



## การประมาณอายุของคราบเลือดด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) Age Estimation of Bloodstains by High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

กฤษณะ พวงระย้า

Kridsana Poungraya

สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี เมือง เพชรบุรี 76000

Corresponding author. E-mail : kris\_sa\_na@hotmail.com

### บทคัดย่อ

การศึกษากการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนในคราบเลือดบนวัสดุ 3 ชนิด คือ กระดาษกรอง ผ้าโซลอน และ ผ้าเวสต์พอยท์เพื่อศึกษาวิธีการประมาณอายุของคราบเลือดด้วยเทคนิค HPLC พบว่าการเปลี่ยนแปลงของพีค C (เบตา-โกลบิน) สามารถใช้ในการประมาณอายุของคราบเลือดบนกระดาษกรอง และบนผ้าเวสต์พอยท์ได้ นอกจากนี้ยังสามารถประมาณอายุของคราบเลือดบนกระดาษกรองได้จากการเปลี่ยนแปลงของพีค D (แอลฟา-โกลบิน) ส่วนการเปลี่ยนแปลงบนผ้าทั้ง 2 ชนิดนั้น พบว่าค่าร้อยละของพื้นที่พีค D มีแนวโน้มลดลงอย่างไม่เป็นเส้นตรง

**คำสำคัญ :** นิติวิทยาศาสตร์ อายุของคราบเลือด โปรตีนในเลือด

### Abstract

This research studied the dynamics of proteins in the bloodstains on three types of material, including filter paper, Solon and Westpoint fabric clothes. The estimated age of the bloodstains was evaluated by HPLC. Result suggested that the transformation of peaks C (beta-globin) can be used to estimate the age of bloodstains on the filter paper and the fabric of Westpoint. Furthermore, the transformation of peak D (alpha-globin) can be used to estimate the bloodstain age on the filter paper. However, the changes of peak D in other types of cloth were not correlated well with the age of bloodstain.

**Keywords :** Forensic science, Age of blodstain, Blood protein



## บทนำ

ในทางนิติวิทยาศาสตร์การตรวจสอบพยานวัตถุที่เป็นคราบเลือดนั้น มีหลายวิธีที่ได้รับการยอมรับและมีการนำมาใช้ในกระบวนการยุติธรรม เช่น การพิสูจน์คราบเลือดโดยใช้ลูมินอล (luminol) หรือการระบุเอกลักษณ์บุคคลโดยการตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA finger print) [1] อย่างไรก็ตามความพยายามในการประมาณอายุของคราบเลือดยังคงเป็นปัญหาในการปฏิบัติงานด้านนิติวิทยาศาสตร์ เป็นเวลานานร้อยปีที่นักนิติวิทยาศาสตร์ค้นหาวิธีเพื่อระบุอายุที่แท้จริงและแม่นยำของคราบเลือด ในปัจจุบันมีงานวิจัยที่ศึกษาการหาอายุของคราบเลือดด้วยวิธี real-time PCR โดยหาความสัมพันธ์ระหว่างความคงทนของ rRNA และ mRNA กับอายุของคราบเลือด [2] นอกจากนี้ยังมีการศึกษาการเปลี่ยนแปลงอายุของคราบเลือด โดยใช้เทคนิค AFM (Atomic Force Microscopy) ในการถ่ายภาพเซลล์เม็ดเลือดแดงที่มีความละเอียดสูงและวัดค่าความยืดหยุ่นของคราบเลือดที่เปลี่ยนแปลงไป พบว่าความยืดหยุ่นของคราบเลือดจะลดลงเมื่อระยะเวลาผ่านไปมากขึ้น [3] มีการศึกษาการดูดกลืนแสง UV ของฮีโมโกลบินในคราบเลือดบนผ้าฝ้าย ผ้าโพลีเอสเตอร์ ฝ้ายยีนส์ และกระดาษ ที่อุณหภูมิต่างๆ พบการเปลี่ยนแปลง hypsometric shift อย่างรวดเร็วเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น [4] การศึกษาอายุของคราบเลือดโดยใช้ visible reflectance spectroscopy ติดตามการเปลี่ยนแปลงของคราบเลือดบนกระเบื้องเคลือบ (ใช้เลือดของม้าแทนเลือดของมนุษย์) โดยศึกษาสเปกตรัมที่เปลี่ยนแปลงในช่วงความยาวคลื่นระหว่าง 442-585 นาโนเมตร พบว่าการเปลี่ยนแปลงในบริเวณ  $\alpha$  band และ  $\beta$  band สามารถใช้ในการประมาณอายุของคราบเลือดได้ [5] นอกจากนี้มีการประยุกต์ใช้ Hyperspectral image analysis ในการประมาณอายุของคราบเลือดโดยพบความคลาดเคลื่อนเฉลี่ย  $\pm 0.27$  วัน ในคราบเลือดอายุ 7 วัน และมีความคลาดเคลื่อนเฉลี่ย

โดยรวม  $\pm 1.17$  วัน ในช่วงระยะ 30 วัน [6] อย่างไรก็ตาม จากวิธีการทั้งหมดที่กล่าวมาข้างต้น พบว่าผลของการประมาณอายุของคราบเลือดยังมีค่าความคลาดเคลื่อนเมื่อเปรียบเทียบกับอายุจริงของคราบเลือด

เทคนิคโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) ได้มีการนำมาใช้เพื่อทำนายอายุของคราบเลือด โดยศึกษาการเปลี่ยนแปลงเกี่ยวกับปริมาณองค์ประกอบของสายโซ่โกลบิน (globin chain) ซึ่งเป็นโปรตีนที่สำคัญในเม็ดเลือดแดงโดยพบการลดลงของอัตราส่วนระหว่างสายโซ่แอลฟา ( $\alpha$ -chain) กับฮีม (heme) เมื่ออายุของคราบเลือดสูงขึ้น [7] ต่อมา Inoue และคณะ [8] ได้รายงานการพบพีคที่มีพื้นที่พีค (peak area) เพิ่มขึ้นตามอายุของคราบเลือด โดยตั้งชื่อว่าพีค "X" ซึ่งไม่ปรากฏในโครมาโตแกรมของเลือดสด หลังจากนั้นมีการใช้ HPLC ศึกษาโปรตีนสามชนิดที่พบอยู่ในคราบเลือดโดยเรียกพีคที่พบทั้งสามว่า "X", "Y" และ "Z" โดยพบว่าโครมาโตแกรมของโปรตีนทั้งสามชนิดนี้สามารถใช้บอกอายุของคราบเลือดบนผ้าฝ้าย (cotton) ได้ถ้าทราบอุณหภูมิที่คราบเลือดนั้นถูกเก็บไว้ [9]

ปัจจุบันมีงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการหาอายุของคราบเลือดไม่มากนัก และงานวิจัยที่ได้มีผู้ศึกษาไว้แล้วยังไม่มีการนำมาใช้ให้เกิดประโยชน์ในงานด้านนิติวิทยาศาสตร์ เนื่องจากยังไม่สามารถนำมาใช้หาอายุของคราบเลือดได้อย่างถูกต้องแม่นยำโดยเฉพาะอย่างยิ่งในประเทศไทยยังไม่มีการศึกษาวิจัยวิธีการประมาณอายุของคราบเลือดอย่างจริงจัง ดังนั้นการศึกษาวิจัยการประมาณอายุของคราบเลือดให้เห็นผลอย่างจริงจังและครอบคลุมน่าจะสามารถนำมาใช้ให้เกิดประโยชน์ในงานด้านนิติวิทยาศาสตร์ต่อไปได้ ซึ่งงานวิจัยนี้เป็นการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนของเลือดในระยะเวลาต่างๆ ที่คราบเลือดได้ถูกเก็บไว้ โดยวิธีโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC)



## วิธีดำเนินการวิจัย

### 1. การเตรียมตัวอย่าง

#### 1.1 การเตรียมคราบเลือด

เตรียมตัวอย่างคราบเลือดบนกระดาษกรอง (filter paper) Whatman เบอร์ 5 โดยเก็บตัวอย่างเลือดจากอาสาสมัครจำนวน 4 คน แล้วหยดเลือดปริมาตร 10  $\mu$ l ลงบนกระดาษกรอง (filter paper) เตรียมตัวอย่างคราบเลือดบนผ้าโซลอน (Solon) โดยเก็บตัวอย่างเลือดจากอาสาสมัครจำนวน 4 คน แล้วหยดเลือดปริมาตร 10  $\mu$ l ลงบนผ้าโซลอน เตรียมตัวอย่างคราบเลือดบนผ้าเวสต์พอยท์ (Westpoint) โดยเก็บตัวอย่างเลือดจากอาสาสมัครจำนวน 3 คน แล้วหยดเลือดปริมาตร 10  $\mu$ l ลงบนผ้าเวสต์พอยท์ จากนั้นทำให้แห้งโดยการผึ่งลมที่อุณหภูมิห้อง และเก็บไว้ในถุงพลาสติกที่แห้ง

#### 1.2 การสกัดคราบเลือด

ละลายคราบเลือดตัวอย่างออกจากวัสดุเพื่อนำไปวิเคราะห์ โดยการตัดตัวอย่างคราบเลือดขนาด 5 x 5 mm จากนั้นแช่ในน้ำปราศจากไอออน (deionized water) ในช่วงอายุของคราบเลือด 1, 7, 14, 21, 29, 62 และ 120 วัน ปริมาตร 400  $\mu$ l วางทิ้งไว้เป็นเวลา 20 นาที กรองด้วย syringe filter (Nylon) ขนาด 0.45  $\mu$ m

### 2. การเตรียมวัฏภาคเคลื่อนที่

วัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase) ประกอบด้วยสารละลายผสมระหว่างอะซิโตนในไตรล์กับน้ำปราศจากไอออน อัตราส่วน 1:1 และปรับให้เป็นกรดด้วยกรดไตรฟลูออโรอะซิติก ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 โดยปริมาตร จากนั้นกรองด้วย filter membrane (Nylon) ขนาด 0.45  $\mu$ m

### 3. การวิเคราะห์ตัวอย่างโดย HPLC

นำสารตัวอย่าง ปริมาตร 10  $\mu$ l ฉีดเข้าเครื่อง HPLC (SHIMADZU) โดยใช้สภาวะในการวิเคราะห์ดังนี้ Column : Viva (C4) 5  $\mu$ m 300 A° ขนาด 250 x 4.6 mm Mobile phase : acetonitrile : water (50:50)

