ้ำของตัวอย่างเดียวกันให้ผลที่ต่างกันถึง 20% เพื่อที่จะปรับปรุงการตรวจวัดปริมาณของ พีค X Y และ Z ให้ดีขึ้นอาจทำได้โดยการเพิ่มปริมาณในการฉีดสารตัวอย่าง อย่างไรก็ตามยังมีขีดจำกัดในปริมาณสารตัวอย่าง (limitation in sample size) เนื่องจากธรรมชาติของสารตัวอย่าง ซึ่งฮีโมโกลบินหรือโปรตีนอื่นๆ ในปริมาณสูงอาจมีอิทธิพลต่อความสามารถในการแยกของคอลัมน์และอาจทำให้เกิดการปนเปื้อนได้ เพื่อที่จะทำให้ความแม่นยำในการคำนวณค่าพื้นที่พีคมีมากขึ้นควรมีการวิเคราะห์ตัวอย่างเดิมซ้ำสองครั้งหรือมากกว่านั้น ได้มีการพยายามหาวิธีการทดลองอื่นๆ เพิ่มเติมเพื่อปรับปรุงค่าความแม่นยำในการประมาณค่าพื้นที่พีคให้ดีขึ้น เมทานอลถูกนำมาใช้ในการสกัดคราบเลือดแทนการใช้น้ำ ตัวอย่างจะถูกสกัดที่ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมทานอลเป็นต้นเหตุให้เกิดการเสียสภาพของโปรตีน (denaturation of protein) ซึ่งเชื่อว่าสิ่งที่แยกออกมาได้จากเลือดในปริมาณที่มากกว่านั้นจะสามารถฉีดเข้าในคอลัมน์ของ HPLC ได้ จากการทดลองพบว่าพีคของ X และ Y นั้น strong กว่าเมื่อเทียบกับการทดลองก่อนหน้านี้ ในทางกลับกันพีคของ Z และ heme นั้น weak กว่า นอกจากนี้สารตัวอย่างที่สกัดด้วยเมทานอลนั้นไม่สามารถนำมาใช้ได้เมื่อพีค X Y และ Z ต้องถูกนำมาหาความสัมพันธ์กับ heme group



ภาพที่ 23 อัตราส่วน Z/Y (peak heights) วัดค่าจากสารสกัดจากคราบเลือดบนผ้าซึ่งเก็บไว้ที่ 37°C และที่อุณหภูมิห้อง

ที่มา : Jan Andrasko, "The estimation age of bloodstains by HPLC analysis." *J. Forensic Sci* 42, 4 (July 1997) : 606.

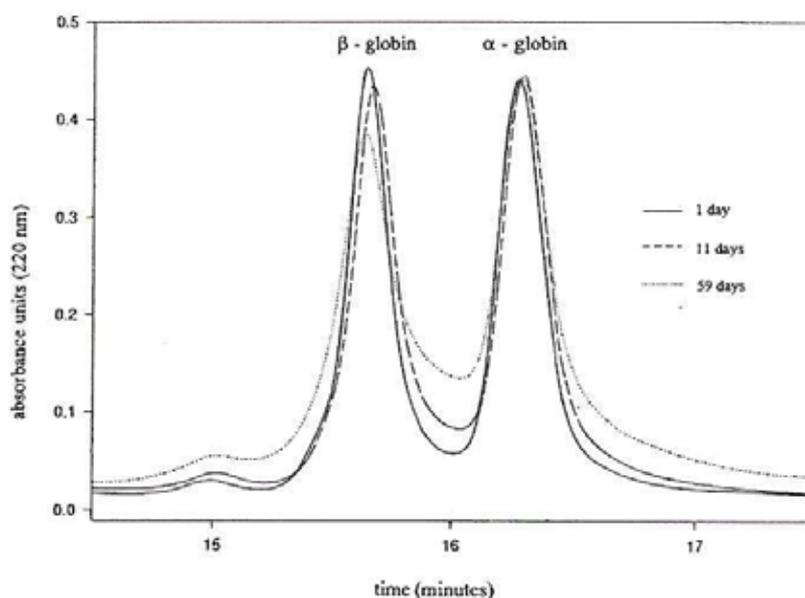
อัตราส่วนพื้นที่พีคของ X/Y ถูกคำนวณและพลอตกับระยะเวลาในการเก็บ (ภาพที่ 24) ในการสกัดด้วยน้ำนั้นอัตราส่วน X/Y เพิ่มขึ้นตามอายุของคราบเลือดและไม่ขึ้นกับการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิในช่วงที่ใช้ทำการทดลอง สำหรับการสกัดด้วยเมทานอลแม้ว่าจะมีพีคเกิดขึ้นแต่ อัตราส่วน X/Y ที่สกัดด้วยเมทานอลนั้นมีค่าสูงกว่าที่สกัดด้วยน้ำ การอธิบายที่น่าจะเป็นไปได้ก็คือ มีสารประกอบที่สังเกตพบว่าเป็นพีค Y นั้นเกิดขึ้น แต่มีปริมาณไม่มากที่สามารถสกัดได้โดยการทำ ให้เสียสภาพด้วยเมทานอล



ภาพที่ 24 อัตราส่วน X/Y วัตค่าจากสารสกัดด้วยเมทานอลจากคราบเลือดบนผ้าซึ่งเก็บไว้ที่สาม อุณหภูมิแตกต่างกัน

ที่มา : Jan Andrasko, "The estimation age of bloodstains by HPLC analysis." *J. Forensic Sci* 42, 4 (July 1997) : 606.

เป็นที่ทราบกันอยู่แล้วว่า พื้นที่พีคของ α -globin ต่อพื้นที่พีคของ heme ในโครมาโตแกรมที่ได้จากสารสกัดจากคราบเลือดนั้นลดลงอย่างทีละน้อยตามระยะเวลา ซึ่งการทดลองนี้โดยใช้ HPLC ระบบ B ก็พบปรากฏการณ์นี้เช่นเดียวกัน และนอกจากนี้ยังพบว่าความกว้างของฐานพีคของ α และ β -globin เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาที่ใช้ในการเก็บตัวอย่าง ซึ่ง globin peak แต่ละอันถูกชะออกมาใกล้กันมากขึ้น แนวทางในการบอกอายุสามารถดูได้จากความสามารถในการแยกที่ลดลงของทั้งสองพีคนี้ และจากการสูงขึ้นของตำแหน่งต่ำสุดที่อยู่ระหว่างกลางของพีคทั้งสอง (ภาพที่ 25)



ภาพที่ 25 การเปลี่ยนแปลงของพีค β - และ α - globin ตรวจวัดที่ 220 nm โดย HPLC ระบบ B
ที่มา : Jan Andrasko, “The estimation age of bloodstains by HPLC analysis.” *J. Forensic Sci* 42,
4 (July 1997) : 606.

จากที่กล่าวมาข้างต้นจะเห็นได้ว่า ปริมาณของโปรตีนในเลือดมีการเปลี่ยนแปลงตามระยะเวลาหลังจากการแห้งของเลือด ซึ่งคาดว่าการศึกษาถึงการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนในคราบเลือดที่ถูกเก็บไว้ในช่วงระยะเวลาต่างๆ น่าจะสามารถนำมาใช้ในการประมาณอายุของคราบเลือดได้จากการเปลี่ยนแปลงปริมาณของโปรตีนดังกล่าว

วิทยานิพนธ์นี้เป็นการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนของเลือดในระยะเวลาต่างๆ ที่สกัดออกมาจากคราบเลือดบนกระดาษกรอง (filter paper) คราบเลือดบนผ้าโซลอน(solon) และคราบเลือดบนผ้าเวสต์พอยท์ (westpoint) ด้วยวิธี HPLC โดยมีสมมติฐานว่าปริมาณโปรตีนในเลือดหลังการแห้งมีการเปลี่ยนแปลงไปตามระยะเวลา

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

1. วัสดุอุปกรณ์

- 1.1 เครื่อง HPLC บริษัท SHIMADZU ประเทศญี่ปุ่น
 - 1.1.1 ปัมพ์ รุ่น LC-10AD VP SHIMADZU
 - 1.1.2 System controller รุ่น SCL-10A VP
 - 1.1.3 เครื่องตรวจวัด diode array รุ่น SPD-M10A VP
 - 1.1.4 Software class-VP™ บริษัท Hewlett Packard
- 1.2 Columns Viva C4 5 μm 300A° ขนาด 250 x 4.6 mm
- 1.3 Guard Columns Trident Direct Holder ขนาด 1 cm. สำหรับ filter ขนาด 1 cm
- 1.4 Guard Columns Viva C4 5 μm 300A° ขนาด 10 x 2.1mm
- 1.5 Membrane Filter (Nylon) 0.45 μm ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 47 mm.
- 1.6 Syringe Filter (Nylon) 0.45 μm ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 13 mm.
- 1.7 Micropipette ขนาด 10 – 100 μl
- 1.8 Micropipette ขนาด 100 – 1000 μl
- 1.9 Ultrasonic bath
- 1.10 ปัมพ์สุญญากาศ
- 1.11 ปีกเกอร์ขนาด 25 มิลลิลิตร
- 1.12 กระดาษกรอง (filter paper) Whatman เบอร์ 5 ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 11 cm.
- 1.13 ผ้าโซลอน (solon)
- 1.14 ผ้าเวสต์พอยท์ (westpoint)

2. สารเคมี

- 2.1 น้ำปราศจากไอออน (deionize water) จากบริษัท Labscan Limited ประเทศไทย
- 2.2 อะซิโตไนไตรล์ (Acetonitrile) จากบริษัท Labscan Limited ประเทศไทย
- 2.3 กรดไตรฟลูออโรแอซิดิก (Trifluoroacetic acid ,TFA) ยี่ห้อ Fluka จากบริษัท Sigma-Aldrich Production ประเทศสวิตเซอร์แลนด์

3. วิธีการ

3.1 การเตรียมตัวอย่างคราบเลือด

3.1.1 เตรียมตัวอย่างคราบเลือดบนกระดาษกรอง (filter paper) Whatman เบอร์ 5 โดยเก็บตัวอย่างเลือดจากอาสาสมัครที่มีสุขภาพดี 4 คน แล้วหยดเลือด ปริมาณ 10 μ l ลงบนกระดาษกรอง (filter paper) จากนั้นทำให้แห้งโดยการผึ่งลมที่อุณหภูมิห้อง และเก็บไว้ในถุงพลาสติกที่แห้ง เป็นเวลา 1 4 14 และ 21 วัน

3.1.2 เตรียมตัวอย่างคราบเลือดบนผ้าโซลอน (solon) โดยเก็บตัวอย่างเลือดจากอาสาสมัครที่มีสุขภาพดี 4 คน แล้วหยดเลือด ปริมาณ 10 μ l ลงบนผ้าโซลอนจากนั้นทำให้แห้งโดยการผึ่งลมที่อุณหภูมิห้อง และเก็บไว้ในถุงพลาสติกที่แห้ง เป็นเวลา 1 9 13 และ 20 วัน

3.1.3 เตรียมตัวอย่างคราบเลือดบนผ้าเวสต์พอยท์ (westpoint) โดยเก็บตัวอย่างเลือดจากอาสาสมัครที่มีสุขภาพดี 3 คน แล้วหยดเลือด ปริมาณ 10 μ l ลงบนผ้าเวสต์พอยท์ จากนั้นทำให้แห้งโดยการผึ่งลมที่อุณหภูมิห้อง และเก็บไว้ในถุงพลาสติกที่แห้ง เป็นเวลา 1 8 12 และ 15 วัน

3.2 การสกัด

สกัดโปรตีนจากคราบเลือดโดยการตัดกระดาษกรองและชิ้นผ้าที่มีคราบเลือดติดอยู่ (ขนาดประมาณ 5 x 5 mm) โดยแช่ในน้ำปราศจากไอออน(deionized water) 400 μ l ในบีกเกอร์ขนาด 25 ml ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 20 นาที แล้วเขย่า จากนั้นกรองด้วย syringe filter (Nylon) ขนาด 0.45 μ m

3.3 การเตรียมตัวทำละลาย

เตรียมตัวทำละลาย(ตัวชะ)โดยผสมอะซิโตไนไตรล์กับน้ำปราศจากไอออน ด้วยอัตราส่วน 50:50 แล้วเติมกรดไตรฟลูออโรแอซิดิก ลงไปร้อยละ 0.1 จากนั้นกรองด้วย filter membrane (Nylon) ขนาด 0.45 μ m แล้วกำจัดก๊าซด้วย Ultrasonic bath

3.4 การวิเคราะห์ตัวอย่างโดย HPLC

ดูดสารตัวอย่างที่ผ่านการกรองแล้วมา 10 μ l ฉีดเข้าเครื่อง HPLC ทำการวิเคราะห์ โดยใช้สถานะในกาวิเคราะห์ดังนี้

Columns : Viva (C4) 5 μ m 300A° ขนาด 250 x 4.6 ml

Mobile phase : acetonitile : water (50:50)

