

การทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารประกอบอินทรีย์ในเขม่าปืน

Method Validation of Organic Compounds Analysis in Gunshot Residue

ปัทมวรรณ ศรีตะวัน (Pattamawan Sritawan)* พรพรรณ ประสงค์ธรรม (Pornpun Prasongtum)**

วิรัตน์ มะแก้ว (Virat Makaew)*** จิรวัช ธนูรัตน์ (.Jirawach Thanurat)***

ดร.สุภาวดี ดาวดี (Dr.Supawadee Daodee)**** ดร.วรรณภา ศิริแสงตระกูล (Dr.Wanna Sirisangtragul)*****

บทคัดย่อ

การทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์เป็นข้อกำหนดในการควบคุมคุณภาพการวิเคราะห์ การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์ในการพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารประกอบอินทรีย์ Dimethylphthalate (DMP), 2-Naphthol, 2,4-Dinitrotoluene (2,4 DNT), Diethylphthalate (DEP), Methyl centralite (MC), N-Nitrosodiphenylamine (N-NsDPA), Diphenylamine (DPA) และ Ethyl centralite (EC) ที่พบได้ในเขม่าปืน ด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง โดยใช้คอลัมน์ Hypersil ODS C18 (5 μ m, 4.6 x 250 mm) เฟสเคลื่อนที่ระบบ Gradient ประกอบด้วย Deionized water และ Acetonitrile ตรวจวัดด้วย UV ที่ความคลื่น 210 nm สารทั้ง 8 ชนิดมีค่า Retention time (t_r) ระหว่าง 4.87 - 21.34 นาที มีช่วงความเป็นเส้นตรงอยู่ในช่วง 0.625 - 20 μ g/mL ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r^2) ระหว่าง 0.9960 - 0.9997 ตามลำดับ ค่าเฉลี่ยร้อยละการกลับคืนอยู่ในช่วง 95.16 - 101.59 ค่าร้อยละเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ มีค่า HORRAT น้อยกว่า 2 วิธีการวิเคราะห์อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ของ Eurachem guide สามารถใช้ในการวิเคราะห์สารประกอบอินทรีย์ในเขม่าปืนได้

ABSTRACT

Method validation is requirement in the quality control of analysis. This study aimed to develop and validate a reverse phase high performance liquid chromatographic method for the determination of organic compounds; Dimethylphthalate (DMP), 2-Naphthol, 2,4-Dinitrotoluene (2,4 DNT), Diethylphthalate (DEP), Methyl centralite (MC), N-Nitrosodiphenylamine (N-NsDPA), Diphenylamine (DPA) and Ethyl centralite (EC) from gunshot residues. The separation was performed on Hypersil ODS C18 (5 μ m, 4.6 x 250 mm) and the gradient of Deionized water and Acetonitrile as mobile phase with UV detection at wave length 210 nm. The retention time of 8 compounds was found to be 4.87 - 21.34 minutes. The method was linear in range between 0.625 - 20 μ g/mL and correlation coefficient (r^2) between 0.9960 - 0.9997, respectively. The percentage recovery was 95.16 - 101.59 %. The Horwitz ratio (HORRAT) is less than two. The method is achieved to Eurachem guide and can be employed for routine analysis of organic compounds in gunshot residues.

คำสำคัญ: การทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ เขม่าปืน สารประกอบอินทรีย์

Keywords: Method validation, Gunshot residue, Organic compounds

* นักศึกษา หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขานิติวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