Flow rate : 0.5 ml/min

Detector : diode array รุ่น SPD-M10A VP ความยาวคลื่นตรวจวัดเท่ากับ 254 nm

### 4. การวิเคราะห์ผล

บันทึกผลเป็นโครมาโตแกรมโดยบันทึกค่า retention time ค่า peak area และค่า percent peak area จากนั้นวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงปริมาณโปรตีนด้วย diode array detector ที่ความยาวคลื่น 254 nm คราบเลือดที่ศึกษาประกอบด้วยคราบเลือดบนกระดาษกรองผ้าโซลอนและผ้าเวสต์พอยท์

#### 4.1 วิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของโปรตีนในคราบเลือด

ศึกษาอัตราการเปลี่ยนแปลงค่าร้อยละของพื้นที่พีค C และ D ของคราบเลือดบนผ้าโซลอนในช่วงอายุของคราบเลือด 1, 6, 13, 20, 30, 45, 62 และ 120 วัน

ศึกษาอัตราการเปลี่ยนแปลงค่าร้อยละของพื้นที่พีค C และ D ของคราบเลือดบนผ้าเวสต์พอยท์ ในช่วงอายุของคราบเลือด 1, 8, 15, 24, 31, 45, 62 และ 120 วัน

### ผลการศึกษา

ศึกษาอัตราการเปลี่ยนแปลงค่าร้อยละของพื้นที่พีค C และ D ของคราบเลือดบนกระดาษกรอง

#### 1. เปรียบเทียบโครมาโตแกรมของโปรตีนจากคราบเลือดบนวัสดุต่างชนิด

การวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของโปรตีนที่สกัดจากคราบเลือดบนวัสดุ 3 ชนิด คือ กระดาษกรอง ผ้าโซลอน และผ้าเวสต์พอยท์ด้วยเทคนิค HPLC โดยวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงปริมาณโปรตีนที่ความยาวคลื่น 254 nm ผลการวิเคราะห์เป็นโครมาโตแกรมซึ่งแสดงให้เห็นลักษณะของพีคและค่า retention time ของแต่ละพีค ตัวอย่างโครมาโตแกรมบนวัสดุทั้ง 3 ชนิด ที่ได้จากการสกัดโปรตีนจากคราบเลือดอายุ 1 วัน ดังแสดงใน Figure 1-3