Flow rate : 0.5 ml/min

Detector : diode array ความถี่ 220 nm

ระยะเวลาในการวิเคราะห์ 20 นาที

3.5 การวิเคราะห์ผล

เครื่องบันทึกผลเป็นโครมาโตแกรม โดยบันทึกค่า retention time , peak area และ percent peak area นำผลที่ได้ทำการวิเคราะห์ ดังนี้

3.5.1 ศึกษารูปแบบโปรตีนของคราบเลือดบนวัสดุชนิดต่างๆ ได้แก่ คราบเลือดบนกระดาษกรอง (filter paper) Whatman เบอร์ 5 คราบเลือดบนผ้าโซลอน (solon) และคราบเลือดบนผ้าเวสต์พอยท์ (westpoint)

3.5.2 วิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของโปรตีนของคราบเลือดบนกระดาษกรอง (filter paper) Whatman เบอร์ 5 โดยเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงของพื้นที่ฟิค ของฟิค C และฟิค D จากค่าสัดส่วนของพื้นที่ฟิค D ต่อพื้นที่ฟิค C (D/C) ค่าร้อยละของพื้นที่ฟิค C และค่าร้อยละของพื้นที่ฟิค D ในช่วงระยะเวลา 1 4 14 และ 21 วัน

3.5.3 วิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของโปรตีนของคราบเลือดบนผ้าโซลอน (solon) โดยเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงของพื้นที่ฟิคของ ฟิค C และฟิค D จากค่าสัดส่วนของพื้นที่ฟิค D ต่อพื้นที่ฟิค C (D/C) ค่าร้อยละของพื้นที่ฟิค C และค่าร้อยละของพื้นที่ฟิค D ในช่วงระยะเวลา 1 9 13 และ 20 วัน

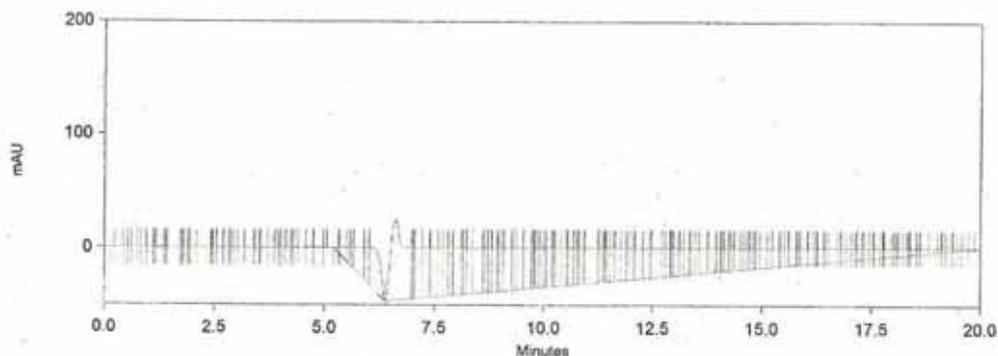
3.5.4 วิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของโปรตีนของคราบเลือดบนผ้าเวสต์พอยท์ (westpoint) โดยเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงของพื้นที่ฟิค ของฟิค C และฟิค D จากค่าสัดส่วนของพื้นที่ฟิค D ต่อพื้นที่ฟิค C (D/C) ค่าร้อยละของพื้นที่ฟิค C และค่าร้อยละของพื้นที่ฟิค D ในช่วงระยะเวลา 1 8 12 และ 15 วัน

บทที่ 4

ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

1. เปรียบเทียบรูปแบบโปรตีนของคราบเลือดบนวัสดุชนิดต่างๆ

จากการวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของโปรตีนในสารสกัดจากคราบเลือด โดยใช้เทคนิคโครมาโตกราฟีสมรรถนะสูง (HPLC) และทำการตรวจวัดปริมาณโปรตีนด้วย diode array detector ที่ความยาวคลื่น 220 นาโนเมตร โดยคราบเลือดที่ทำการวิเคราะห์ประกอบด้วยคราบเลือดบนวัสดุต่างชนิดกัน 3 ชนิด ได้แก่ คราบเลือดบนกระดาษกรอง (filter paper) Whatman เบอร์ 5 คราบเลือดบนผ้าโซลอน(solon) และคราบเลือดบนผ้าเวสต์พอยท์ (westpoint) ซึ่งผลที่ได้จากการวิเคราะห์เป็นโครมาโตแกรม (chromatogram) ซึ่งแสดงให้เห็นลักษณะของพีค ค่าพื้นที่พีค (peak area) และค่าร้อยละของพื้นที่พีค (% peak area) แต่ละพีค ตัวอย่างโครมาโตแกรมบนวัสดุทั้ง 3 ชนิดซึ่งได้จากสารสกัดคราบเลือดที่มีอายุ 1 วันจากอาสาสมัครเพศชาย คนที่ 1(M1) แสดงดังภาพที่ 27 28 และ 29 ส่วนภาพที่ 26 แสดงให้เห็นโครมาโตแกรมที่ได้จากสารสกัดของกระดาษกรองที่ปราศจากคราบเลือด ซึ่งเหมือนกันกับโครมาแกรมที่ได้จากผ้าโซลอน ผ้าเวสต์พอยท์ และโครมาโตแกรมจากตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด (น้ำปราศจากไอออน)



ภาพที่ 26 โครมาโตแกรมของกระดาษกรองที่ปราศจากคราบเลือด

จากโครมาโตแกรมของคราบเลือดตัวอย่างบนกระดาษกรอง (ภาพที่ 27) บนผ้าไซลอน (ภาพที่ 28) และบนผ้าเวสต์พอยท์ (ภาพที่ 29) พบตำแหน่งที่เกิดพีคที่มี peak area สูง ได้แก่ ตำแหน่ง A, B, C และ D ซึ่งตำแหน่ง A และ B ประกอบด้วยพีคย่อยมากกว่าหนึ่งพีคซ้อนทับกัน ส่วนพีค C และ D เป็นพีคเดี่ยว ซึ่งมีความเหมาะสมที่จะใช้ในการวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของโปรตีนในคราบเลือด

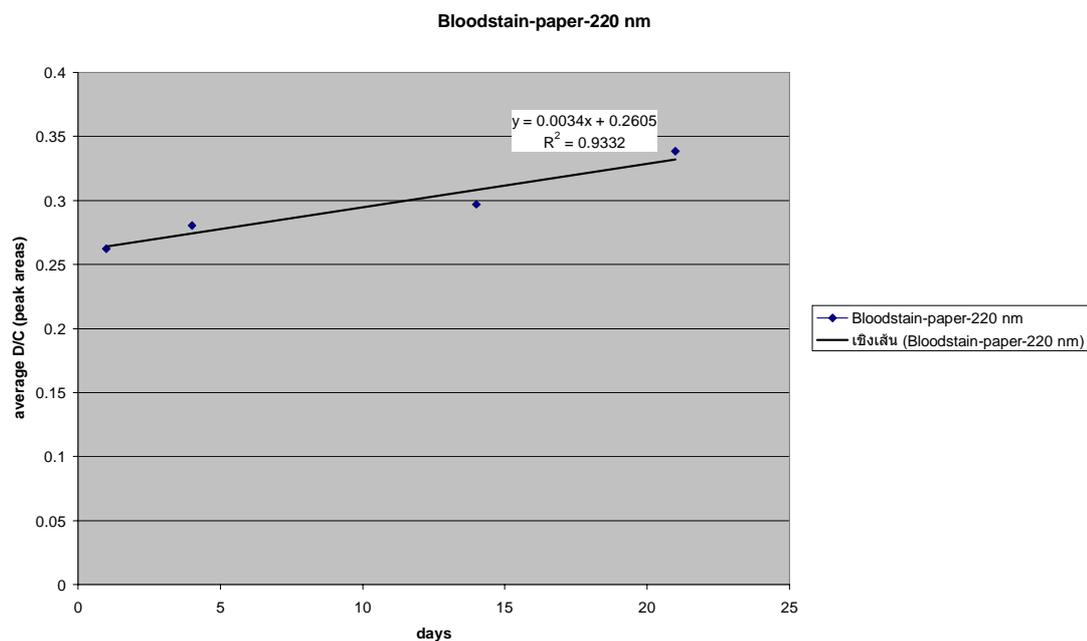
2. การเปลี่ยนแปลงของโปรตีนในคราบเลือดบนกระดาษกรอง (filter paper) Whatman เบอร์ 5

จากโครมาโตแกรมของคราบเลือดตัวอย่างบนกระดาษกรอง พบว่าเมื่ออายุของคราบเลือดมากขึ้นพื้นที่พีคที่ตรวจพบมีการเปลี่ยนแปลง โดยการศึกษาสัดส่วนของพื้นที่พีค D ต่อพื้นที่พีค C (D/C) ค่าร้อยละของพื้นที่พีค C (%C) และศึกษาค่าร้อยละของพื้นที่พีค D (%D) ในช่วงระยะเวลา 1, 4, 14 และ 21 วัน ได้ผลดังนี้

ตารางที่ 1 แสดงค่าสัดส่วนของพื้นที่พีค D ต่อพื้นที่พีค C (D/C) จากโครมาโตแกรมของคราบเลือดบนกระดาษกรอง

ratio/days	day 1	day 4	day 14	day 21
D/C (M1)	0.273142	0.286873	0.299051	0.342487
D/C (M2)	0.26114	0.282761	0.30021	0.344069
D/C (F1)	0.252125	0.272101	0.302662	0.333266
D/C (F2)	0.263528	0.28023	0.285725	0.334067
average D/C	0.262484	0.280491	0.296912	0.338474

จากตารางที่ 1 พบว่าเมื่อคราบเลือดมีอายุมากขึ้นสัดส่วนของพื้นที่พีค D ต่อพื้นที่พีค C (D/C) จะมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเหมือนกันในคราบเลือดทั้ง 4 ตัวอย่าง เมื่อนำค่าเฉลี่ยสัดส่วนของพื้นที่พีค D ต่อพื้นที่พีค C (average D/C) มาสร้างกราฟความสัมพันธ์กับอายุของคราบเลือด (days) ได้ดังภาพที่ 30

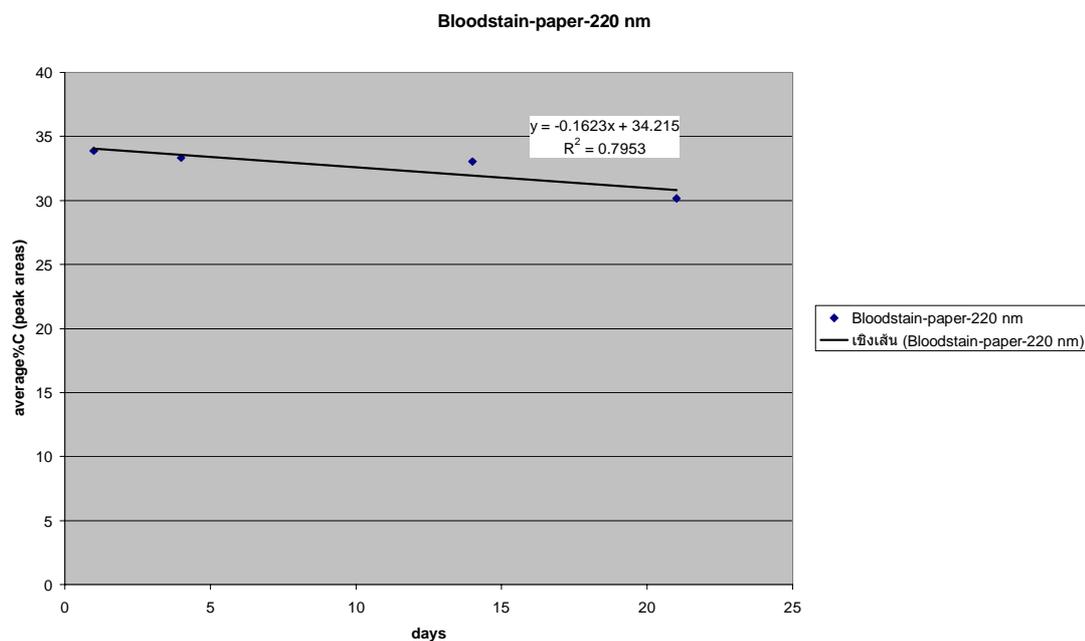


ภาพที่ 30 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างอายุของคราบเลือด (days) กับค่าเฉลี่ยสัดส่วนของพื้นที่พีก D ต่อพื้นที่พีก C (average D/C) จากคราบเลือดบน กระดาษกรอง

ตารางที่ 2 แสดงค่าร้อยละของพื้นที่พีก C จากโครมาโตแกรมของคราบเลือดบนกระดาษกรอง

ratio/days	day 1	day 4	day 14	day 21
%C (M1)	34.13623	33.48325	33.15424	30.43801
%C (M2)	34.53597	33.38368	32.6784	30.64783
%C (F1)	34.18083	32.81468	31.90443	29.60897
%C (F2)	32.69505	33.57133	34.38524	29.85431
average %C	33.88702	33.31324	33.03058	30.13728