** พันตำรวจตรี ศูนย์พิสูจน์หลักฐาน 4 จังหวัดขอนแก่น

*** พันตำรวจเอก ศูนย์พิสูจน์หลักฐาน 4 จังหวัดขอนแก่น

**** รองศาสตราจารย์ สาขาวิชาเภสัชเคมี คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

***** อาจารย์ หลักสูตรนิติวิทยาศาสตร์ สาขาวิทยาศาสตร์บูรณาการ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

บทนำ

ประเทศไทยเป็นประเทศที่มีผู้ครอบครองอาวุธปืนมากที่สุดในอาเซียนและเป็นอันดับที่ 39 ของโลก (Ch3thailand, 2559) ซึ่งอาจเนื่องมาจากในปัจจุบันประชาชนมีการจัดซื้อและได้รับใบอนุญาตครอบครองอาวุธปืนได้ง่ายขึ้น จากปัญหาดังกล่าวอาชญากรรมที่เกิดขึ้นในประเทศไทยจึงพบว่าส่วนใหญ่มีการใช้อาวุธปืนในการก่อเหตุ ในการตรวจพิสูจน์ทางนิติวิทยาศาสตร์ในคดีที่เกี่ยวข้องกับอาวุธปืนนั้น เม่่าปืนจัดเป็นวัตถุพยานที่มีความสำคัญในการสืบสวนสอบสวนและสามารถใช้ในการยืนยันหรือหาความเชื่อมโยงถึงตัวบุคคลที่ก่อเหตุได้ (Chang et al., 2012) โดยในทุกครั้งที่มีการยิงปืนจะเกิดอนุภาคที่เรียกว่า “เม่่าปืน” (Gunshot residue; GSR) ซึ่งเกิดจากการเผาไหม้ของชนวนท้ายกระสุนปืน ดินส่งกระสุนปืน และส่วนประกอบต่างๆ ของอาวุธปืนและเครื่องกระสุนเกิดขึ้นเสมอ (Meng, Caddy, 1997) เม่่าปืนจัดแบ่งออกได้เป็น 2 ประเภท คือ เม่่าปืนชนิดอนินทรีย์ (Inorganic Gunshot residue, I-GSR) และเม่่าปืนชนิดอินทรีย์ (Organic Gunshot residue, O-GSR) ในการดำเนินการทางกฎหมายในปัจจุบันใช้ I-GSR ในการตรวจยืนยันผู้ที่เกี่ยวข้องกับคดีอาวุธปืนด้วยการตรวจธาตุบ่งชี้ทั้ง 3 ธาตุ คือ ตะกั่ว (Pb) แบเรียม (Ba) และแอนติโมนี (Sb) ที่เกิดจากการเผาไหม้ของชนวนท้ายกระสุนปืนเป็นส่วนใหญ่ (สำนักงานพิสูจน์หลักฐานตำรวจ, ม.ป.ป.) แต่จากวิวัฒนาการของกระสุนที่ปัจจุบันมีการผลิตกระสุนชนิด Lead free เพื่อลดปัญหาการปนเปื้อนของตะกั่ว (Pb) ที่เป็นอันตรายต่อสุขภาพในสิ่งแวดล้อม (Heard, 2008) รวมทั้งการผลิตกระสุนแบบใหม่ คือ Metal free ammunition (Cascio et al., 2004) ออกมาใช้แทนกระสุนแบบเดิม ดังนั้นในการตรวจวิเคราะห์เม่่าปืนในคดีที่มีการใช้กระสุนปืนชนิดดังกล่าวด้วยการวิเคราะห์เพียง I-GSR จึงอาจขาดความจำเพาะและส่งผลให้เกิดความคลาดเคลื่อนของพยานหลักฐานได้ การวิเคราะห์เม่่าปืนชนิดอินทรีย์ที่มีแหล่งกำเนิดจากดินส่งกระสุนปืน (Gun powder) จึงเป็นทางเลือกในการใช้เป็นหลักฐานทางนิติวิทยาศาสตร์ ในปัจจุบันดินส่งกระสุนปืนที่นิยมใช้กันคือชนิดดินคั่วเนื้อ (Smokeless powder) นอกจากนี้ยังมีองค์ประกอบของสารเติมแต่ง (Additives) ซึ่งเป็นสารประกอบอินทรีย์ชนิดต่างๆ ทำหน้าที่ในการปรับปรุงคุณสมบัติของดินคั่วเนื้อให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น เช่น สาร Stabilizers ได้แก่ Diphenylamine (DPA), Methyl centralite (MC), Ethyl centralite (EC) และ Resorcinol สาร Plasticizers ได้แก่ Glyceryl triacetate (triacetin), Dimethyl phthalate (DMP), Diethyl phthalate (DEP), Dibutyl phthalate (DBP) สาร Flash suppresser ได้แก่ Dinitrotoluene (DNT) (Meng, Caddy, 1997) ซึ่งสารประกอบอินทรีย์ดังกล่าวสามารถตรวจพบได้หลังจากการยิงปืน (Perre, 2012) งานวิจัยนี้จึงมีความสนใจที่จะพัฒนาวิธีวิเคราะห์สารประกอบอินทรีย์ 8 ชนิด คือ Dimethylphthalate (DMP), 2-Naphthol, 2,4-Dinitrotoluene (2,4 DNT), Diethylphthalate (DEP), Methyl centralite (MC), N-Nitrosodiphenylamine (N-NsDPA), Diphenylamine (DPA) และ Ethyl centralite (EC) ในเม่่าปืนด้วยเทคนิค High Performance Liquid Chromatography (HPLC) และทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ (Method validation) เพื่อใช้เป็นวิธีในการวิเคราะห์หาสารบ่งชี้ชนิด O-GSR ในการตรวจวิเคราะห์เม่่าปืนที่เกิดจากกระสุนปืนขนาด .22 ที่มีประสิทธิภาพสามารถใช้ในการตรวจยืนยันและเชื่อมโยงการสืบสวนสอบสวนคดีอาญาที่เกี่ยวข้องกับอาวุธปืนที่ทันต่อความเจริญก้าวหน้าของเทคโนโลยีในปัจจุบัน และใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานประกอบการจัดทำคู่มือการปฏิบัติงานของหน่วยงานที่เกี่ยวข้องต่อไป

วัตถุประสงค์การวิจัย

เพื่อพัฒนาวิธีวิเคราะห์และทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารประกอบอินทรีย์ในเม่่าปืน

วิธีการวิจัย

สารเคมี และวัสดุอุปกรณ์

สารมาตรฐาน Dimethyl phthalate (C₁₀H₁₀O₄), 2-Naphthol (C₁₀H₈O), 2,4 Dinitrotoluene (C₇H₆N₂O₄), Diethyl phthalate (C₁₂H₁₄O₄), N-Nitrosodiphenylamine (C₁₂H₁₀N₂O), Diphenylamine (C₁₂H₁₁N) และ Ethyl centralite (C₁₇H₂₀N₂O) ผลิตภัณฑ์ของ Sigma Aldrich, สารมาตรฐาน Methyl centralite (C₁₅H₁₆N₂O) ผลิตภัณฑ์ของ MP Biomedicals สารเคมี Acetonitrile และ Methanol (HPLC grade) ผลิตภัณฑ์ของ Honeywell Burdick&Jackson สหรัฐอเมริกา สารเคมี Ethanol ผลิตภัณฑ์ของ VWR Chemicals ฝรั่งเศส และ Deionized water (18.2 MΩ.cm)

ดินดำ (Black powder) กระสุนปืนขนาด .22 และอาวุธปืนขนาด .22 ได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์พิสูจน์หลักฐาน 4 จังหวัดขอนแก่น

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์สารประกอบอินทรีย์ในเขม่าปืนโดยวิธีโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC)

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการแยกสารประกอบอินทรีย์ทั้ง 8 ชนิด คือ Dimethylphthalate (DMP), 2-Naphthol, 2,4-Dinitrotoluene (2,4 DNT), Diethylphthalate (DEP), Methyl centralite (MC), N-Nitrosodiphenylamine (N-NsDPA), Diphenylamine (DPA) และ Ethyl centralite (EC) ทดสอบโดยการเตรียมสารมาตรฐานรวมทั้ง 8 ชนิด ที่ความเข้มข้น 10 µg/mL จากนั้นนำมาวิเคราะห์ด้วยวิธีเทคนิค HPLC, UV/Visible detector (Water, USA) โดยใช้สภาวะดังนี้