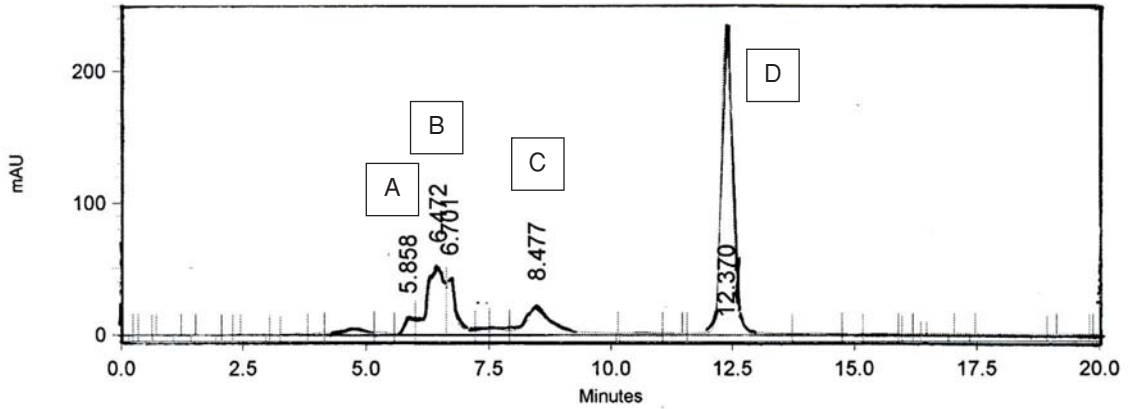


Figure 1. Chromatogram of bloodstains on the filter paper at day 1

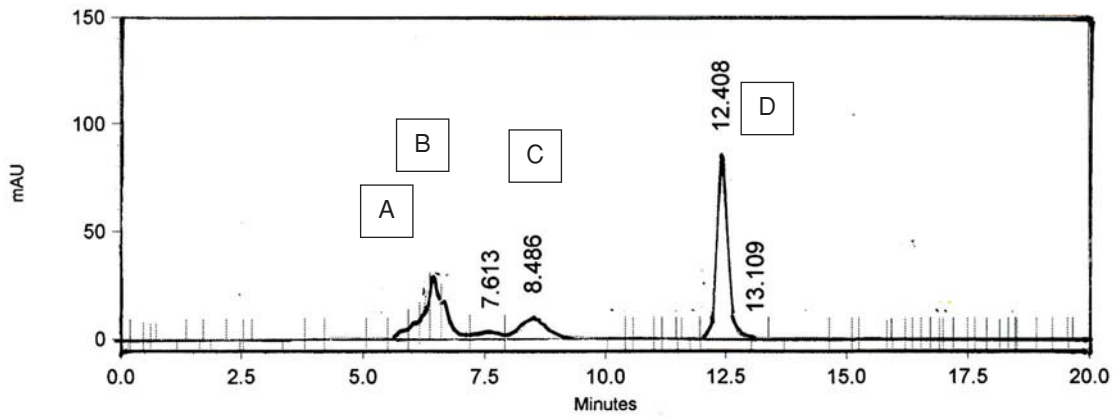


Figure 2. Chromatogram of bloodstains on the Salon fabric cloth at day 1

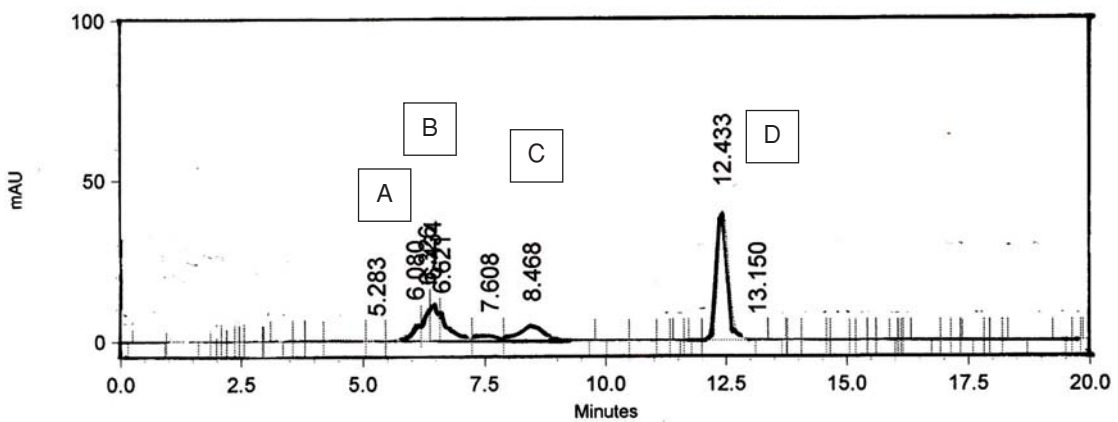


Figure 3. Chromatogram of bloodstains on the Westpoint fabric cloth at day 1

Figure 1 แสดงโครมาโตแกรมของโปรตีน จากคราบเลือดบนกระดาษกรอง พบพีค A B C และ D ที่  $t_R$  เท่ากับ 5.858, 6.472, 8.477 และ 12.370 ส่วน Figure 2 แสดงโครมาโตแกรมของโปรตีนจากคราบเลือดบนผ้าซาลอน พบพีค A, B, C และ D ที่  $t_R$  เท่ากับ 6.090, 6.444, 8.486 และ 12.408 และ Figure 3 แสดงโครมาโตแกรมของโปรตีนจากคราบเลือดบนผ้าเวทส์พอยท์ พบพีค A, B, C และ D ที่  $t_R$  เท่ากับ 6.080, 6.434, 8.468 และ 12.433 นาที ตามลำดับ

2. วิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของโปรตีนในคราบเลือดบนกระดาษกรอง

การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนในคราบเลือดโดยเปรียบเทียบโครมาโตแกรมของโปรตีนจากคราบเลือดตัวอย่างบนกระดาษกรอง พบว่าเมื่ออายุของคราบเลือดมากขึ้นพื้นที่ที่พีคในโครมาโตแกรมเปลี่ยนแปลงไปพบว่าเมื่อคราบเลือดมีอายุมากขึ้นค่าร้อยละของพื้นที่ที่พีค C (%C) มีแนวโน้มลดลงเหมือนกันในคราบเลือดทั้ง 4 ตัวอย่าง เมื่อนำค่าเฉลี่ยร้อยละของพื้นที่ที่พีค C มาสร้างกราฟความสัมพันธ์กับอายุของคราบเลือดดังแสดงใน Figure 4

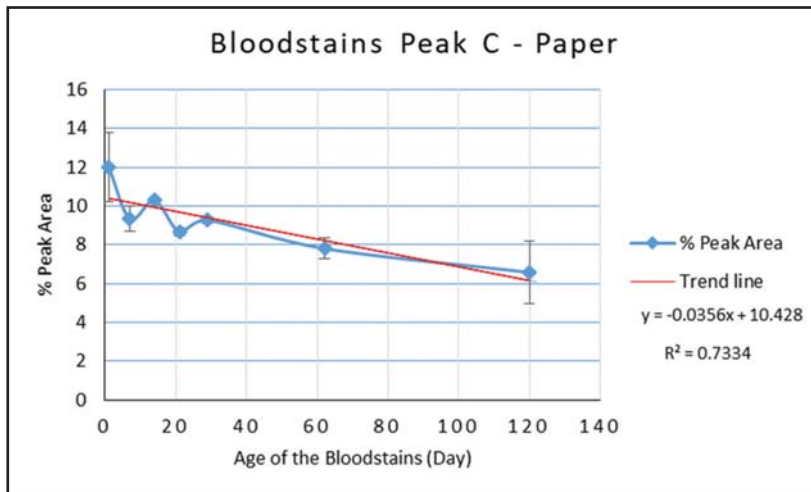
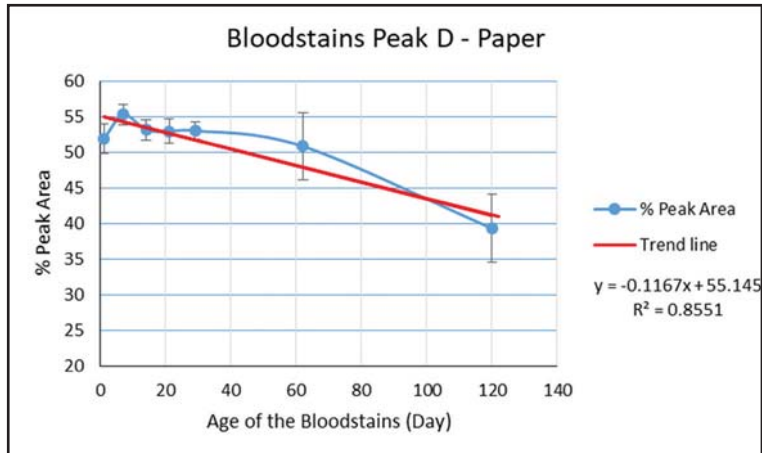