จากตารางที่ 2 พบว่าเมื่อคราบเลือดมีอายุมากขึ้นค่าร้อยละของพื้นที่พีก C (%C) จะมีแนวโน้มลดลงเหมือนกันในคราบเลือดทั้ง 4 ตัวอย่าง เมื่อนำค่าเฉลี่ยร้อยละของพื้นที่พีก C (average %C) มาสร้างกราฟความสัมพันธ์กับอายุของคราบเลือด (days) ได้ดังภาพที่ 31

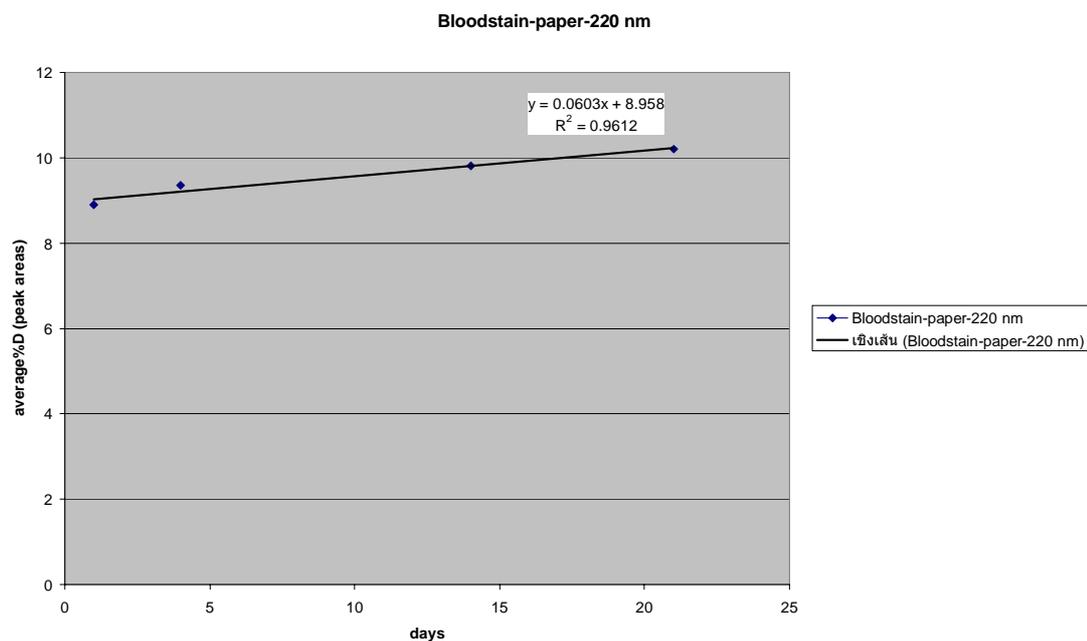


ภาพที่ 31 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างอายุของคราบเลือด (days) กับค่าเฉลี่ยร้อยละของพื้นที่พีค C (average %C) จากคราบเลือดบนกระดาษกรอง

ตารางที่ 3 แสดงค่าร้อยละของพื้นที่พีค D จากโครมาโตแกรมของคราบเลือดบนกระดาษกรอง

ratio/days	day 1	day 4	day 14	day 21
%D (M1)	9.324034	9.605426	9.914825	10.42463
%D (M2)	9.018716	9.439617	9.810381	10.54496
%D (F1)	8.617845	8.928905	9.656253	9.867658
%D (F2)	8.616047	9.407712	9.824731	9.973328
average %D	8.894161	9.345415	9.801548	10.20264

จากตารางที่ 3 พบว่าเมื่อคราบเลือดมีอายุมากขึ้นค่าร้อยละของพื้นที่พีค D (%D) จะมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเหมือนกันในคราบเลือดทั้ง 4 ตัวอย่าง เมื่อนำค่าเฉลี่ยร้อยละของพื้นที่พีค D (average %D) มาสร้างกราฟความสัมพันธ์กับอายุของคราบเลือด (days) ได้ดังภาพที่ 32



ภาพที่ 32 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างอายุของคราบเลือด (days) กับค่าเฉลี่ยร้อยละของพื้นที่พีค D (average %D) จากคราบเลือดบนกระดาษกรอง

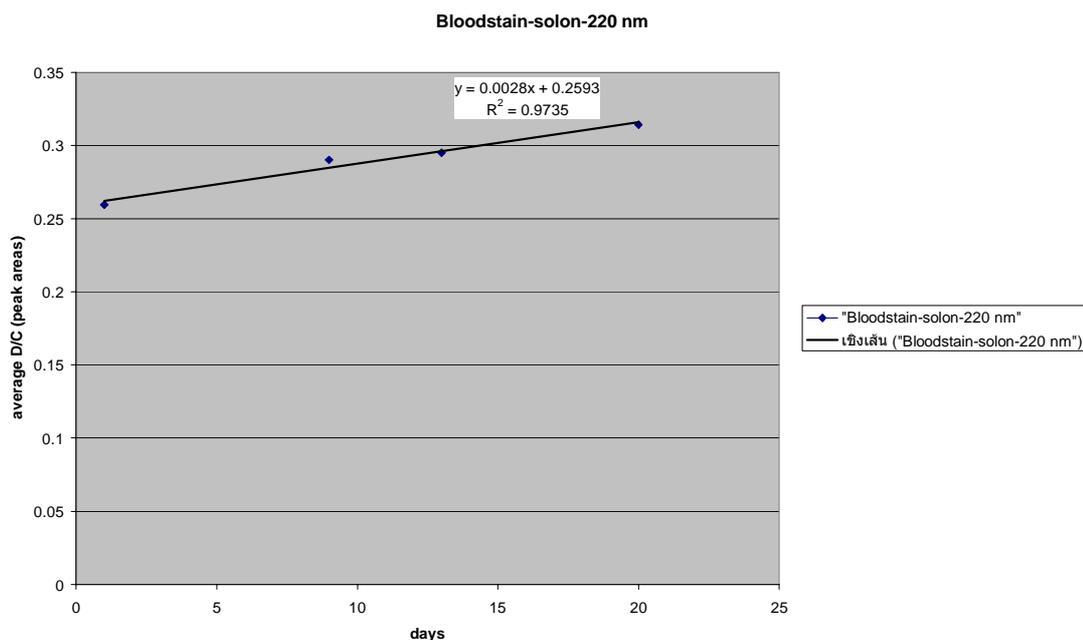
3. การเปลี่ยนแปลงของโปรตีนในคราบเลือดบนผ้าโซลอน (solon)

จากโครมาโตแกรมของคราบเลือดตัวอย่าง บนผ้าโซลอน พบว่าเมื่ออายุของคราบเลือดมากขึ้นพื้นที่พีคที่ตรวจพบมีการเปลี่ยนแปลง โดยการศึกษาสัดส่วนของพื้นที่พีค D ต่อพื้นที่พีค C (D/C) ค่าร้อยละของพื้นที่พีค C (%C) และศึกษาค่าร้อยละของพื้นที่พีค D (%D) ในช่วงระยะเวลา 1, 9, 13 และ 20 วัน ได้ผลดังนี้

ตารางที่ 4 แสดงค่าสัดส่วนพื้นที่พีค D ต่อพื้นที่พีค C (D/C) จากโครมาโตแกรมของคราบเลือดบนผ้าโซลอน

ratio/days	day 1	day 9	day 13	day 20
D/C (M1)	0.236306	0.281214	0.28772	-
D/C (M2)	0.264472	0.288739	0.292908	0.309072
D/C (F1)	0.258528	0.288327	0.294111	0.316772
D/C (F2)	0.278089	0.302711	0.305719	0.317107
average D/C	0.259349	0.290247	0.295114	0.314317

จากตารางที่ 4 พบว่าเมื่อคราบเลือดมีอายุมากขึ้นสัดส่วนของพื้นที่พีค D ต่อพื้นที่พีค C (D/C) จะมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเหมือนกันในคราบเลือดทั้ง 4 ตัวอย่าง เมื่อนำค่าเฉลี่ยสัดส่วนของพื้นที่พีค D ต่อพื้นที่พีค C (average D/C) มาสร้างกราฟความสัมพันธ์กับอายุของคราบเลือด (days) ได้ดังภาพที่ 33

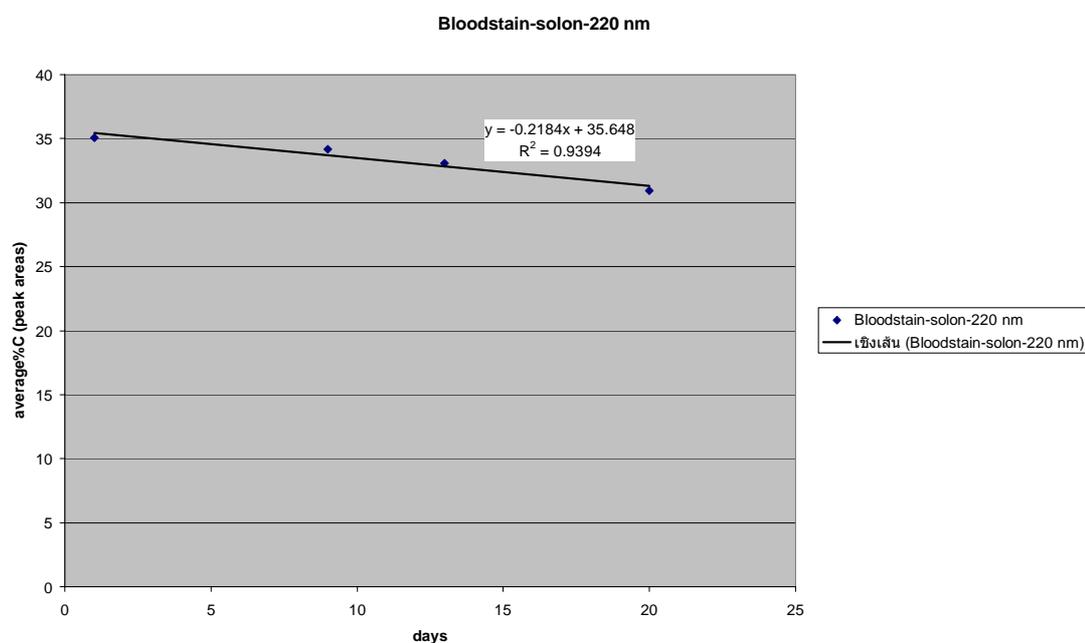


ภาพที่ 33 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างอายุของคราบเลือด (days) กับค่าเฉลี่ยสัดส่วนของพื้นที่พีค D ต่อพื้นที่พีค C (average D/C) จากคราบเลือดบนผ้าโซลอน

ตารางที่ 5 แสดงค่าร้อยละของพื้นที่พีค C (%C) จากโครมาโตแกรมของคราบเลือดบนผ้าโซลอน

%C/days	day 1	day 9	day 13	day 20
%C (M1)	36.81982	35.05447	33.78349	-
%C (M2)	34.50691	34.26284	34.85069	31.65556
%C (F1)	34.21665	34.70881	32.33962	31.53894
%C (F2)	34.66903	32.66485	31.27714	29.55862
average %C	35.0531	34.17274	33.06274	30.91438

จากตารางที่ 5 พบว่าเมื่อคราบเลือดมีอายุมากขึ้นค่าร้อยละของพื้นที่พีค C (%C) จะมีแนวโน้มลดลงเหมือนกันในคราบเลือดทั้ง 4 ตัวอย่าง เมื่อนำค่าเฉลี่ยร้อยละของพื้นที่พีค C (average %C) มาสร้างกราฟความสัมพันธ์กับอายุของคราบเลือด (days) ได้ดังภาพที่ 34

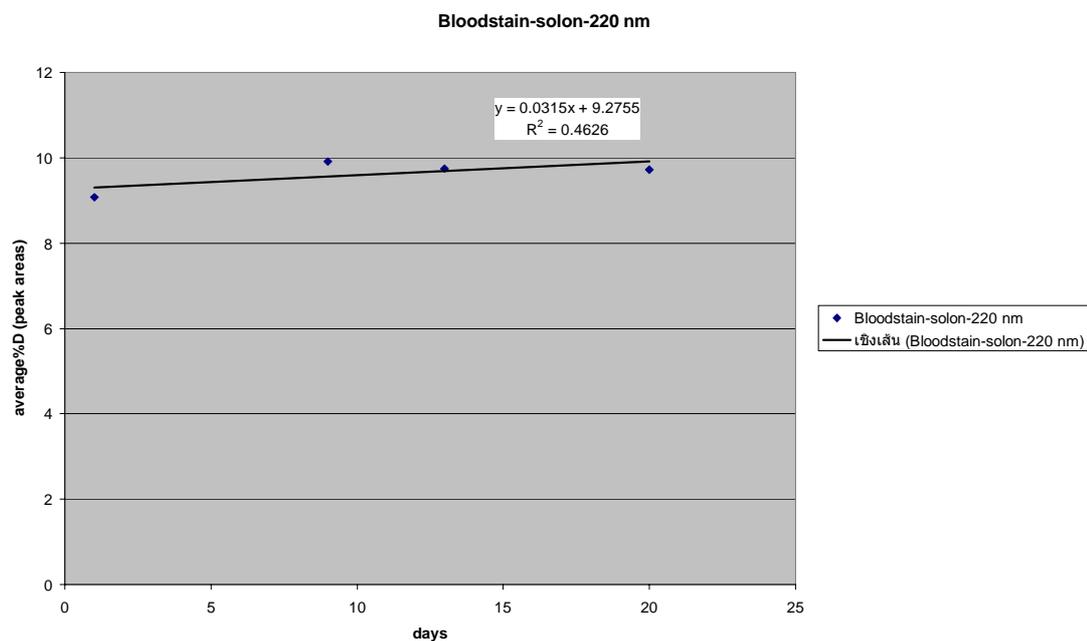


ภาพที่ 34 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างอายุของคราบเลือด (days) กับค่าเฉลี่ยร้อยละของพื้นที่พีค C (average %C) จากคราบเลือดบนผ้าโซลอน

