

บทความปริทัศน์ (Review Article)

การประยุกต์ใช้ลูมินอลในทางนิติวิทยาศาสตร์และชีวการแพทย์

สุนทรต์ ชูลักษณ์^{1*}

Application of luminol in forensic science and biomedical sciences

Sunthorn Chooluck^{1*}¹ Department of Biochemistry, Faculty of Science, Burapha University, Chonburi Province, 20131

* Correspondence author: sunthornc@buu.ac.th

Health Science, Science and Technology Reviews. 2024;17(3):3-17.

Received: 2 July 2024; Revised: 11 September 2024; Accepted: 29 October 2024

บทคัดย่อ

สารลูมินอล (Luminol) ถูกนำมาประยุกต์ใช้ในทางนิติวิทยาศาสตร์สำหรับการตรวจหาคราบเลือดแฝงที่มองไม่เห็นด้วยตาเปล่าในสถานที่เกิดเหตุมาเป็นเวลานานโดยอาศัยหลักการเคมีลูมิเนสเซนส์ (Chemiluminescence) สารลูมินอลมีความไวสูงและมีประสิทธิภาพที่ดีในการตรวจหาคราบเลือดแฝง เมื่อสัมผัสกับตัวออกซิไดซ์ (Oxidizing agent) ปริมาณเล็กน้อยจะเกิดการเรืองแสงลูมิเนสเซนส์สีฟ้า ด้วยเหตุนี้การทดสอบคราบเลือดแฝงด้วยลูมินอลจึงถือเป็นหนึ่งในวิธีที่แพร่หลายที่สุดที่ใช้ในการตรวจสอบสถานที่เกิดเหตุ บทความปริทัศน์นี้จะกล่าวถึงประวัติการค้นพบสารลูมินอลและการประยุกต์ใช้ในทางนิติวิทยาศาสตร์ โครงสร้างของลูมินอลและกลไกการเกิดปฏิกิริยาเคมีลูมิเนสเซนส์โดยเฉพาะอย่างยิ่งกับบทบาทของเลือดในการเร่งปฏิกิริยาเคมีลูมิเนสเซนส์ นอกจากนี้บทความยังกล่าวถึงการใช้งานจริงของสารลูมินอลในการตรวจหาคราบเลือดแฝงบนพื้นผิวชนิดต่างๆ และความคงทนของลูมินอลรวมถึงปัญหาของสารรบกวนที่สามารถกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยากับลูมินอลได้และผลกระทบของการใช้ลูมินอลต่อการตรวจเลือดและวิเคราะห์ดีเอ็นเอในขั้นตอนต่อไป บทความนี้ยังได้กล่าวถึงการนำลูมินอลไปประยุกต์ใช้กับงานวิจัยทางชีวภาพเช่นการพัฒนาเทคโนโลยีไบโอเซ็นเซอร์ (Biosensor) ในงานการวิเคราะห์สารชีวโมเลกุลต่างๆในร่างกาย (Bioanalysis) และการตรวจหาโมเลกุลชีวภาพหลากหลายชนิดด้วยเทคนิค Immunoassay ซึ่งจะนำไปสู่ความก้าวหน้าในด้านการวินิจฉัยโรคทางคลินิกและการวิจัยทางชีวการแพทย์อีกด้วย