Column	Hypersil ODS C18, 5 µm, 4.6 x 250 mm (Agilent, USA)
Mobile phase	A = Deionized water B = Acetonitrile
Detector	UV/Visible 210 nm
Injection	20 µL

การเตรียม Sample blank

ชั่งดินดำ (Black powder) ปริมาณ 5 mg ลงใน Eppendorf tube ขนาด 1.5 mL เติม Methanol ปริมาตร 200 µL นำมา Vortex เป็นเวลา 5 นาทีและนำมา Centrifuge ที่ 10,000 รอบ เป็นเวลา 20 นาที เก็บสารละลายส่วนใสนำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC

การทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ (Method Validation)

อ้างอิงตามวิธีมาตรฐานกำหนดของ Eurachem guide (2014) โดยทำการทดสอบดังนี้

การทดสอบความจำเพาะของวิธีวิเคราะห์ (Specificity)

ทดสอบโดยการเตรียม Spiked sample ด้วยการเติมสารมาตรฐานรวม (Mixed standard) ทั้ง 8 ชนิด คือ Dimethylphthalate (DMP), 2-Naphthol, 2,4-Dinitrotoluene (2,4 DNT), Diethylphthalate (DEP), Methyl centralite (MC), N-Nitrosodiphenylamine (N-NsDPA), Diphenylamine (DPA) และ Ethyl centralite (EC) ความเข้มข้น 50 µg/mL ปริมาตร 200 µL ลงใน Sample blank นำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC เปรียบเทียบระหว่างโครมาโตแกรมของ Sample blank และ Spiked sample

การทดสอบหาค่าขีดจำกัดต่ำสุดในการตรวจพบ (Limit of Detection, LOD) และค่าขีดจำกัดต่ำสุดในการวิเคราะห์เชิงปริมาณ (Limit of Quantitation, LOQ)

ทดสอบโดยการเตรียม Spiked sample ด้วยการเติมสารมาตรฐานลงในดินดำ (Black powder) โดยเตรียมสารมาตรฐานทั้ง 8 ชนิด ที่ความเข้มข้น 3 ระดับ แต่ละระดับความเข้มข้นทำการทดสอบ 10 ซ้ำ ($n = 10$) จากนั้นนำไปสกัดตามวิธี และนำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC คำนวณค่าความเข้มข้นเฉลี่ย และคำนวณค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard deviation, SD) ของแต่ละความเข้มข้น และสร้างกราฟระหว่างค่าความเข้มข้นเฉลี่ยกับค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard deviation, SD) จุดตัดแกน y คือค่า S_0 และนำค่า S_0 คำนวณหาค่า LOD และ LOQ ได้จากสูตร $LOD = 3 \times S_0$ และ $LOQ = 10 \times S_0$ ตามลำดับ

การทดสอบความเป็นเส้นตรง (Linearity) และช่วงของการทดสอบ (Range)

ทดสอบโดยการเตรียม Spiked sample ด้วยเติมสารมาตรฐานลงในดินดำ (Black powder) โดยเตรียมสารมาตรฐานทั้ง 8 ชนิด ที่ความเข้มข้น 6 ระดับ ในช่วง 0.625, 1.25, 2.5, 5, 10 และ 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ แต่ละระดับความเข้มข้นทำการทดสอบ 3 ซ้ำ ($n = 3$) จากนั้นนำไปสกัดตามวิธี และนำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC สร้างกราฟระหว่างค่าความเข้มข้นของสารที่ทดสอบ (แกน x) กับค่าสัญญาณที่ตรวจวัดได้จากเครื่องมือ (แกน y) ตรวจสอบความเป็นตรงโดยการหาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r^2) โดยค่า $r^2 \geq 0.990$ เป็นค่าตามเกณฑ์การยอมรับ

การทดสอบความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ (Accuracy)

ทดสอบโดยการเตรียม Spiked sample ด้วยเติมสารมาตรฐานรวมลงในดินดำ (Black powder) โดยสารมาตรฐานรวมมีความเข้มข้น 3 ระดับ คือ 2.5, 5 และ 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ แต่ละระดับความเข้มข้นทำการทดสอบ 10 ซ้ำ ($n = 10$) จากนั้นนำไปสกัดตามวิธีที่ระบุ และนำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC ความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์คำนวณได้จากค่าร้อยละการกลับคืน (% Recovery) โดยค่าที่ยอมรับได้อยู่ในช่วง 80 - 120 % ตามเกณฑ์การยอมรับ

การทดสอบความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์ (Precision)

ทดสอบโดยการเตรียม Spiked sample ด้วยเติมสารมาตรฐานรวม 8 ชนิด ลงในดินดำ (Black powder) โดยสารมาตรฐานรวมมีความเข้มข้น 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ทำการทดสอบ 10 ซ้ำ ($n = 10$) จากนั้นนำไปสกัดตามวิธี และนำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC ความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์คำนวณได้จากค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (% RSD) ค่าที่ยอมรับได้ HORRAT มีค่าน้อยกว่า 2