ตารางที่ 6 แสดงค่าร้อยละของพื้นที่พีค D (%D) จากโครมาโตแกรมของคราบเลือดบนผ้าโซลอน

%D/days	day 1	day 9	day 13	day 20
%D (M1)	8.700758	9.857803	9.720194	-
%D (M2)	9.12611	9.893003	10.20803	9.783837
%D (F1)	8.845966	10.00748	9.511425	9.987472
%D (F2)	9.641067	9.888004	9.562005	9.373255
average %D	9.078475	9.911572	9.750414	9.714855

จากตารางที่ 6 พบว่าเมื่อคราบเลือดมีอายุมากขึ้นค่าร้อยละของพื้นที่พีค D (%D) จะมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเหมือนกันในคราบเลือดทั้ง 4 ตัวอย่าง เมื่อนำค่าเฉลี่ยร้อยละของพื้นที่พีค D (average %D) มาสร้างกราฟความสัมพันธ์กับอายุของคราบเลือด (days) ได้ดังภาพที่ 35



ภาพที่ 35 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างอายุของคราบเลือด (days) กับค่าเฉลี่ยร้อยละของพื้นที่พีค D (average %D) จากคราบเลือดบนผ้าโซลอน

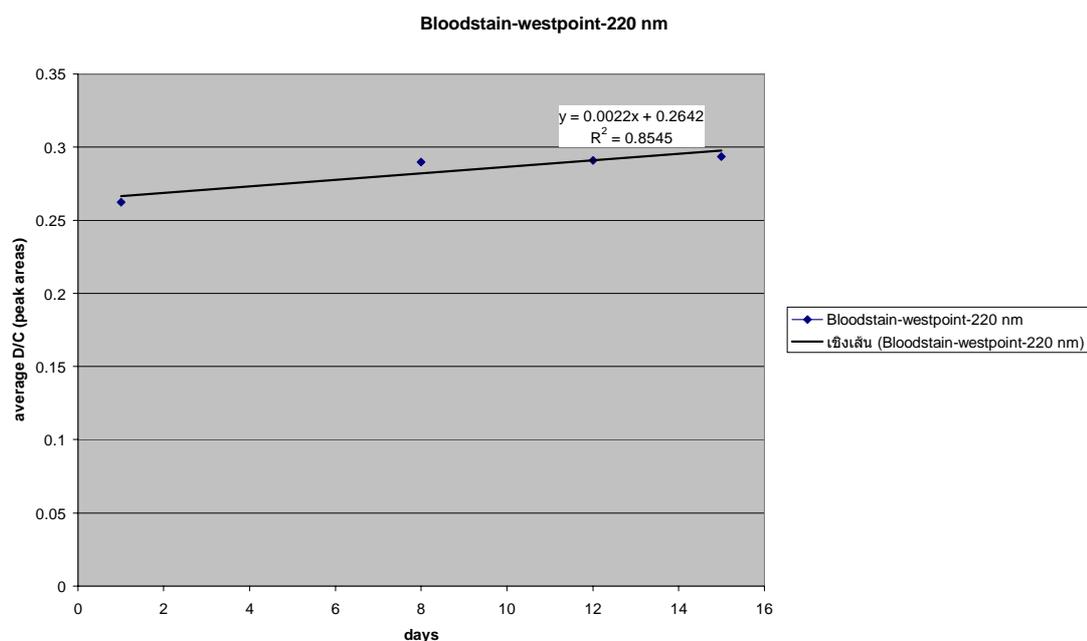
4. การเปลี่ยนแปลงของโปรตีนในคราบเลือดบนผ้าเวสต์พอยท์ (westpoint)

จากโครมาโตแกรมของคราบเลือดตัวอย่างบนผ้าเวสต์พอยท์ พบว่าเมื่ออายุของคราบเลือดมากขึ้นพื้นที่พีคที่ตรวจพบมีการเปลี่ยนแปลง โดยการศึกษาค่าสัดส่วนของพื้นที่พีค D ต่อพื้นที่พีค C (D/C) ค่าร้อยละของพื้นที่พีค C (%C) และศึกษาค่าร้อยละของพื้นที่พีค D (%D) ในช่วงระยะเวลา 1, 8, 12 และ 15 วัน ได้ผลดังนี้

ตารางที่ 7 แสดงค่าสัดส่วนพื้นที่พีค D ต่อพื้นที่พีค C (D/C) จากโครมาโตแกรมของคราบเลือดบนผ้าเวสต์พอยท์

ratio/day	day 1	day 8	day 12	day 15
D/C (M1)	0.245992	-	0.287976	0.288389
D/C (M2)	-	-	-	-
D/C (F1)	0.253629	0.283007	0.270041	0.283918
D/C (F2)	0.287943	0.296584	0.314902	0.303162
average D/C	0.262521	0.289795	0.290973	0.291823

จากตารางที่ 7 พบว่าเมื่อคราบเลือดมีอายุมากขึ้นสัดส่วนของพื้นที่พีค D ต่อพื้นที่พีค C (D/C) จะมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเหมือนกันในคราบเลือดทั้ง 3 ตัวอย่าง เมื่อนำค่าเฉลี่ยสัดส่วนของพื้นที่พีค D ต่อพื้นที่พีค C (average D/C) มาสร้างกราฟความสัมพันธ์กับอายุของคราบเลือด (days) ได้ดังภาพที่ 36

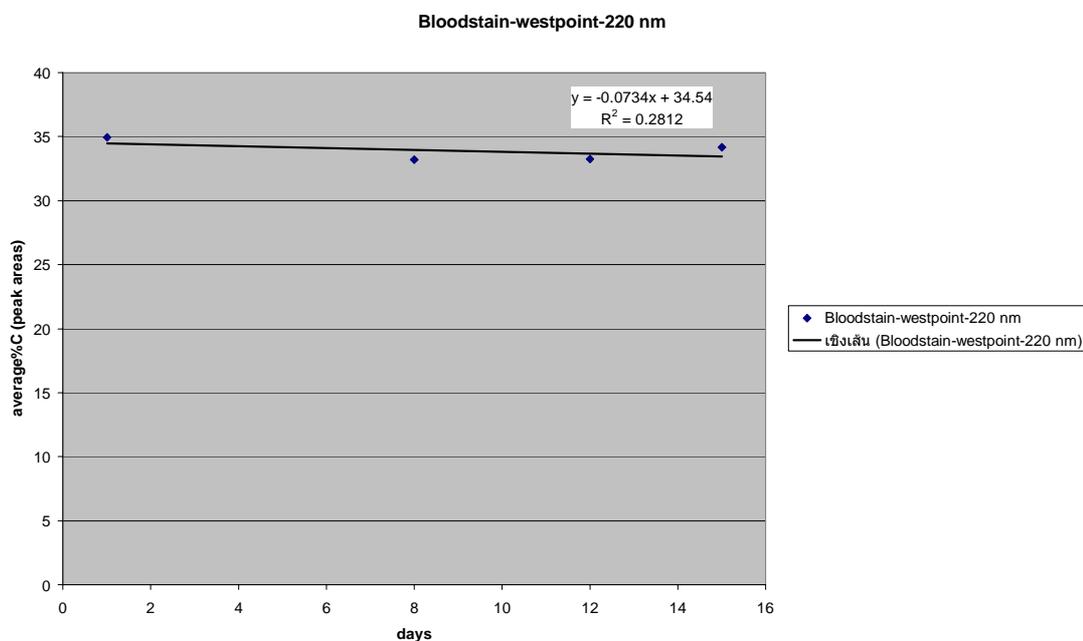


ภาพที่ 36 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างอายุของคราบเลือด (days) กับค่าเฉลี่ยสัดส่วนของพื้นที่พีค D ต่อพื้นที่พีค C (average D/C) จากคราบเลือดบนผ้าเวสต์พอยท์

ตารางที่ 8 แสดงค่าร้อยละของพื้นที่พีค C จากโครมาโตแกรมของคราบเลือดบนผ้าเวสต์พอยท์

%C/days	day 1	day 8	day 12	day 15
%C (M1)	36.56612	-	34.62071	35.03399
%C (M2)	-	-	-	-
%C (F1)	34.56647	33.21262	33.05137	34.76751
%C (F2)	33.69819	33.145	32.04789	33.54317
average %C	34.94359	33.17881	33.23999	34.15534

จากตารางที่ 8 พบว่าเมื่อคราบเลือดมีอายุมากขึ้นค่าร้อยละของพื้นที่พีค C (%C) จะมีแนวโน้มลดลงเหมือนกันในคราบเลือดทั้ง 3 ตัวอย่าง เมื่อนำค่าเฉลี่ยร้อยละของพื้นที่พีค C (average %C) มาสร้างกราฟความสัมพันธ์กับอายุของคราบเลือด (days) ได้ดังภาพที่ 37

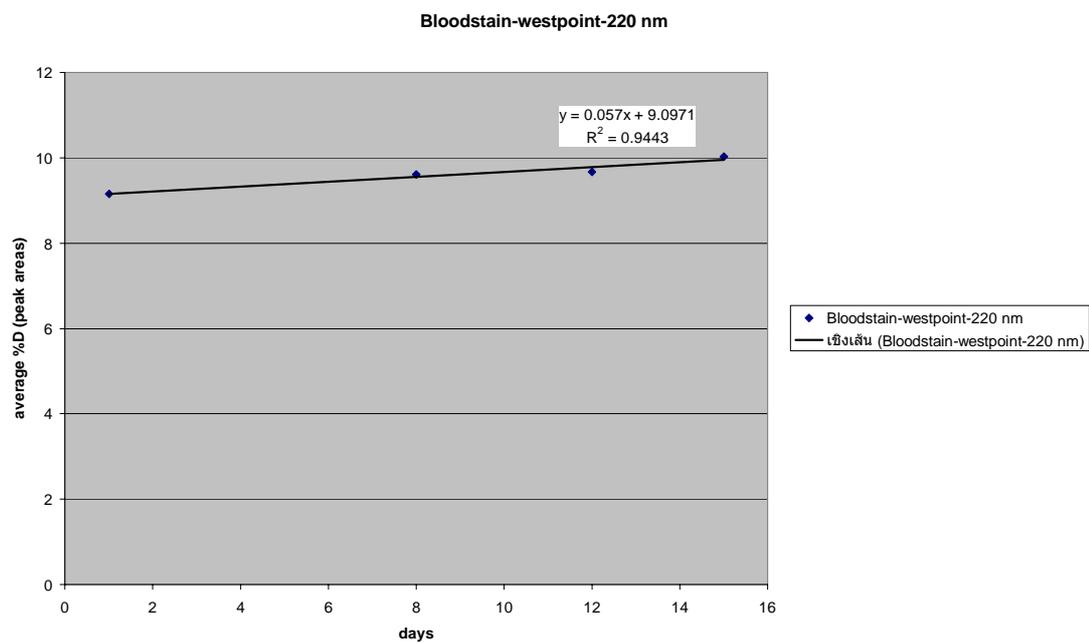


ภาพที่ 37 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างอายุของคราบเลือด (days) กับค่าเฉลี่ยร้อยละของพื้นที่พีค C (average %C) จากคราบเลือดบนผ้าเวสต์พอยท์

ตารางที่ 9 แสดงค่าร้อยละของพื้นที่พีค D จากโครมาโตแกรมของคราบเลือดบนผ้าเวสต์พอยท์

%D/days	day 1	day 8	day 12	day 15
%D (M1)	8.994971	-	9.969944	10.10342
%D (M2)	-	-	-	-
%D (F1)	8.767055	9.399399	8.925242	9.871123
%D (F2)	9.703152	9.80337	10.09199	10.169
average %D	9.155059	9.601335	9.662392	10.04785

จากตารางที่ 9 พบว่าเมื่อคราบเลือดมีอายุมากขึ้นค่าร้อยละของพื้นที่พีค D (%D) จะมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเหมือนกันในคราบเลือดทั้ง 3 ตัวอย่าง เมื่อนำค่าเฉลี่ยร้อยละของพื้นที่พีค D (average %D) มาสร้างกราฟความสัมพันธ์กับอายุของคราบเลือด (days) ได้ดังภาพที่ 38