คำสำคัญ: ลูมินอล, นิติวิทยาศาสตร์, คราบเลือดแฝง, เคมีลูมิเนสเซนส์

¹ ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา จังหวัดชลบุรี 20131

Abstract

Luminol has long been a mainstay in forensic science, serving as a crucial tool for detecting latent bloodstains that elude the naked eye at crime scenes. Its effectiveness stems from the principle of chemiluminescence, where luminol emits a characteristic blue light upon oxidation in the presence of blood. This distinctive luminescence has made luminol testing an indispensable technique in crime scene investigations. This comprehensive review article delves into the rich history of luminol's discovery and its extensive forensic applications. It meticulously examines the structural composition of luminol and unravels the intricate mechanism of its chemiluminescent reaction, particularly emphasizing the pivotal role of blood in accelerating the reaction. The review further explores the practical aspects of luminol utilization, encompassing its efficacy on diverse surfaces, its remarkable sensitivity in detecting even minute blood traces, and its versatility in various crime scene scenarios. However, the review also acknowledges the limitations of luminol, including its susceptibility to interference from extraneous substances and its potential impact on subsequent bloodstain and DNA analysis. It meticulously discusses strategies to mitigate these limitations and ensure the integrity of forensic investigations. In addition to its established role in latent blood detection, this review also highlights the emerging applications of luminol in biological science research such as biosensor technology, opening new frontiers in bioanalysis. It envisions the potential of luminol-based immunoassay for the detection of a wide range of biomolecules, paving the way for advancements in clinical diagnostics and biomedical research.

Keyword: Luminol, Forensic science, Latent blood stain, Chemiluminescence

บทนำ

ของเหลวจากร่างกายที่พบบ่อยในสถานที่เกิดเหตุอาชญากรรมคือ เลือด น้ำอสุจิและน้ำลาย ในขณะที่ของเหลวอื่นๆ เช่น สารคัดหลั่งจากช่องคลอด ปัสสาวะและเหงื่อล้วนมีความสำคัญต่อการสร้างนำไปสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA profile) เพื่อการตรวจพิสูจน์ตัวบุคคลในทางนิติวิทยาศาสตร์เช่นกัน เลือดของมนุษย์มีองค์ประกอบมากมายโดยเซลล์เม็ดเลือดแดง (Erythrocytes) เป็นเซลล์ที่มีอยู่มากที่สุด ทำหน้าที่ในการขนส่งออกซิเจนไปทั่วร่างกาย ส่วนเซลล์เม็ดเลือดขาว (Leukocytes) ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการรักษาแผลและต่อสู้กับการติดเชื้อจะมีดีเอ็นเออยู่ภายในเซลล์ เมื่อมีเลือดออก ร่างกายจะตอบสนองเบื้องต้นโดยการส่งเซลล์เม็ดเลือดขาวไปยังบริเวณแผลเพื่อช่วยในการซ่อมแซม ดังนั้นแผลที่รุนแรงหรือแผลลึกจะส่งผลให้มีเซลล์เม็ดเลือดขาวอยู่รอบๆ จุดบาดแผลเริ่มต้นในปริมาณที่สูงกว่าเซลล์อื่นๆ [1] การตรวจสอบคราบเลือดจำเป็นต้องใช้การทดสอบเบื้องต้น (Presumptive test) และการทดสอบเพื่อยืนยัน (Confirmatory test) ร่วมกัน การทดสอบเบื้องต้นนั้นมีหลายวิธีเช่นการใช้ เบนซิดีน (Benzidine), เตตระเมทิลเบนซิดีน (Tetramethylbenzidine: TMB), การทดสอบคาสเทลเมเยอร์ (Kastle Meyer test) และการทดสอบลิโวโคมาลาโคคทีกรีน (Leucomalachite Green Test: LMG) เป็นต้น [2]