การวิเคราะห์สารประกอบอินทรีย์ในเขม่าป็นบนมือ

การเก็บตัวอย่างเขม่าป็น

อาสาสมัคร ($n=6$) งดเว้นกิจกรรมที่เกี่ยวข้องกับอาวุธปืนเป็นเวลา 3 วัน ก่อนการยิงปืนอาสาสมัครทำการล้างมือด้วยสบู่และ Deionized water เช็ดมือด้วยกระดาษซับน้ำ แล้วทิ้งให้มือแห้งสนิท ก่อนทำการยิงปืนผู้วิจัยทำการเก็บตัวอย่าง Blank บริเวณมืออาสาสมัครด้วย Ethanol 100% อาสาสมัครทำการยิงปืนด้วยทำยิงมาตรฐานที่กำหนดดังนี้ ยืนจับอาวุธปืนด้วยมือทั้งสองข้าง ใช้มือข้างที่ถนัดจับอาวุธปืนและใช้มืออีกข้างประคองมือที่จับอาวุธปืน โดยใช้อาวุธปืนขนาด .22 ทำการยิงปืนจำนวนคนละ 1 นัด หลังจากอาสาสมัครยิงปืนจำนวน 1 นัดแล้ววางปืนลงเพื่อให้ผู้วิจัยทำการเก็บตัวอย่างเขม่าป็นบนมือทันทีด้วยวิธี Swab อ้างอิงตามวิธีมาตรฐานของงานอาวุธปืน ศูนย์พิสูจน์หลักฐาน 4 จังหวัดขอนแก่น (สำนักงานพิสูจน์หลักฐานตำรวจ, ม.ป.ป.) ตัวอย่างที่เก็บนำมาสกัดเพื่อวิเคราะห์หาสารประกอบอินทรีย์ในเขม่าป็นต่อไป

การสกัดตัวอย่างเขม่าป็น

ตัดก้านสำลีที่เก็บเขม่าป็นใส่ใน Eppendorf tube ขนาด 1.5 mL เติม Methanol ปริมาตร 1 mL เพื่อทำการสกัดทิ้งไว้ข้ามคืน จากนั้นนำไป Sonicate เป็นเวลา 30 นาทีแล้วนำก้านสำลีออก และนำไป Centrifuge ที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที และเปิดสารละลายส่วนใสใส่ใน Eppendorf tube ขนาด 1.5 mL อันใหม่ จากนั้นนำไประเหยแห้ง และเติม Methanol ปริมาตร 250 μ L เพื่อละลาย (Reconstituted) ตัวอย่างที่สกัดได้นำไปวิเคราะห์โดยใช้เทคนิค HPLC ต่อไป

ผลการวิจัย

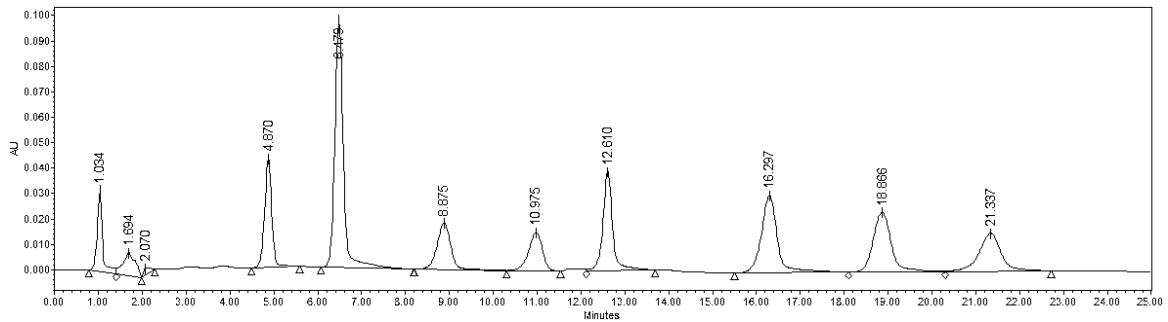
การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์สารประกอบอินทรีย์ในเขม่าป็นด้วยวิธีโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC)

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์สารประกอบอินทรีย์ทั้ง 8 ชนิด ที่เป็นส่วนประกอบในดินป็นชนิดดินคันทันน้อยด้วยเทคนิค HPLC โดยใช้คอลัมน์ Hypersil ODS C18 ขนาดอนุภาค 5 μ m ความยาวคอลัมน์ 4.6 x 250 mm เฟสเคลื่อนที่ประกอบด้วย Deionized water และ Acetonitrile อัตราส่วนและอัตราการไหลใช้ระบบ Gradient ตัวตรวจวัดชนิด UV ความยาวคลื่น 210 nm ปริมาตรการฉีด 20 μ L

การศึกษาสภาวะของอัตราส่วนและอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ที่ใช้ระบบ Gradient จากการศึกษาพบว่าเมื่อเพิ่มอัตราส่วนของ Acetonitrile จะทำให้พีคมีการแยกที่ลดลง เวลาการคงอยู่ของสารในคอลัมน์ลดลง และเมื่อเพิ่มอัตราส่วนของ Deionized water จะทำให้พีคมีการแยกที่เพิ่มขึ้น เวลาการคงอยู่ของสารในคอลัมน์เพิ่มขึ้น และเมื่อเพิ่มอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ทั้ง Deionized water และ Acetonitrile พบว่าสารออกจากคอลัมน์ได้เร็ว เวลาการคงอยู่ของสารในคอลัมน์ลดลง อัตราส่วนและอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ระบบ Gradient ดังนี้

เวลา (นาที)	อัตราส่วน Deionized water : Acetonitrile (%)	Flow rate (mL/min)
0 - 5	65 : 35	1.3
6 - 10	68 : 32	1.5
10.1 - 12	60 : 40	1.8
12.1 - 23	60 : 40	1.6
23.1 - 25	65 : 35	1.3

โครมาโตแกรมของสารมาตรฐานรวมทั้ง 8 ชนิด ได้แก่ DMP, 2-Naphthol, 2,4 DNT, DEP, MC, N-NsDPA, DPA และ EC มีค่า Retention time เท่ากับ 4.87, 6.48, 8.88, 10.98, 12.61, 16.30, 18.87 และ 21.34 นาที ตามลำดับ และค่าตัวแปรต่างๆ ของสารทั้ง 8 ตัว พบว่าค่าของตัวแปร $k' > 2$ ค่า $\alpha > 1$ ค่า $R_s > 2$ และ ค่า $T < 1$ อยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ (รูปที่ 1 และตารางที่ 1)