Figure 4. The relation between age of bloodstains (days) and the average percent peak area of C (average% C) on the filter paper

เมื่อคราบเลือดมีอายุมากขึ้นค่าร้อยละของพื้นที่ที่พีค D (%D) มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นในช่วง 7 วันแรก หลังจากนั้นจะมีแนวโน้มลดลงจนถึงวันที่ 120 เหมือนกัน

ในคราบเลือดทั้ง 4 ตัวอย่าง เมื่อนำค่าเฉลี่ยร้อยละของพื้นที่ที่พีค D มาสร้างกราฟความสัมพันธ์กับอายุของคราบเลือดดังแสดงใน Figure 5

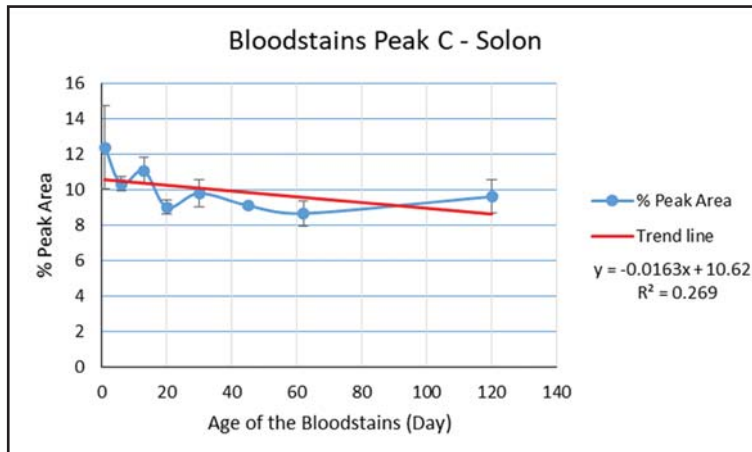


**Figure 5.** The relation between age of bloodstains (days) and the average percent peak area of D (average% D) on the paper

### 3. วิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของโปรตีนในคราบเลือดบนผ้าไซลอน

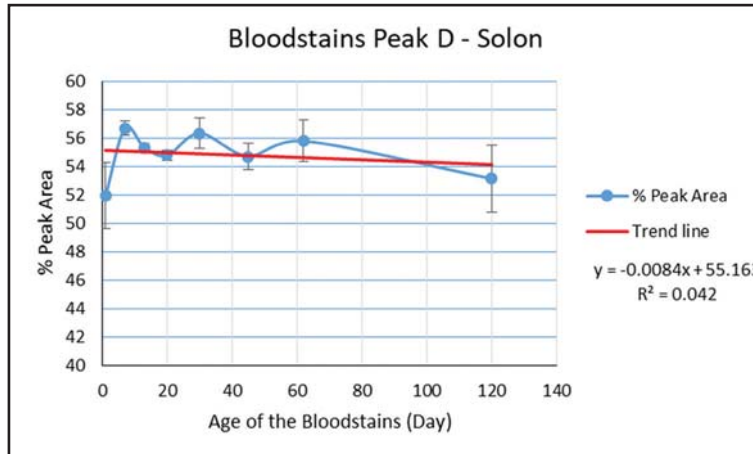
การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนในคราบเลือดโดยเปรียบเทียบโครมาโตแกรมของโปรตีนจากคราบเลือดตัวอย่างบนผ้าไซลอน พบว่าเมื่ออายุ

ของคราบเลือดมากขึ้นพื้นที่ที่พิกในโครมาโตแกรมเปลี่ยนแปลงไป โดยค่าร้อยละของพื้นที่พิก C มีแนวโน้มลดลงเหมือนกันในคราบเลือดทั้ง 4 ตัวอย่าง เมื่อนำค่าเฉลี่ยร้อยละของพื้นที่พิก C มาสร้างกราฟความสัมพันธ์กับอายุของคราบเลือดดังแสดงใน Figure 6