ภาพที่ 38 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างอายุของคราบเลือด (days) กับค่าเฉลี่ยร้อยละของพื้นที่พีค D (average %D) จากคราบเลือดบนผ้าเวสต์พอยท์

บทที่ 5

สรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

สรุปผลการวิจัย

ผลการศึกษาจากงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นโครมาโตแกรมที่ได้จากตัวอย่างคราบเลือดบนกระดาษกรอง บนผ้าโพลอน และบนผ้าเวสต์พอยท์ โดยพบฟีดที่มีพื้นที่ฟีดสูง คือ ฟีด A B C และ D ซึ่งจากที่ได้เคยมีผู้รายงานไว้ (Inoue, 1992) คาดได้ว่า ฟีด B คือฟีดของฮีม (heme) ฟีด C คือฟีดของ เบตา-โกลบิน (β -globin) และฟีด D คือฟีดของแอลฟา-โกลบิน (α -globin) จากโครมาโตแกรมที่ได้ พบว่าฟีด A และฟีด B มีการซ้อนทับกันมากกว่าหนึ่งฟีด ส่วนฟีด C และฟีด D นั้น เป็นฟีดเดี่ยวซึ่งมีความเป็นไปได้ที่จะใช้ในการวิเคราะห์หาอายุของคราบเลือดได้ ซึ่งจากการติดตามการเปลี่ยนแปลงของฟีด C และฟีด D ที่ได้จากสารสกัดของคราบเลือดบนวัสดุทั้ง 3 ชนิด พบว่าการเปลี่ยนแปลงของพื้นที่ฟีดของโปรตีนทั้งสองชนิดสามารถนำไปใช้ประมาณอายุของคราบเลือดได้

ภาพที่ 30 แสดงอัตราการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนทั้งสองชนิดในคราบเลือดบนกระดาษกรอง (Whatman เบอร์ 1) ในระยะเวลา 21 วัน พบว่าเมื่ออายุของคราบเลือดเพิ่มขึ้น ค่าเฉลี่ยของอัตราส่วนพื้นที่ฟีด D ต่อพื้นที่ฟีด C (average D/C) มีค่าเพิ่มขึ้น ซึ่งสัมพันธ์กับระยะเวลา (วัน) โดยค่าความสัมพันธ์เป็นตามสมการ $y = 0.0034x + 0.2605$ และค่า $R^2 = 0.9332$

ภาพที่ 31 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างอายุของคราบเลือด (days) กับค่าเฉลี่ยร้อยละของพื้นที่ฟีด C (average %C) จากคราบเลือดบนกระดาษกรอง(Whatman เบอร์ 1) ในระยะเวลา 21 วัน พบว่าเมื่ออายุของคราบเลือดเพิ่มขึ้น ค่าร้อยละของพื้นที่ฟีด C มีค่าลดลง ซึ่งสัมพันธ์กับระยะเวลา (วัน) โดยค่าความสัมพันธ์เป็นตามสมการ $y = 0.1623x + 34.215$ และค่า $R^2 = 0.7953$

ภาพที่ 32 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างอายุของคราบเลือด (days) กับค่าเฉลี่ยร้อยละของพื้นที่ฟีด D (average %D) จากคราบเลือดบนกระดาษกรอง (Whatman เบอร์ 1) ในระยะเวลา 21 วัน พบว่าเมื่ออายุของคราบเลือดเพิ่มขึ้น ค่าร้อยละของพื้นที่ฟีด D มีค่าเพิ่มขึ้น ซึ่งสัมพันธ์กับระยะเวลา (วัน) โดยค่าความสัมพันธ์เป็นตามสมการ $y = 0.0603x + 8.958$ และค่า $R^2 = 0.9612$

ภาพที่ 33 แสดงอัตราการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนทั้งสองชนิดของคราบเลือด บนผ้าโพลอนในระยะเวลา 20 วัน พบว่าเมื่ออายุของคราบเลือดเพิ่มขึ้น อัตราส่วนพื้นที่ฟิสิก D ต่อพื้นที่ฟิสิก C (average D/C) มีค่าเพิ่มขึ้น ซึ่งสัมพันธ์กับระยะเวลา (วัน) โดยค่าความสัมพันธ์เป็นตามสมการ $y = 0.0028x + 0.2593$ และค่า $R^2 = 0.9735$

ภาพที่ 34 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างอายุของคราบเลือด (days) กับค่าเฉลี่ยร้อยละของพื้นที่ฟิสิก C (average %C) จากคราบเลือดบนผ้าโพลอน ในระยะเวลา 20 วัน พบว่าเมื่ออายุของคราบเลือดเพิ่มขึ้น ค่าร้อยละของพื้นที่ฟิสิก C มีค่าลดลง ซึ่งสัมพันธ์กับระยะเวลา (วัน) โดยค่าความสัมพันธ์เป็นตามสมการ $y = 0.2184x + 35.648$ และค่า $R^2 = 0.9394$

ภาพที่ 35 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างอายุของคราบเลือด (days) กับค่าเฉลี่ยร้อยละของพื้นที่ฟิสิก D (average %D) จากคราบเลือดบนผ้าโพลอน ในระยะเวลา 20 วัน พบว่าเมื่ออายุของคราบเลือดเพิ่มขึ้น ค่าร้อยละของพื้นที่ฟิสิก D มีค่าเพิ่มขึ้น ซึ่งสัมพันธ์กับระยะเวลา (วัน) โดยค่าความสัมพันธ์เป็นตามสมการ $y = 0.0315x + 9.2755$ และค่า $R^2 = 0.4626$

ภาพที่ 36 แสดงอัตราการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนทั้งสองชนิดในคราบเลือดบนผ้าเวสต์-พอยท์ ในระยะเวลา 15 วัน พบว่าเมื่ออายุของคราบเลือดเพิ่มขึ้น อัตราส่วนพื้นที่ฟิสิก D ต่อพื้นที่ฟิสิก C (average D/C) มีค่าเพิ่มขึ้น ซึ่งสัมพันธ์กับระยะเวลา (วัน) โดยค่าความสัมพันธ์เป็นตามสมการ $y = 0.02222x + 0.2642$ และค่า $R^2 = 0.8545$

ภาพที่ 37 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างอายุของคราบเลือด (days) กับค่าเฉลี่ยร้อยละของพื้นที่ฟิสิก C (average %C) จากคราบเลือดบนผ้าเวสต์พอยท์ ในระยะเวลา 15 วัน พบว่าเมื่ออายุของคราบเลือดเพิ่มขึ้น ค่าเฉลี่ยร้อยละของพื้นที่ฟิสิก C มีค่าลดลง ซึ่งสัมพันธ์กับระยะเวลา (วัน) โดยค่าความสัมพันธ์เป็นตามสมการ $y = 0.0734x + 34.54$ และค่า $R^2 = 0.2812$

ภาพที่ 38 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างอายุของคราบเลือด (days) กับค่าเฉลี่ยร้อยละของพื้นที่ฟิสิก D (average %D) จากคราบเลือดบนผ้าเวสต์พอยท์ ในระยะเวลา 15 วัน พบว่าเมื่ออายุของคราบเลือดเพิ่มขึ้น ค่าเฉลี่ยร้อยละของพื้นที่ฟิสิก D มีค่าเพิ่มขึ้น ซึ่งสัมพันธ์กับระยะเวลา (วัน) โดยค่าความสัมพันธ์เป็นตามสมการ $y = 0.00531x + 9.1604$ และค่า $R^2 = 0.9181$

การอภิปรายผล

จากผลการทดลองพบว่า อัตราการเปลี่ยนแปลงของสัดส่วนระหว่างพื้นที่ฟีก D ต่อพื้นที่ฟีก C (D/C) และ ร้อยละของพื้นที่ฟีก D (%D) มีแนวโน้มสูงขึ้นตามอายุของคราบเลือด (วัน) ส่วนค่าร้อยละของพื้นที่ฟีก C (%C) มีแนวโน้มลดลงตามอายุของคราบเลือด ซึ่งผลที่ได้ตรงกันทั้งคราบเลือดบนกระดาษกรอง (Whatman เบอร์ 5) คราบเลือดบนผ้าโซลอน และคราบเลือดบนผ้าเวสต์พอยท์ สาเหตุที่ทำให้ค่าที่ได้มีแนวโน้มเช่นนี้อาจเกิดจากโปรตีนที่ตำแหน่ง C (ฟีก C) เกิดการสลายตัวรวดเร็วในระหว่างการเก็บ หรือถูกสกัดออกมาจากคราบเลือดได้ลดลงเมื่อระยะเวลาในการเก็บนานขึ้น (อายุของคราบเลือดมากขึ้น)

การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างสัดส่วนระหว่างพื้นที่ฟีก D ต่อพื้นที่ฟีก C (D/C) กับอายุของคราบเลือด ผลการทดลองที่ได้พบว่าสามารถใช้ในการประมาณอายุของคราบเลือดได้จากสมการค่าความสัมพันธ์ โดยที่ y แทนค่าสัดส่วนระหว่างพื้นที่ฟีก D ต่อพื้นที่ฟีก C (D/C ratio) และ x แทนอายุของคราบเลือด (วัน) โดยที่ค่าความสัมพันธ์ของคราบเลือดบนกระดาษกรอง เป็นตามสมการ $y = 0.0034x + 0.2605$ ค่า $R^2 = 0.9332$ ค่าความสัมพันธ์ของคราบเลือดบนผ้าโซลอนเป็นตามสมการ $y = 0.0028x + 0.2593$ ค่า $R^2 = 0.9735$ ค่าความสัมพันธ์ของคราบเลือดบนผ้าเวสต์พอยท์เป็นตามสมการ $y = 0.02222x + 0.2642$ ค่า $R^2 = 0.8545$

การประมาณอายุของคราบเลือดได้จากค่าความสัมพันธ์ระหว่างค่าร้อยละของพื้นที่ฟีก C (%C) กับอายุของคราบเลือด โดยที่ y แทนค่าร้อยละของพื้นที่ฟีก C (%C) และ x แทนอายุของคราบเลือด (วัน) โดยที่ค่าความสัมพันธ์ของคราบเลือดบนกระดาษกรองเป็นตามสมการ $y = 0.1623x + 34.215$ ค่า $R^2 = 0.7953$ ค่าความสัมพันธ์ของคราบเลือดบนผ้าโซลอนเป็นตามสมการ $y = 0.2184x + 35.648$ ค่า $R^2 = 0.9394$ และค่าความสัมพันธ์ของคราบเลือดบนผ้าเวสต์พอยท์เป็นตามสมการ $y = 0.0734x + 34.54$ ค่า $R^2 = 0.2812$

นอกจากนี้ยังสามารถประมาณอายุของคราบเลือดได้จากค่าความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละของพื้นที่ฟีก D (%D) กับอายุของคราบเลือด โดยที่ y แทนค่าร้อยละของพื้นที่ฟีก D (%D) และ x แทนอายุของคราบเลือด (วัน) โดยที่ค่าความสัมพันธ์ของคราบเลือดบนกระดาษกรองเป็นตามสมการ $y = 0.0603x + 8.958$ ค่า $R^2 = 0.9612$ ค่าความสัมพันธ์ของคราบเลือดบนผ้าโซลอนเป็นตามสมการ $y = 0.0315x + 9.2755$ ค่า $R^2 = 0.4626$ และค่าความสัมพันธ์ของคราบเลือดบนผ้าเวสต์พอยท์เป็นตามสมการ $y = 0.00531x + 9.1604$ ค่า $R^2 = 0.9181$

การประมาณอายุของคราบเลือดจะสามารถเชื่อมโยงถึงระยะเวลาที่คราบเลือดจะสามารถ ถูกนำมาใช้เป็นวัตถุพยาน และเวลาที่อาชญากรรมถูกก่อขึ้นได้ ในทางตรงกันข้าม ผลที่ได้นี้อาจจะช่วยในการคัดแยกตัวอย่างที่ไม่ตรงกับเวลาที่อาชญากรรมถูกก่อขึ้นได้อีกด้วย ซึ่งถ้ามีคราบ

เลือดในคดีเกิดขึ้น อัตราส่วนของพื้นที่พีค D ต่อ พื้นที่พีค C (D/C) ค่าร้อยละของพื้นที่พีค C (%C) และค่าร้อยละของพื้นที่พีค D (%D) จะมีศักยภาพในการนำมาใช้ประมาณเวลาการก่ออาชญากรรมที่เกิดขึ้น ซึ่งคราบเลือดปริมาณเล็กน้อยก็เพียงพอที่จะใช้ทดสอบได้

ข้อเสนอแนะ

ในการศึกษาครั้งนี้เป็นการทดสอบขั้นต้นเพื่อศึกษาวิธีการประมาณอายุของคราบเลือด โดยเทคนิค HPLC สำหรับผู้ที่สนใจที่จะศึกษาต่อไปเพื่อสามารถนำผลที่ได้ไปใช้ในงานด้านนิติวิทยาศาสตร์ต่อไปนั้น มีข้อเสนอแนะดังนี้

1. ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนในคราบเลือดในช่วงระยะเวลาที่มากขึ้น
2. ศึกษาว่าพีคต่างๆ ที่เกิดขึ้นนั้นเป็นพีคของสารหรือโปรตีนชนิดใด
3. ติดตามการเปลี่ยนแปลงของพีคที่เกิดจากโปรตีนชนิดอื่นๆ
4. ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนในคราบเลือดที่อยู่บนวัสดุชนิดต่างๆ
5. ศึกษาวิธีการสกัด โปรตีนจากคราบเลือดบนวัสดุชนิดต่างๆ

บรรณานุกรม

ภาษาไทย

ชูชาติ อารีจิตรานุสรณ์. เครื่องมือวิทยาศาสตร์ scientific instruments. กรุงเทพฯ: คลังนานาวิทยา, 2544.