รูปที่ 1 โครมาโตแกรมของสารมาตรฐานรวมทั้ง 8 ชนิด ได้แก่ DMP, 2-Naphthol, 2,4 DNT, DEP, MC, N-NsDPA, DPA และ EC มีค่า Retention time เท่ากับ 4.87, 6.48, 8.88, 10.98, 12.61, 16.30, 18.87 และ 21.34 นาที ตามลำดับ

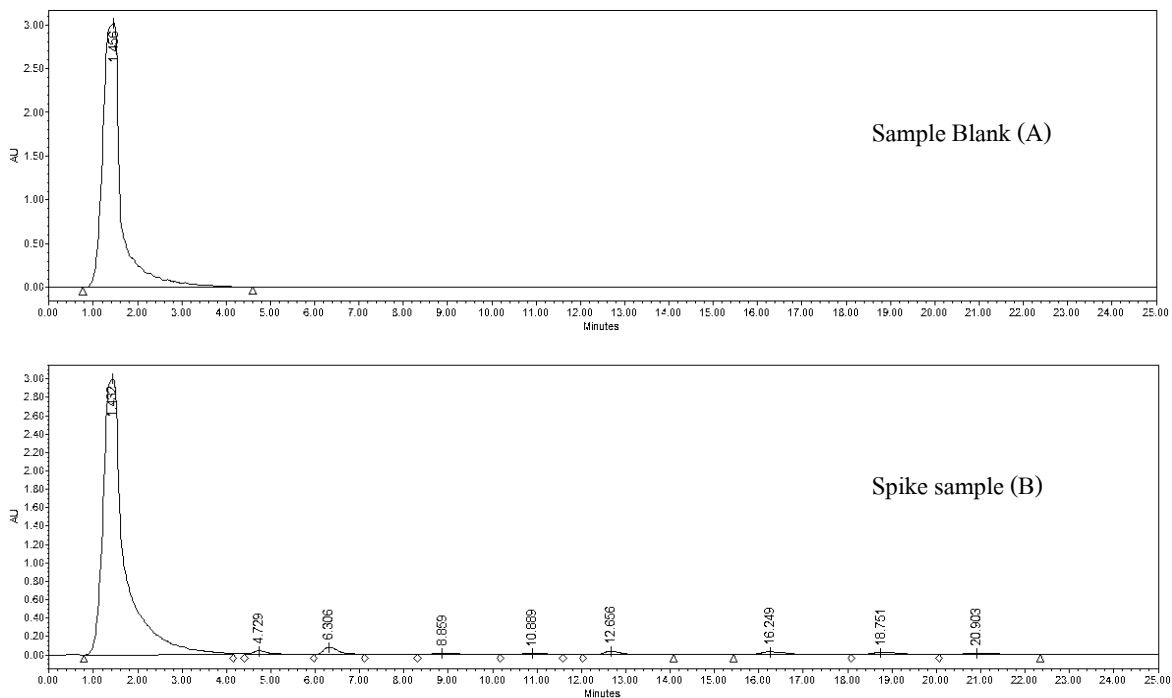
ตารางที่ 1 ค่าตัวแปร Capacity factors (k'), Separation factors (α), Peak resolution (R_s), Tailing factors (T) และ Retention time (t_R) ของสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ด้วย HPLC

ตัวแปร	สารมาตรฐาน							
	DMP	2-Naphthol	2,4-DNT	DEP	MC	N-NsDPA	DPA	EC
k'	3.73	5.29	7.62	9.66	11.24	14.83	17.32	19.72
α	-	1.42	1.44	1.27	1.16	1.32	1.17	1.14
R_s	-	3.58	4.00	3.00	2.72	6.15	3.43	2.74
T	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
t_R	4.87	6.48	8.88	10.98	12.61	16.30	18.87	21.34

การทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ (Method Validation)

การทดสอบความจำเพาะของวิธีวิเคราะห์ (Specificity)

เมื่อเปรียบเทียบโครมาโตแกรมของสารละลาย Blank และโครมาโตแกรมของ Spike sample ที่เติมสารมาตรฐานรวมทั้ง 8 ชนิด ที่ความเข้มข้น 50 $\mu\text{g/mL}$ พบว่าสภาวะของวิธีวิเคราะห์มีความจำเพาะต่อสารที่ต้องการโดยไม่มีสารอื่นมารบกวนในระบบ ดังรูปที่ 2 โครมาโตแกรมของ Sample Blank (A) และ Spike sample (B) ที่เติมสารมาตรฐานรวมทั้ง 8 ชนิด คือ DMP, 2-Naphthol, 2,4 DNT, DEP, MC, N-NsDPA, DPA และ EC มีค่า Retention time เท่ากับ 4.72, 6.30, 8.85, 10.88, 12.65, 16.24, 18.75, 20.90 นาที ตามลำดับ



รูปที่ 2 โครมาโตแกรมของ Sample Blank (A) และ Spike sample (B) ที่เติมสารมาตรฐานรวม ได้แก่ DMP, 2-Naphthol, 2,4 DNT, DEP, MC, N-NsDPA, DPA และ EC มีค่า Retention time เท่ากับ 4.72, 6.30, 8.85, 10.88, 12.65, 16.24, 18.75, 20.90 นาที ตามลำดับ

การทดสอบค่าขีดจำกัดต่ำสุดในการตรวจพบ (Limit of Detection , LOD) และค่าขีดจำกัดต่ำสุดในการวิเคราะห์เชิงปริมาณ (Limit of Quantitation , LOQ)