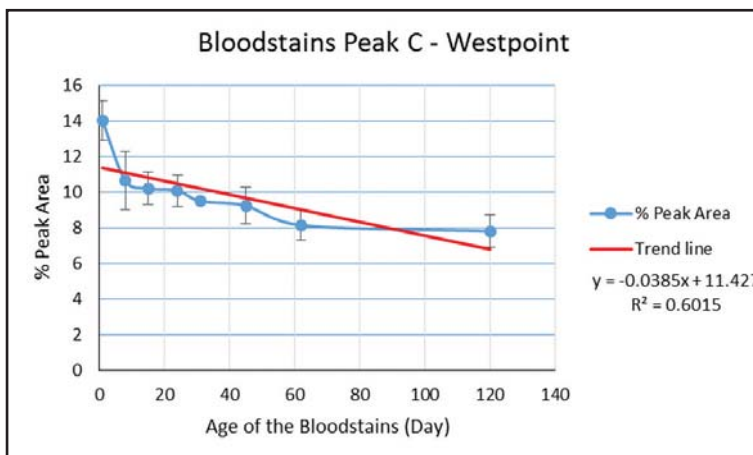
**Figure 6.** The relation between age of bloodstains (days) and the average percent peak area of C (average% C) on the Solon fabric cloth

เมื่อคราบเลือดมีอายุมากขึ้นค่าร้อยละของ ค่าเฉลี่ยร้อยละของพื้นที่ที่พีด D มาสร้างกราฟความสัมพันธ์ พื้นที่ที่พีด D (%D) มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นในช่วง 7 วันแรก กับอายุของคราบเลือด (Figure 7) หลังจากนั้นก็มีแนวโน้มลดลงจนถึงวันที่ 120 เมื่อนำ



**Figure 7.** The relation between age of bloodstains (days) and the average percent peak area of D (average% D) on the Solon fabric cloth

4. วิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของโปรตีนในคราบเลือด เมื่อคราบเลือดมีอายุมากขึ้นค่าร้อยละของพื้นที่ที่พีด C บนผ้าเวสต์พอยท์ (Figure 8) มีแนวโน้มลดลงเหมือนกันในคราบเลือดทั้ง การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนจาก 3 ตัวอย่าง เมื่อนำค่าเฉลี่ยร้อยละของพื้นที่ที่พีด C มาสร้าง กราบความสัมพันธ์กับอายุของคราบเลือดดังแสดงใน คราบเลือดมากขึ้นพื้นที่ที่พีดมีการเปลี่ยนแปลงไป พบว่า Figure 8

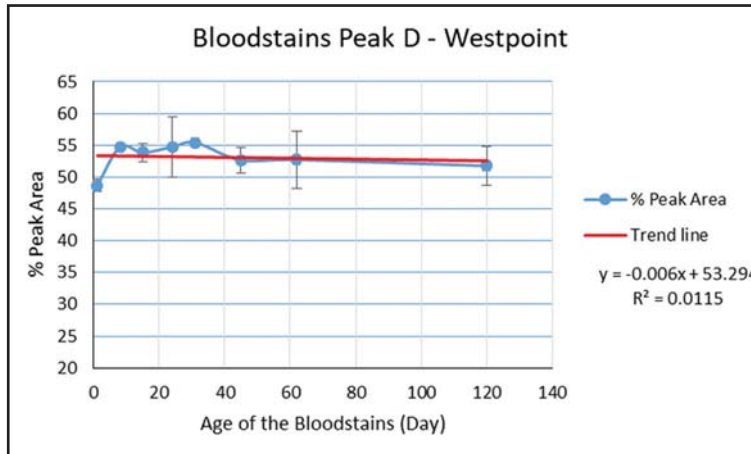


**Figure 8.** The relation between age of bloodstains (days) and the average percent peak area of C (average% C) on the Westpoint fabric cloth



เมื่อคราบเลือดมีอายุมากขึ้นค่าร้อยละของพื้นที่พีค D (%D) มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นในช่วง 31 วันแรก หลังจากนั้นก็มีแนวโน้มลดลงจนถึงวันที่ 120 เช่นเดียวกัน

ในคราบเลือดทั้ง 3 ตัวอย่าง เมื่อนำค่าเฉลี่ยร้อยละของพื้นที่พีค D มาสร้างกราฟความสัมพันธ์กับอายุของคราบเลือด (Figure 9)



**Figure 9.** The relation between age of bloodstains (days) and the average percent peak area of D (average% D) on the Westpoint fabric cloth

## อภิปรายผล

จากผลการวิจัยการประมาณอายุของคราบเลือด โดยวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของโปรตีนด้วยเทคนิค HPLC ผลการวิเคราะห์แสดงให้เห็นโครมาโตแกรมของโปรตีนที่สกัดได้จากตัวอย่างคราบเลือดบนวัสดุ 3 ชนิด คือ กระดาษกรอง ผ้าซาลอน และผ้าเวสต์พอยท์โครมาโตแกรมของคราบเลือดทุกตัวอย่างพบพีคที่มีพื้นที่พีคสูงเด่นชัดจำนวน 4 พีค ซึ่งผู้วิจัยตั้งชื่อว่า พีค A, B, C และ D (Figure 1, 2 และ 3) จากโครมาโตแกรมพบว่าพีค A และพีค B มีการซ้อนทับกัน ส่วนพีค C และพีค D เป็นพีคเดี่ยวที่มีความเด่นชัดสามารถนำมาใช้ในการวิเคราะห์หาอายุของคราบเลือดได้ ซึ่งจากการเปรียบเทียบลักษณะและตำแหน่งของพีคที่มีผู้รายงานการศึกษาสารสกัดจากคราบเลือดบนกระดาษกรอง ของสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ โดยใช้ Supercosil<sub>C4</sub> column วิเคราะห์ด้วยระบบ gradient ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 220 nm 254 nm และตรวจวัดด้วย fluorescence พบว่า HPLC สามารถแยกฮีโมโกลบินออกได้หลายพีค และพีคหลักที่ตรวจพบที่