ทัศนัยณี จันทนยิ่งยง. “เลือดและธนาคารเลือดในประเทศไทย.” สารานุกรมไทยฉบับราชบัณฑิตยสถาน 8 (2539): 207-225.

ธาดา สืบหลินวงศ์, นวลทิพย์ กมลวารินทร์. ชีวเคมีทางการแพทย์. พิมพ์ครั้งที่ 4. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2542.

พัฒนา เหล่าไพบูลย์. โครมาโตกราฟีแบบของเหลวแรงดันสูง : หลักการและการประยุกต์ใช้. ขอนแก่น: ขอนแก่นการพิมพ์, 2547.

วัชร ชาติกิตติคุณวงศ์. โครมาโตกราฟีของเหลวที่มีสมรรถนะสูง. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยรามคำแหง, 2544.

สรรเสริญ ทรัพย์โตษก, บรรณาธิการ. ตำราปฏิบัติการชีวเคมีเบื้องต้น. กรุงเทพฯ: จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2541.

อรทัย ตั้งวรสิทธิชัย. คู่มือปฏิบัติการเทคนิคการแพทย์. พิษณุโลก: มหาวิทยาลัยนเรศวร, 2543.

อรรถพล เข้มสุวรรณวงศ์, พล.ต.อ. และคณะ. นิติวิทยาศาสตร์ 1 เพื่อการสืบสวนสอบสวน. พิมพ์ครั้งที่ 4. กรุงเทพฯ: บริษัท ทีซีจี พรินติ้ง จำกัด, 2546.

ภาษาต่างประเทศ

Anderson, S et al. “A method for determining the age of a bloodstain.” Forensic Science International 148,1 (February 2005) : 37-45.

Andrasko, J., and Bjorn Rosen. “Sensitive Identification of Hemoglobin in Bloodstains from Different Species by Highperformance Liquid Chromatography with Combined UV and Fluorescence Detection.” J. Forensic Sci 39,4 (July 1994) : 1018-1025.

Andrasko, J. “The estimation age of bloodstains by HPLC analysis.” J. Forensic Sci 42, 4 (July 1997) : 601-607.

Bauer, M. “Detection of epithelial cells in dried blood stains by reverse transcriptase polymerase chain reaction.” J. Forensic Sci 44, 6 (November 1999) : 1232–1236.

Coagulation [Online]. Accessed 1 October 2009. Available from <http://en.wikipedia.org/wiki/Coagulation>

Cox, M. "A study of the sensitivity and specificity of 4 presumptive tests for blood." J. Forensic Sci 36,5 (September 1991) : 1503-1511.

Fiori, A. Detection and Identification of Bloodstains: Methods of Forensic Science. vol. 1. New York : Interscience, 1962.

Gill, P. "Role of short tandem repeat DNA in forensic casework in the UK past,present, and future perspectives." Biotechniques 32, 2 (February 2002) : 366-385.

Hemoglobin [Online]. Accessed 1 October 2009. Available from <http://porpax.bio.miami.edu/~cmallery/150/chemistry/hemoglobin.jpg>

Inoue, H et al. "Identification of fetal hemoglobin and simultaneous estimation of bloodstain age by high performance liquid chromatography." Int. J. Leg. Med 104,3 (May 1991) : 127-131.

Inoue, H et al. "A New Marker for Estimation of Bloodstain Age by High Performance Liquid Chromatography." Forensic Sci. Int 57, (November 1992) : 17-27.

Inoue, H. "Degradation profile of mRNA in a dead rat body: basic semi quantification study." Forensic Sci. Int 130, 2-3 (December 2002) : 127-132.

Quickenden, T.I. Cooper, P.D. "Increasing the specificity of the forensic luminal test for Blood." Luminescence 16, 3 (May-June 2001) : 251-253.

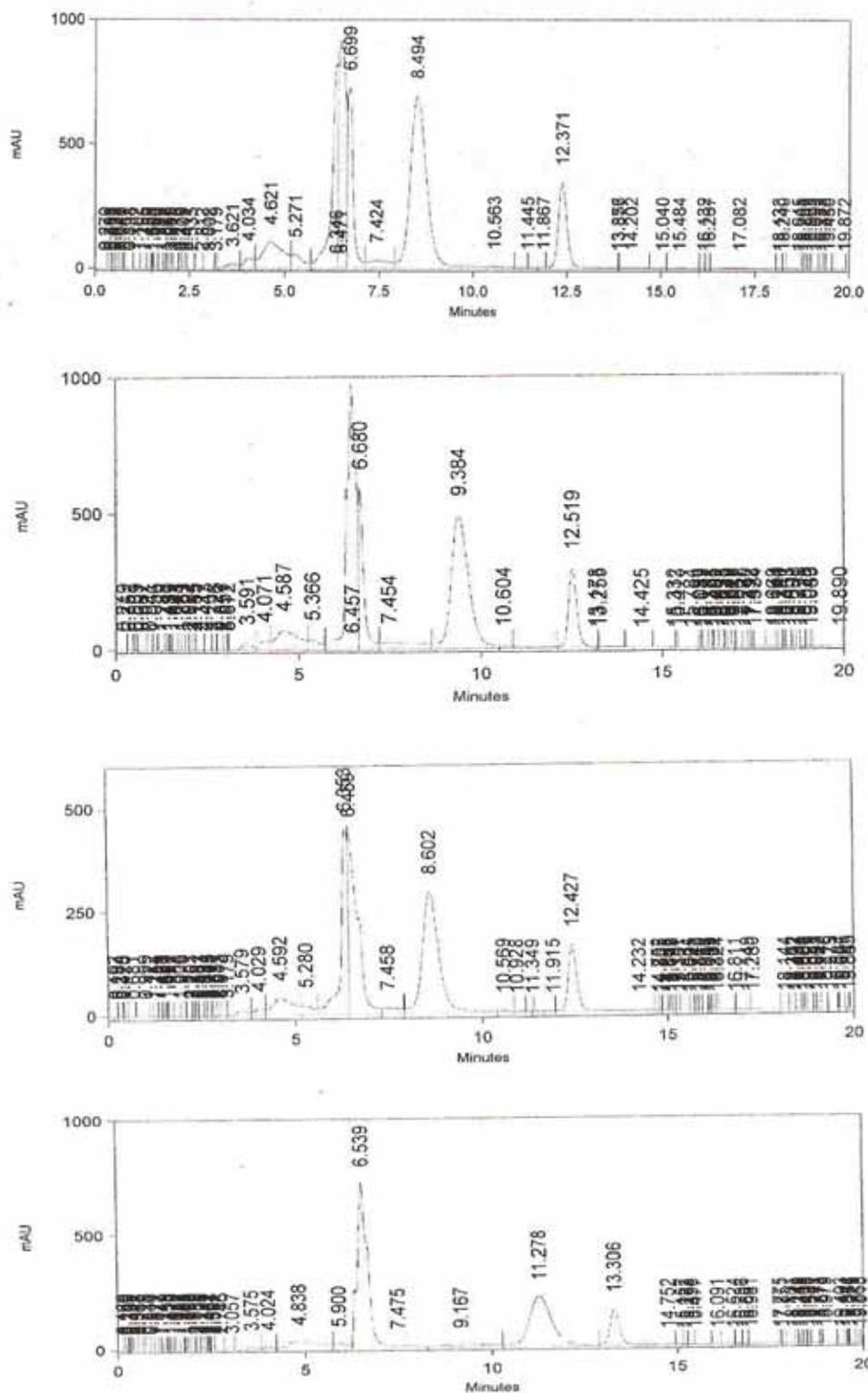
Strasser S et al. "Age determination of blood spots in forensic medicine by force Spectroscopy." Forensic Sci. Int 170, 1 (July 2007) : 8-14.

ภาคผนวก ก

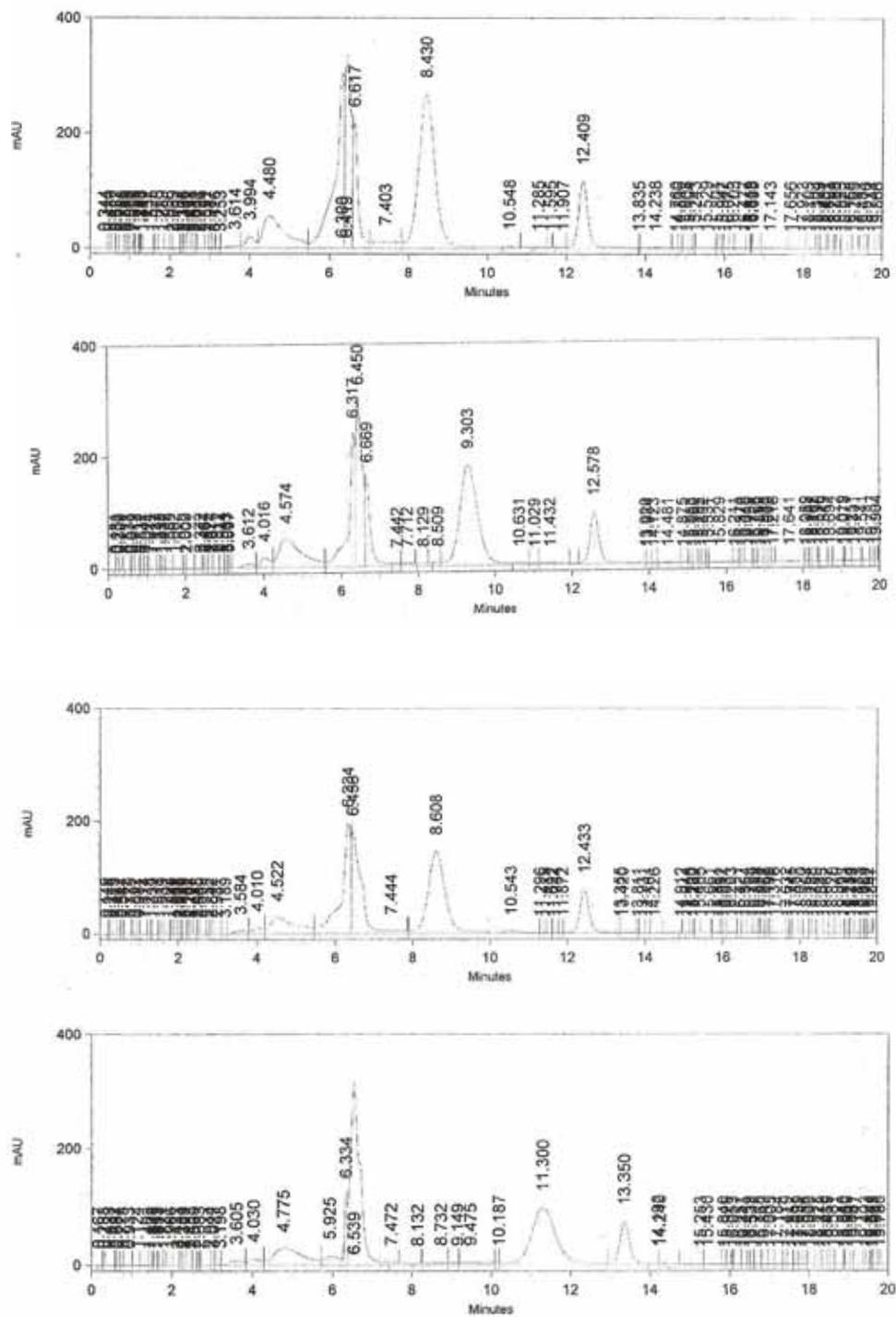
โครมาโตแกรมจากสารสกัดปราบเลือดบนกระดาษกรอง