ค่า LOD และค่า LOQ ดังแสดงในตารางที่ 2 สาร DMP มีค่า LOD เท่ากับ 0.02 µg/mL และค่า LOQ เท่ากับ 0.07 µg/mL ตามลำดับ สาร 2-Naphthol มีค่า LOD เท่ากับ 0.11 µg/mL และค่า LOQ เท่ากับ 0.37 µg/mL ตามลำดับ สาร 2,4 DNT มีค่า LOD เท่ากับ 0.03 µg/mL และค่า LOQ เท่ากับ 0.11 µg/mL ตามลำดับ สาร DEP มีค่า LOD เท่ากับ 0.03 µg/mL และค่า LOQ เท่ากับ 0.10 µg/mL ตามลำดับ สาร MC มีค่า LOD เท่ากับ 0.20 µg/mL และค่า LOQ เท่ากับ 0.67 µg/mL ตามลำดับ สาร N-NsDPA มีค่า LOD เท่ากับ 0.16 µg/mL และค่า LOQ เท่ากับ 0.52 µg/mL ตามลำดับ สาร DPA มีค่า LOD เท่ากับ 0.06 µg/mL และค่า LOQ เท่ากับ 0.20 µg/mL ตามลำดับ และ สาร EC มีค่า LOD เท่ากับ 0.08 µg/mL และค่า LOQ เท่ากับ 0.26 µg/mL ตามลำดับ

การทดสอบความเป็นเส้นตรง (Linearity) และช่วงของวิธีวิเคราะห์ (Range)

ความเป็นเส้นตรงของสารมาตรฐานทั้ง 8 ชนิด มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r^2) ระหว่าง 0.9960 - 0.9997 ดังนี้ สาร DMP มีค่า r^2 เท่ากับ 0.9988 สาร 2-Naphthol มีค่า r^2 เท่ากับ 0.9977 สาร 2,4 DNT มีค่า r^2 เท่ากับ 0.9960 สาร DEP มีค่า r^2 เท่ากับ 0.9984 สาร MC มีค่า r^2 เท่ากับ 0.9977 สาร N-NsDPA มีค่า r^2 เท่ากับ 0.9983 สาร DPA มีค่า r^2 เท่ากับ 0.9997 และสาร EC มีค่า r^2 เท่ากับ 0.9986 ตามลำดับ ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ ($r^2 \geq 0.990$) ตามเกณฑ์การยอมรับของ Eurachem guide (2014) ดังตารางที่ 2

ช่วงความเป็นเส้นตรงของสารมาตรฐานทั้ง 8 ชนิด อยู่ในช่วง 0.625 - 20 µg/mL ช่วงความเป็นเส้นตรงของสาร DMP คือ 0.625 - 20 µg/mL สาร 2-Naphthol คือ 0.625 - 20 µg/mL สาร 2,4 DNT คือ 0.625 - 20 µg/mL สาร DEP คือ 0.625 - 20 µg/mL สาร MC คือ 0.625 - 20 µg/mL สาร N-NsDPA คือ 0.625 - 20 µg/mL สาร DPA คือ 0.625 - 20 µg/mL และสาร EC คือ 0.625 - 20 µg/mL ตามลำดับ ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ค่า LOD ค่า LOQ สมการเส้นตรง ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r^2) และช่วงความเป็นเส้นตรงของสารมาตรฐานทั้ง 8 ชนิด

สารมาตรฐาน	LOD (µg/mL)	LOQ (µg/mL)	สมการเส้นตรง	ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r^2)	ช่วงความเป็นเส้นตรง (µg/mL)
DMP	0.02	0.07	$y = 24521x - 1565.2$	$r^2 = 0.9988$	0.625 - 20
2-Naphthol	0.11	0.37	$y = 64808x - 27072$	$r^2 = 0.9977$	0.625 - 20
2,4 DNT	0.03	0.11	$y = 20889x - 4519.1$	$r^2 = 0.9960$	0.625 - 20
DEP	0.03	0.10	$y = 11054x - 1889.5$	$r^2 = 0.9984$	0.625 - 20
MC	0.20	0.67	$y = 29331x + 24844$	$r^2 = 0.9977$	0.625 - 20
N-NsDPA	0.16	0.52	$y = 30673x - 11724$	$r^2 = 0.9983$	0.625 - 20
DPA	0.06	0.20	$y = 33086x - 10033$	$r^2 = 0.9997$	0.625 - 20
EC	0.08	0.26	$y = 25078x - 1688.9$	$r^2 = 0.9986$	0.625 - 20

การทดสอบความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ (Accuracy)

จากการทดสอบร้อยละการกลับคืน (% Recovery) ค่าเฉลี่ยของ % Recovery ของสารมาตรฐานทั้ง 8 ชนิด สาร DMP เท่ากับ 95.16 ± 0.45 สาร 2-Naphthol เท่ากับ 101.59 ± 0.53 สาร 2,4 DNT เท่ากับ 101.02 ± 0.39 สาร DEP เท่ากับ 99.38 ± 0.82 สาร MC เท่ากับ 101.10 ± 0.41 สาร N-NsDPA เท่ากับ 99.85 ± 0.52 สาร DPA เท่ากับ 96.84 ± 0.43 และสาร EC เท่ากับ 98.17 ± 0.59 ตามลำดับ ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับ 80 - 120 % ตามเกณฑ์การยอมรับของ Eurachem guide (2014) ดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 % Recovery ของ Spike sample ในดินค้า เมื่อเติมสารมาตรฐานที่ความเข้มข้น 3 ระดับ