ความยาวคลื่นสั้น ได้แก่ heme และ globin chain โดยที่พีคของ heme สามารถตรวจพบได้ที่ retention time เดียวกันในทุกๆ สปีชีส์ [10] นอกจากนี้ยังมีการศึกษาซึ่งสามารถใช้ในการยืนยันพีคที่ตรวจพบว่าตำแหน่งที่เกิดพีค C คือตำแหน่งของเบตา-โกลบิน ( $\beta$ -globin) และตำแหน่งที่เกิดพีค D คือตำแหน่งของแอลฟา-โกลบิน ( $\alpha$ -globin) [8] ซึ่งผลการวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของค่าร้อยละพื้นที่พีค C และ D ตามอายุของคราบเลือดได้ผลดังนี้

จาก Figure 4 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างอายุของคราบเลือด กับค่าเฉลี่ยร้อยละของพื้นที่พีค C บนกระดาษกรองที่มีการเปลี่ยนแปลงในระยะเวลา 120 วัน พบว่าเมื่ออายุของคราบเลือดเพิ่มขึ้น ค่าร้อยละของพื้นที่พีค C มีแนวโน้มลดลง ซึ่งสัมพันธ์กับระยะเวลา โดยค่าความสัมพันธ์เป็นตามสมการ

$$y = -0.0356x + 10.428 \quad R^2 = 0.7334 \quad (1)$$



ขณะที่การเปลี่ยนแปลงในระยะเวลา 120 วันของคราบเลือดบนกระดาษกรองที่พบว่าเมื่ออายุของคราบเลือดเพิ่มขึ้น ค่าร้อยละของพื้นที่ฟีด D มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นในช่วง 7 วันแรก หลังจากนั้นจะมีแนวโน้มลดลงจนถึงวันที่ 120 ซึ่งสัมพันธ์กับอายุของคราบเลือด โดยค่าความสัมพันธ์เป็นตามสมการ

$$y = -0.1167x + 55.145 \quad R^2 = 0.8551 \quad (2)$$

จาก Figure 6 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างอายุของคราบเลือด (days) กับค่าเฉลี่ยร้อยละของพื้นที่ฟีด C (average % C) จากโครมาโตแกรมของคราบเลือดบนผ้าไซลอน ที่มีการเปลี่ยนแปลงในระยะเวลา 120 วัน พบว่าเมื่ออายุของคราบเลือดเพิ่มขึ้น ค่าร้อยละของพื้นที่ฟีด C มีแนวโน้มลดลง ซึ่งสัมพันธ์กับระยะเวลา (วัน) โดยค่าความสัมพันธ์เป็นตามสมการ

$$y = -0.0163x + 10.621 \quad R^2 = 0.269 \quad (3)$$

จาก Figure 7 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างอายุของคราบเลือดกับค่าเฉลี่ยร้อยละของพื้นที่ฟีด D จากโครมาโตแกรมของคราบเลือดบนผ้าไซลอน ที่มีการเปลี่ยนแปลงในระยะเวลา 120 วัน พบว่าเมื่ออายุของคราบเลือดเพิ่มขึ้น ค่าร้อยละของพื้นที่ฟีด D มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นในช่วง 7 วันแรก หลังจากนั้นจะมีแนวโน้มลดลงจนถึงวันที่ 120 โดยค่าความสัมพันธ์เป็นตามสมการ

$$y = -0.0084x + 55.163 \quad R^2 = 0.042 \quad (4)$$

จาก Figure 8 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างอายุของคราบเลือดกับค่าเฉลี่ยร้อยละของพื้นที่ฟีด C จากโครมาโตแกรมของคราบเลือดบนผ้าเวสต์พอยท์ ที่มีการเปลี่ยนแปลงในระยะเวลา 120 วัน พบว่าเมื่ออายุของคราบเลือดเพิ่มขึ้น ค่าเฉลี่ยร้อยละของพื้นที่ฟีด C มี