ภาคผนวก ก

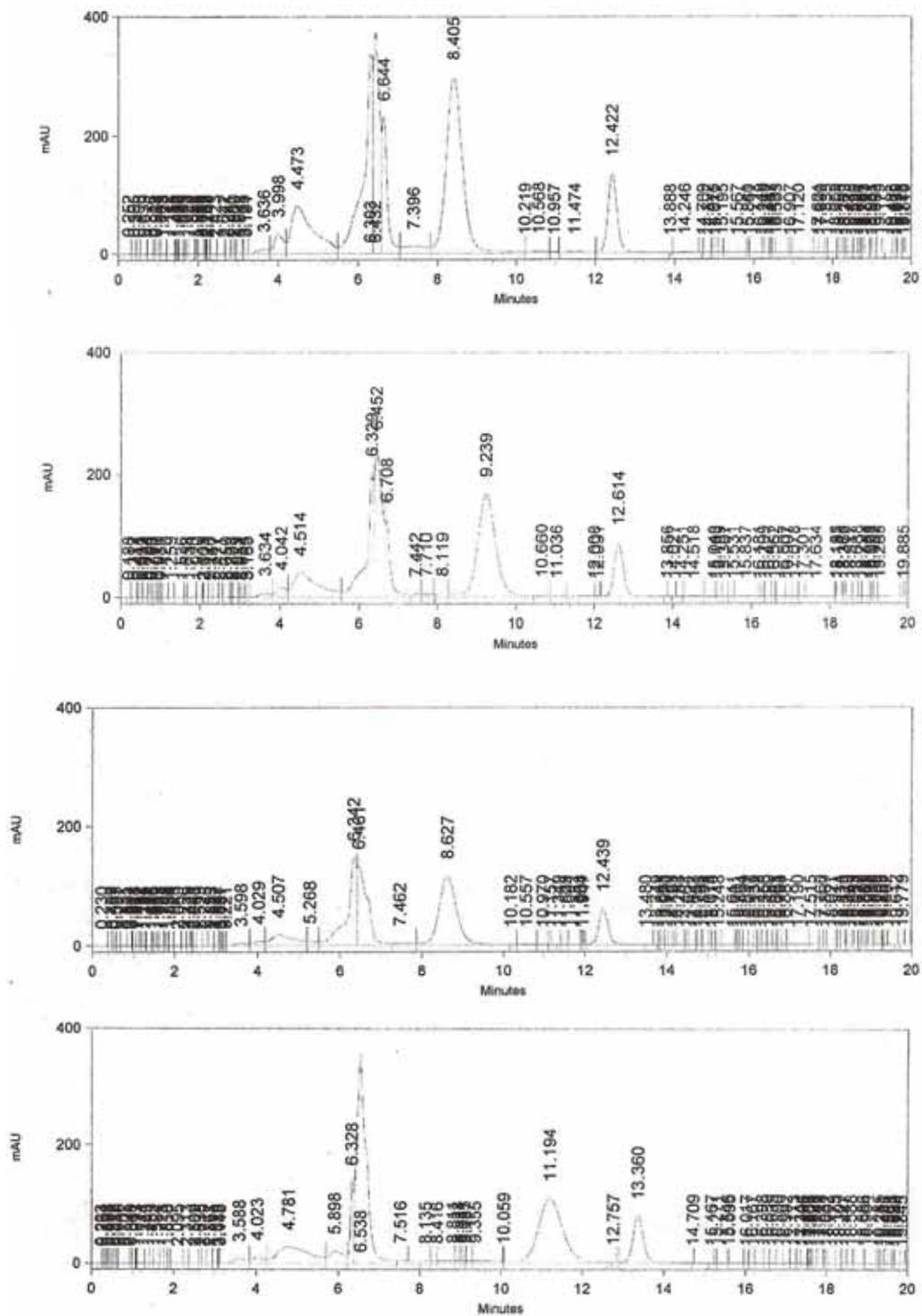
โครมาโตแกรมจากสารสกัดปราบเลือดบนกระดาษกรอง



ภาพที่ 39 แสดงโครมาโตแกรมจากสารสกัดคราบเลือดบนกระดาษกรอง (filter paper) Whatman เบอร์ 5 จากอาสาสมัครเพศชาย คนที่ 1 ในช่วงระยะเวลา 1 4 14 และ 21 วัน



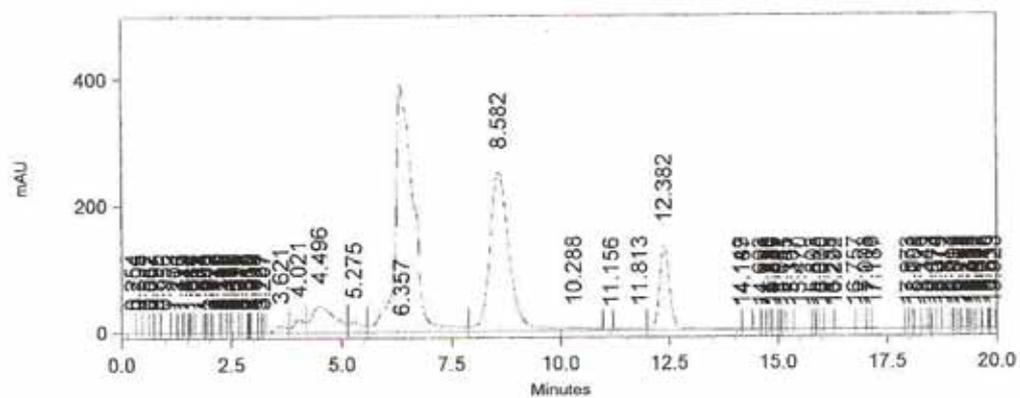
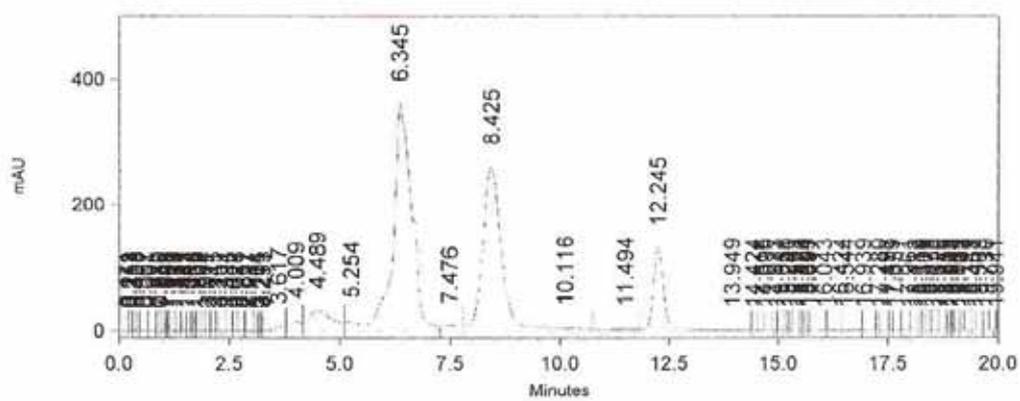
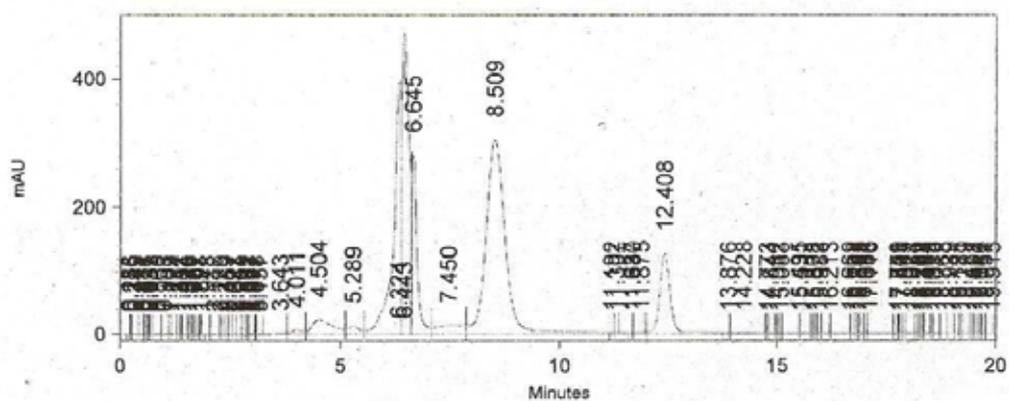
ภาพที่ 41 แสดงโครมาโตแกรมจากสารสกัดคราบเลือดบนกระดาษกรอง (filter paper) Whatman เบอร์ 5 จากอาสาสมัครเพศหญิง คนที่ 1 ในช่วงระยะเวลา 1 4 14 และ 21 วัน



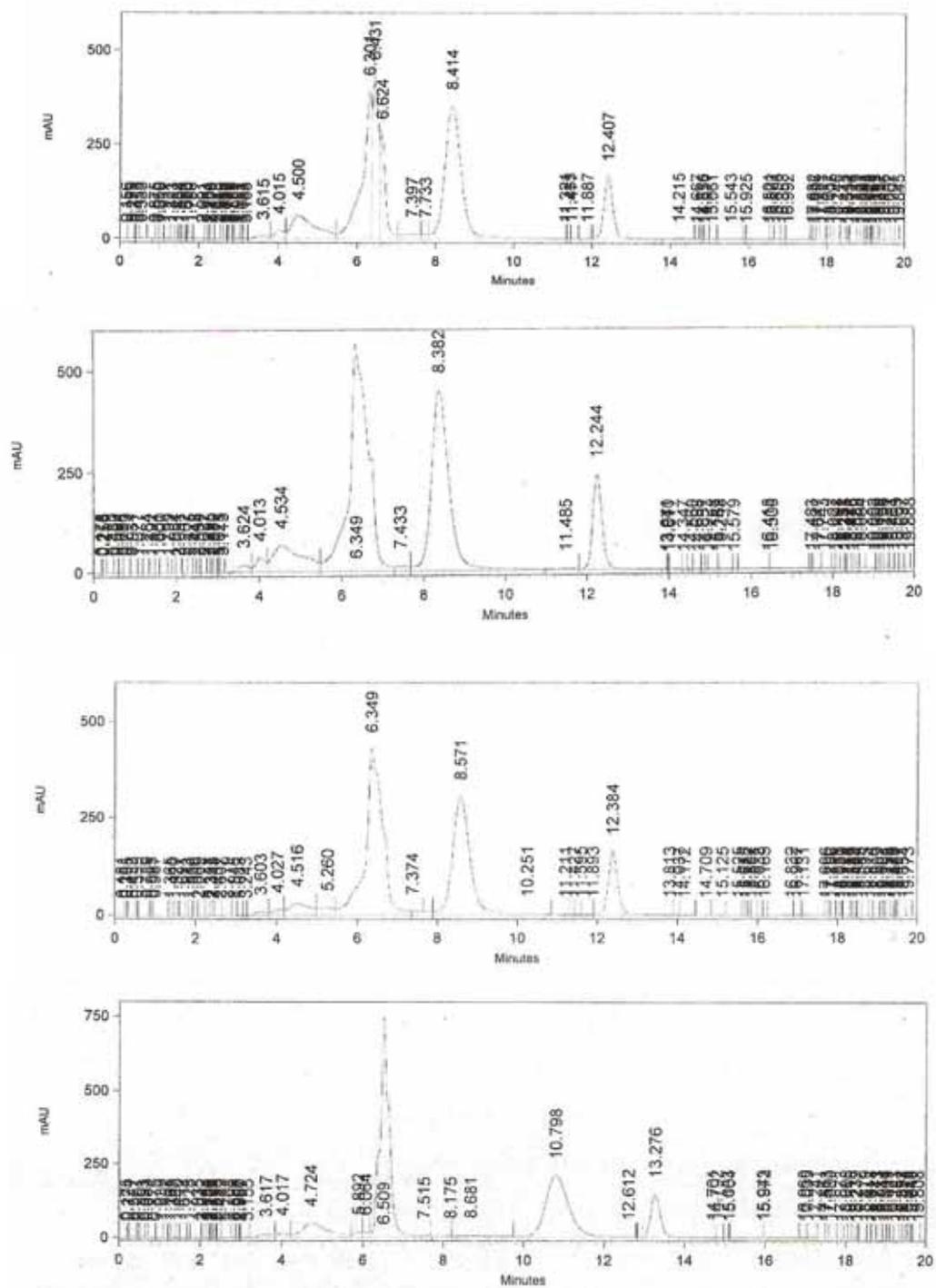
ภาพที่ 42 แสดงโครมาโตแกรมจากสารสกัดคราบเลือดบนกระดาษกรอง (filter paper) Whatman เบอร์ 5 จากอาสาสมัครเพศหญิง คนที่ 2 ในช่วงระยะเวลา 1 4 14 และ 21 วัน