สารมาตรฐาน	% Recovery \pm SD (n = 10)			% Mean recovery \pm SD
	ความเข้มข้นของสารมาตรฐาน ($\mu\text{g/mL}$)			
	2.5	5	10	
DMP	89.12 \pm 0.24	93.95 \pm 0.34	102.40 \pm 0.77	95.16 \pm 0.45
2-Naphthol	94.73 \pm 0.18	103.93 \pm 0.41	106.12 \pm 0.99	101.59 \pm 0.53
2,4 DNT	99.50 \pm 0.16	96.22 \pm 0.40	107.33 \pm 0.62	101.02 \pm 0.39
DEP	98.13 \pm 0.36	91.15 \pm 0.62	108.87 \pm 1.47	99.38 \pm 0.82
MC	100.98 \pm 0.33	99.43 \pm 0.39	102.88 \pm 0.50	101.10 \pm 0.41
N-NsDPA	100.88 \pm 0.20	98.05 \pm 0.41	100.62 \pm 0.95	99.85 \pm 0.52
DPA	90.03 \pm 0.19	95.11 \pm 0.44	105.38 \pm 0.66	96.84 \pm 0.43
EC	94.90 \pm 0.26	97.88 \pm 0.61	101.72 \pm 0.91	98.17 \pm 0.59

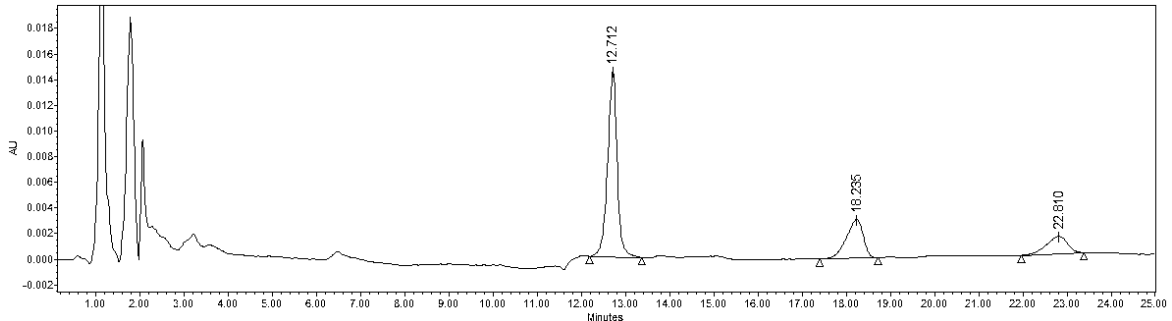
การทดสอบความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์ (Precision)

จากการทดสอบค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (% RSD) จากการวิเคราะห์ซ้ำของสารมาตรฐานทั้ง 8 ชนิดที่ความเข้มข้น 2.5 $\mu\text{g/mL}$ ในวันเดียวกัน (intra-day) มีค่า HORRAT ของสาร DMP เท่ากับ 1.19 สาร 2-Naphthol เท่ากับ 0.83 สาร 2,4 DNT เท่ากับ 0.70 สาร DEP เท่ากับ 1.58 สาร MC เท่ากับ 1.42 สาร N-NsDPA เท่ากับ 0.88 สาร DPA เท่ากับ 0.90 และสาร EC เท่ากับ 1.19 ตามลำดับ และจากการวิเคราะห์ซ้ำของสารมาตรฐานทั้ง 8 ชนิด ที่ความเข้มข้น 2.5 $\mu\text{g/mL}$ ต่างวัน (inter-day) ค่า HORRAT ของสาร DMP เท่ากับ 0.71 สาร 2-Naphthol เท่ากับ 0.80 สาร 2,4 DNT เท่ากับ 0.54 สาร DEP เท่ากับ 1.30 สาร MC เท่ากับ 1.17 สาร N-NsDPA เท่ากับ 0.68 สาร DPA เท่ากับ 1.03 และสาร EC เท่ากับ 0.67 ตามลำดับ ซึ่งอยู่ในเกณฑ์การยอมรับ HORRAT มีค่าน้อยกว่า 2 ตามเกณฑ์การยอมรับของ Eurachem guide (2014) ดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 % RSD และค่า HORRAT ของ Spiked sample ที่เติมสารมาตรฐานรวมทั้ง 8 ชนิด ที่ความเข้มข้น 2.5 $\mu\text{g/mL}$ โดยวิเคราะห์ในวันเดียว (intra-day) และวิเคราะห์ต่างวัน (inter-day)

สารมาตรฐาน	intra-day		inter-day	
	% RSD	HORRAT	% RSD	HORRAT
DMP	10.92	1.19	6.51	0.71
2-Naphthol	7.59	0.83	7.33	0.80
2,4 DNT	6.41	0.70	4.95	0.54
DEP	14.57	1.58	11.96	1.30
MC	13.05	1.42	10.73	1.17
N-NsDPA	8.06	0.88	6.23	0.68
DPA	8.26	0.90	9.49	1.03
EC	10.93	1.19	6.17	0.67

การวิเคราะห์สารประกอบอินทรีย์ในเขม่าปืน .22 บนมือด้วยวิธีโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) ตรวจพบสาร MC, DPA และ EC ในปริมาณ 5.69, 2.41 และ 1.79 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ตามลำดับ (รูปที่ 3)