แนวโน้มลดลง ซึ่งสัมพันธ์กับระยะเวลา โดยค่าความสัมพันธ์เป็นตามสมการ

$$y = -0.0385x + 11.427 \quad R^2 = 0.60150 \quad (5)$$

จาก Figure 9 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างอายุของคราบเลือด กับค่าเฉลี่ยร้อยละของพื้นที่ฟีด D จากโครมาโตแกรมของคราบเลือดบนผ้าเวสต์พอยท์ ที่มีการเปลี่ยนแปลงในระยะเวลา 120 วัน พบว่าเมื่ออายุของคราบเลือดเพิ่มขึ้น ค่าเฉลี่ยร้อยละของพื้นที่ฟีด D มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นในช่วง 31 วันแรก หลังจากนั้นจะมีแนวโน้มลดลงจนถึงวันที่ 120 โดยค่าความสัมพันธ์เป็นตามสมการ

$$y = -0.006x + 53.294 \quad R^2 = 0.0115 \quad (6)$$

## สรุป

การใช้เทคนิค HPLC ในการประมาณอายุของคราบเลือดโดยใช้คอลัมน์ Viva (C4) 5  $\mu\text{m}$  300 A° ขนาดคอลัมน์ 250 x 4.6 mm พบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ คือ ใช้วัฏภาคเคลื่อนที่เป็น acetonitrile : water (50:50) อัตราการไหล 0.5 ml/min ตัวตรวจวัดแบบ diode array ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร สามารถประมาณอายุของคราบเลือดบนกระดาษกรองได้จากความสัมพันธ์ระหว่างอายุของคราบเลือด กับค่าร้อยละของพื้นที่ฟีด C (%C) (ค่า  $R^2 = 0.7334$ ) และร้อยละของพื้นที่ฟีด D (%D) (ค่า  $R^2 = 0.8551$ ) และสามารถประมาณอายุของคราบเลือดบนผ้าเวสต์พอยท์ได้จากความสัมพันธ์ระหว่างอายุของคราบเลือด กับค่าร้อยละของพื้นที่ฟีด C (%C) (ค่า  $R^2 = 0.6015$ ) ส่วนการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนในคราบเลือดบนผ้าไซลอนนั้นถึงแม้จะมีแนวโน้มลดลงแต่มีความเป็นเส้นตรงค่อนข้างต่ำจึงยังไม่เหมาะสมที่จะใช้ในการประมาณอายุ



ของคราบเลือดบนผ้าโซลลอน ซึ่งขอเสนอแนะผู้ที่สนใจ จะทำการศึกษาวิจัยต่อไปได้ทดลองศึกษาในสภาวะที่ แตกต่างเพื่อสามารถใช้ประมาณอายุของคราบเลือด บนวัสดุชนิดต่าง ๆ

### กิตติกรรมประกาศ

ในการวิจัยเรื่องการประมาณอายุของคราบเลือด ด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ผู้วิจัย ขอขอบคุณ มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรีที่สนับสนุน งบประมาณในการวิจัย ตลอดจนความร่วมมือจากศูนย์ วิทยาศาสตร์และวิทยาศาสตร์ประยุกต์ มหาวิทยาลัย ราชภัฏเพชรบุรี ที่ได้กรุณาอนุญาตให้ใช้สถานที่และ เครื่องมือในการวิจัย

### เอกสารอ้างอิง

1. Barni, F., Lewis, S.W., Berti, A., Miskelly, G.M. and Lago, G. 2007. Forensic application of the luminol reaction as a presumptive test for latent blood detection. *Talanta*. 72: 896-913.
2. Anderson, S., Howard, B., Hobbs, G.R. and Bishop, C.P. 2005. A Method for determining the age of a bloodstain. *Forensic Science International*. 148: 37-40.
3. Strasser, S., Zink, A., Kada, G., Hinterdorfer, P., Peschel, O., Heckl, O., Heckl, W.M., Nerlich, A.G. and Thalhammer, S. 2007. Age determination of blood spots in forensic mby Force spectroscopy. *Forensic Science International*. 170: 8-14.
4. Hanson, E., Albornoz, A. and Ballantyne, J. 2011. Validation of the hemoglobin (Hb) hypsochromic shift Assay for determination of the time since deposition (TSD) of dried bloodstains. *Forensic Science International Genetics Supplement. Series 3*: 307-308.

5. Li, B., Beveridge, P., O'Hare, W.T., Islam, M. 2011. The Estimation of the age of a bloodstain using reflectance spectroscopy with a microspectrophotometer, spectral preprocessing and linear discriminant analysis. *Forensic Science International*. 212: 198-204.
6. Li, B., Beveridge, P., O'Hare, W.T., Islam, M. 2013. The Age Estimation of blood stains up to 30 days old using Visiblewavelength hyperspectral image analysis and linear discriminant analysis. *Science and Justice*. 53: 270-277.
7. Inoue, H., Takabe, F., Iwasa, M. and Maeno, Y. 1991. Identification of fetal hemoglobin and simultaneous estimation of bloodstain age by highperformance liquid chromatography. *International Journal of Legal Medicine*. 104: 127-131.
8. Inoue, H., Takabe, F., Iwasa, M., Maeno, Y. and Seko Y. 1992. A New marker for estimation of bloodstain age by high performance liquid chromatography. *Forensic Science International*. 57: 17-27.
9. Andrasko, J. 1997. The Estimation age of bloodstains by hPLC analysis. *Journal of Forensic Science*. 42: 601-607.
10. Andrasko, J. and Rosen, B. 1994. Sensitive identification of hemoglobin in bloodstains from different species by high performance liquid chromatography with combined UV and fluorescence detection. *Journal of Forensic Science*. 39: 1018-1025.