ภาคผนวก ข

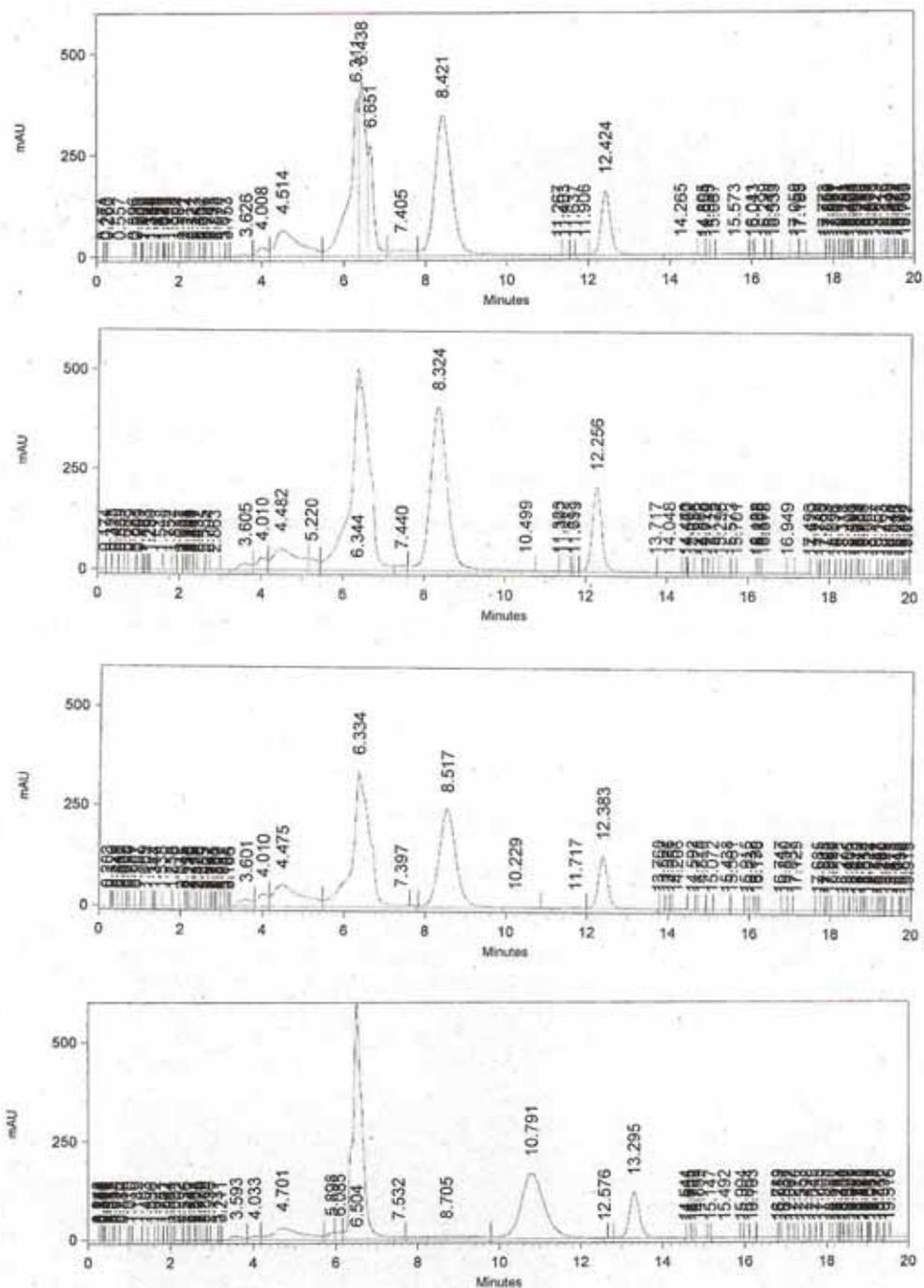
โครมาโตแกรมจากสารสกัดปราบเลือดบนผ้าไซลอน



ภาพที่ 43 แสดงโครมาโตแกรมจากสารสกัดปราบเลือดบนผ้าโซลอน (solon) จากอาสาสมัครเพศชาย คนที่ 1 ในช่วงระยะเวลา 19 และ 13 วัน



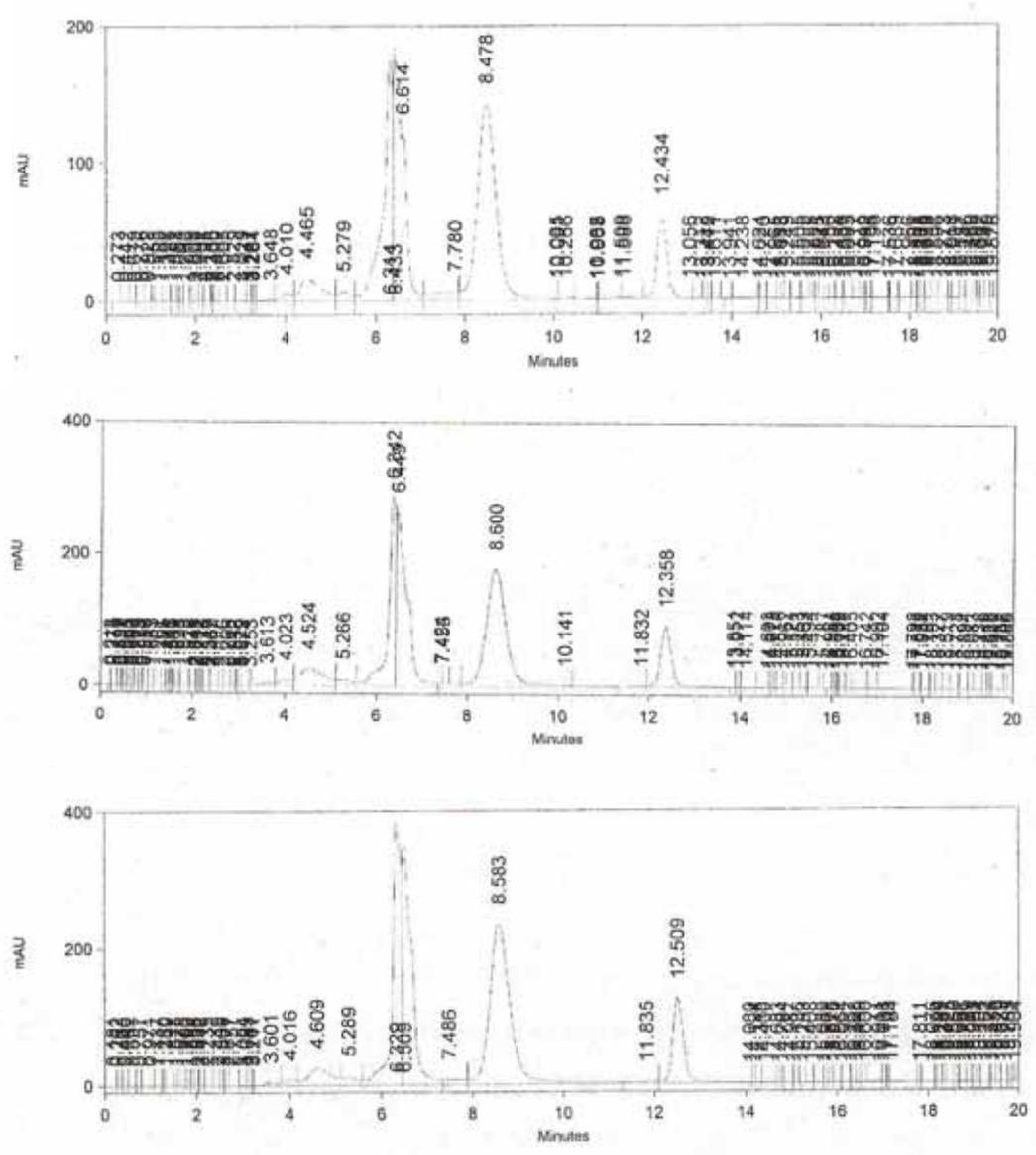
ภาพที่ 44 แสดงโครมาโตแกรมจากสารสกัดปราบเลือดบนผ้าไซลอน (solon) จากอาสาสมัครเพศชาย คนที่ 2 ในช่วงระยะเวลา 1 9 13 และ 20 วัน



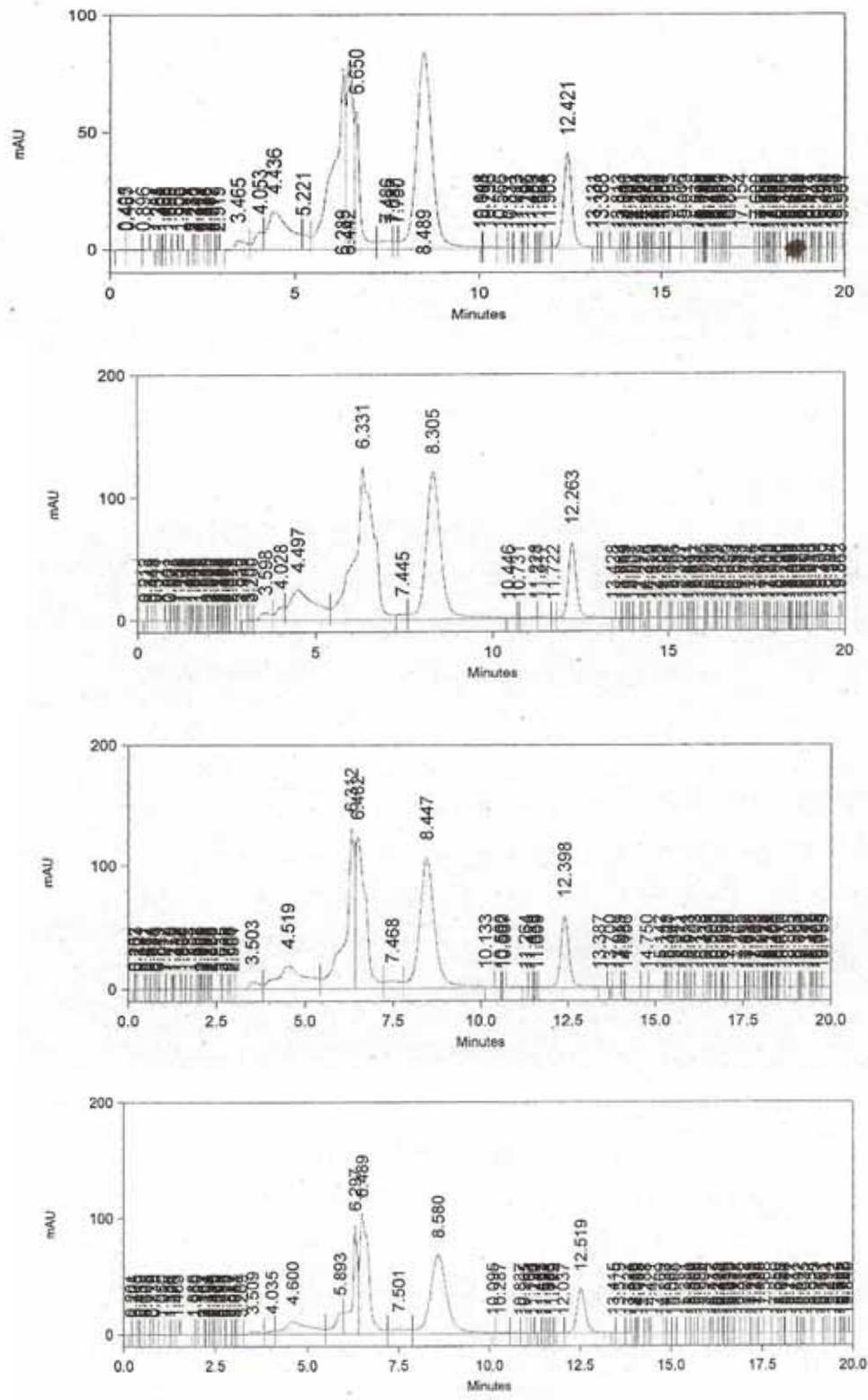
ภาพที่ 45 แสดงโครมาโตแกรมจากสารสกัดปราบเห็ดบนผ้าโซลอน (solon) จากอาสาสมัครเพศหญิง คนที่ 1 ในช่วงระยะเวลา 1 9 13 และ 20 วัน

ภาคผนวก ค

โครมาโตแกรมจากสารสกัดปราบเลือดบนผ้าเวสต์พอยท์



ภาพที่ 47 แสดงโครมาโตแกรมจากสารสกัดปราบเลือดบนผ้าเวสต์พอยท์ (westpoint) จากอาสาสมัครเพศชาย คนที่ 1 ในช่วงระยะเวลา 1 12 และ 15 วัน



ภาพที่ 49 แสดงโครมาโตแกรมจากสารสกัดปราบเลือดบนผ้าเวสต์พอยท์ (westpoint) จากอาสาสมัครเพศหญิง คนที่ 2 ในช่วงระยะเวลา 1 8 12 และ 15 วัน

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ-ชื่อสกุล นายกฤษณะ พวงระย้า
 ที่อยู่ 74 หมู่ 2 ตำบลช่องสะแก อำเภอเมือง จังหวัดเพชรบุรี 76000
 ที่ทำงาน คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี
 อำเภอเมือง จังหวัดเพชรบุรี

ประวัติการศึกษา

พ.ศ.2541 วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเคมี มหาวิทยาลัยศิลปากร
 พ.ศ.2549 ศึกษาต่อระดับปริญญาโท สาขาวิชานิติวิทยาศาสตร์
 บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

ประวัติการทำงาน

พ.ศ.2535-2543 พนักงานวิทยุ กรมสื่อสารทหารเรือ กองทัพเรือ
 พ.ศ.2545-2549 ครู โรงเรียนอรุณประดิษฐ์ จังหวัดเพชรบุรี
 พ.ศ.2549-ปัจจุบัน พนักงานมหาวิทยาลัย มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี จังหวัดเพชรบุรี