รูปที่ 3 โครมาโตแกรมของเขม่าปืนที่เกิดจากกระสุน .22 ยี่ห้อ Winchester บนมือ

อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

จากการประเมินผลของค่าตัวแปรต่างๆ ของการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC-UV detection (210 nm) โดยเฟสเคลื่อนที่ระบบ Gradient ประกอบด้วยอัตราส่วนของ Deionized water และ Acetonitrile เวลาในการวิเคราะห์ทั้งสิ้น 25 นาที วิธีวิเคราะห์มีความจำเพาะ (Specificity) Limit of Detection (LOD) และค่า Limit of Quantitation (LOQ) ความเป็นเส้นตรง (Linearity) และช่วงของวิธีวิเคราะห์ (Range) ความแม่นยำ (Accuracy) และความเที่ยง (Precision) อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ อ้างอิงตามเกณฑ์มาตรฐาน Eurachem guide (2014) สามารถนำไปใช้เป็นวิธีมาตรฐานในการวิเคราะห์สารประกอบอินทรีย์ในเขม่าปืน และจากการวิเคราะห์สารประกอบอินทรีย์ในเขม่าปืน .22 บนมือด้วยวิธี HPLC ตรวจพบสาร MC, DPA และ EC ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Mach (1978) และ Laza (2007) ที่ตรวจพบสาร DPA ที่เกิดจากเขม่าปืนในกระสุนขนาด .22 ซึ่งสารประกอบอินทรีย์เหล่านี้ทำหน้าที่เป็นตัว Stabilizer และ Plasticizer ในดินปืนชนิดดินปืนน้อย (Thomas et al., 2013) และการตรวจพบสาร MC ซึ่งเป็นองค์ประกอบสำคัญของดินปืนชนิดดินปืนน้อยในเขม่าปืนในการศึกษาในครั้งนี้พบว่ามีค่าแตกต่างจากเขม่าปืนที่เกิดจากกระสุนขนาด 9 มม. ยี่ห้อ Winchester, Remington, Federal, Hornady, PMC, Blazer, Magtech และ Sellier&Bellot ขนาด 12-gauge ยี่ห้อ Winchester ขนาด .44 ยี่ห้อ PMC ขนาด 7.62 x 39 mm ยี่ห้อ Sellier&Bellot ที่มีการตรวจพบเพียงสาร NG, DBP, DPA, EC, Akardite II, N-Nitroso-DPA, 4-Nitroso-DPA, Diamino-toluene และ 2,4-DNT (Reese et al., 2017) ดังนั้นสาร MC ที่ตรวจพบอาจสามารถใช้เป็นสารบ่งชี้จำเพาะในเขม่าปืนที่เกิดจากกระสุนขนาด .22 ได้ แต่อย่างไรก็ตามจากการวิเคราะห์ในตัวอย่าง Blank พบมีการปนเปื้อนของสาร MC, DPA และ EC ซึ่งอาจเกิดจากการปนเปื้อนในสารที่ใช้ในการจัดเก็บซึ่งจำเป็นต้องได้รับการแก้ไขต่อไป รวมทั้งการศึกษานำร่องในครั้งนี้เป็นการวิเคราะห์เขม่าปืนในกระสุน .22 เพียงยี่ห้อเดียวคือ Winchester การศึกษาในกระสุนที่หลากหลายยี่ห้อ รวมทั้งการศึกษานำร่องเปรียบเทียบกับชนิดของสารประกอบอินทรีย์ที่พบในดินปืนจากกระสุน .22 ยังต้องได้รับการศึกษาให้ละเอียดต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากทุนอุดหนุนและส่งเสริมการทำวิทยานิพนธ์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น (รหัสทุน 59231106) กระสุนปืนและอาวุธปืนในการศึกษาได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์พิสูจน์หลักฐาน 4 สำนักงานตำรวจแห่งชาติ ผู้วิจัยขอขอบพระคุณมา ณ ที่นี้

เอกสารอ้างอิง

สำนักงานพิสูจน์หลักฐานตำรวจ สำนักงานตำรวจแห่งชาติ. คู่มือปฏิบัติงาน การตรวจพิสูจน์อาวุธปืนและเครื่องกระสุนปืน. [ม.ป.ท.: ม.ป.พ.: ม.ป.ป.].

Cascio O, Trettene M, Bortolotti F, Milana G, Tagliaro F. Analysis of organic components of smokeless gunpowders: High-performance liquid chromatography vs. micellar electrokinetic capillary chromatography. *Electrophoresis* 2004; 25: 1543-1547.

Ch3thailand. คนไทยครอบครองอาวุธมากที่สุดในอาเซียน [ออนไลน์] 2559 [อ้างเมื่อ 29 กรกฎาคม 2559]. จาก news.ch3thailand.com/ข่าวในประเทศ/5178/คนไทยครอบครองอาวุธมากที่สุดในอาเซียน.html

Chang KH, Jayaprakash PT, Yew CH, Abdullah AFL. Gunshot residue analysis and its evidential values: a review. *Australian Journal of Forensic Sciences* 2012; 45: 2-23.

Eurachem Guide. The Fitness for Purpose of Analytical Methods - A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics. Eurachem [serial online] 2014 [cited 2019 Jan 2]. Available from: https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/MV_guide_2nd_ed_EN.pdf.

Heard BJ. Handbook of Firearms and Ballistics Examining and Interpreting Forensic Evidence Second Edition. 2nd ed. UK: John Wiley & Sons Ltd; 2008.

Laza D, Nys B, Kinder JD, Mesmaeker AK, Moucheron C. Development of a quantitative LC-MS/MS method for the analysis of common propellant powder stabilizers in gunshot residue. *Journal of Forensic Sciences* 2007; 52(4): 842-850.

Mach MH, Pallos A, Jones PF. Feasibility of Gunshot Residue Detection Via Its Organic Constituents. Part I: Analysis of Smokeless Powders by Combined Gas Chromatography- Chemical Ionization Mass Spectrometry. *Journal of Forensic Sciences* 1978; 23(3): 433-445.

Meng HH, Caddy B. Gunshot residue analysis - a review. *Journal of Forensic Sciences* 1997; 42(4): 553-70.

Perre C, Corbin I, Blas M, McCord BR. Separation and identification of smokeless gunpowder additive by capillary electrochromatography. *Journal of Chromatography A* 2012; 1267: 259-265.

Reese KL, Jones AD, Smith RW. Characterization of smokeless powders using multiplexed collision-induced dissociation mass spectrometry and chemometric procedures. *Journal of Forensic Sciences* 2017; 272: 16-17.

Thomas JL, Lincoln D, McCord BR. Separation and Detection of Smokeless Powder Additives by Ultra Performance Liquid Chromatography with Tandem Mass Spectrometry (UPLC/MS/MS). *Journal of Forensic Sciences* 2013; 58(3): 609-615