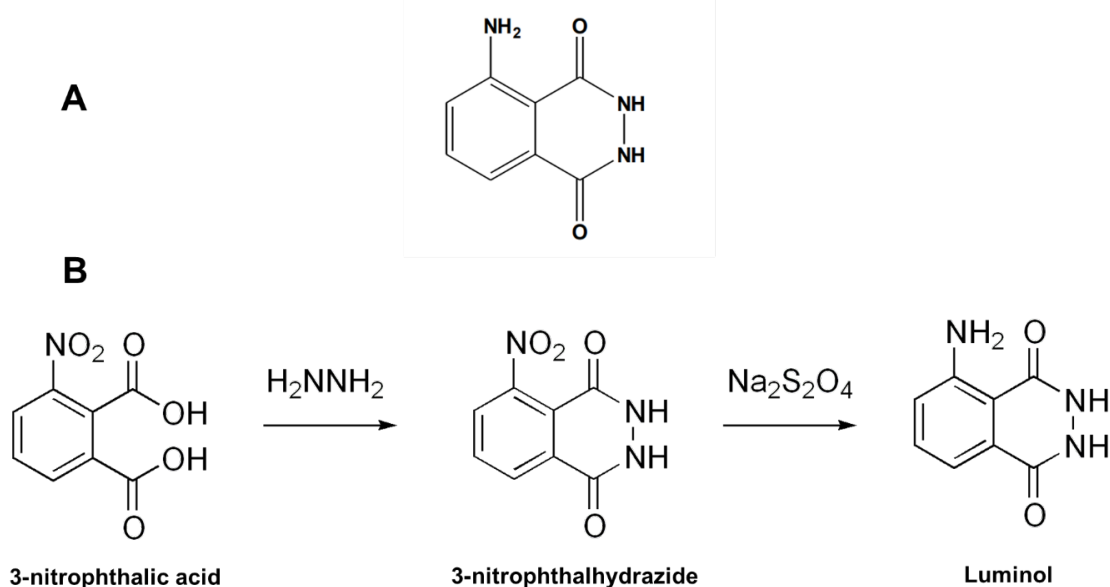
การใช้สารลูมินอลเป็นอีกวิธีหนึ่งที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายในการตรวจคราบเลือดทั้งที่มองเห็นด้วยตาเปล่าและคราบเลือดแฝง เนื่องมาจากเป็นวิธีที่มีความไวสูงกว่าวิธีอื่นๆ สามารถตรวจหาคราบเลือดแฝงได้แม้จะมีปริมาณเพียงเล็กน้อย นอกจากนี้การเรืองแสงของลูมินอลจะช่วยให้เจ้าหน้าที่นิติวิทยาศาสตร์มองเห็นตำแหน่งที่อาจมีคราบเลือดแม้ในสภาพแวดล้อมที่มีแสงน้อย บทความนี้จะกล่าวถึงโครงสร้างทางเคมีของลูมินอล หลักการทำงานและกลไกการเรืองแสงเคมีลูมินเนสเซนส์ การประยุกต์ใช้ที่หลากหลายของสารลูมินอลที่ไม่ได้จำกัดอยู่แค่ในทางนิติวิทยาศาสตร์เท่านั้นแต่ยังถูกนำมาใช้ในงานทางด้านชีวภาพและชีวการแพทย์อีกด้วย บทความนี้ยังได้กล่าวถึงบทบาทของสารลูมินอลในการแพทย์เช่นการนำไปพัฒนาเป็นไบโอเซ็นเซอร์ที่มีความไวสูงสำหรับตรวจจับสารชีวโมเลกุล

ต่าง ๆ ซึ่งเทคโนโลยีนี้ในปัจจุบันนับว่ามีความสำคัญในการวิจัยทางการแพทย์ การวินิจฉัยโรคและการพัฒนาใหม่ๆ ประวัติการค้นพบสารลูมินอล

ในปี ค.ศ. 1908 A.J. Schmitz นักวิทยาศาสตร์ชาวเยอรมันประสบความสำเร็จในการสังเคราะห์สารลูมินอล (Luminol: 5-amino-2,3-dihydrophthalazine-1,4- dione หรือ 3-aminophthalhydrazide) ได้เป็นครั้งแรกต่อมาในปี ค.ศ. 1928 H.O. Albrecht นักเคมีชาวเยอรมันได้ค้นพบคุณสมบัติเรืองแสงสีฟ้าของสารลูมินอลเมื่อผสมกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Hydrogen peroxide) ในสารละลายต่าง โดยมีเหล็ก (Fe^{2+}) หรือ ทองแดง (Cu^{2+}) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา การค้นพบในครั้งนี้แม้จะไม่ได้ถูกนำไปประยุกต์ใช้ในทันทีที่แต่กลับกลายเป็นจุดเริ่มต้นของการปฏิวัติวงการนิติวิทยาศาสตร์ในอนาคต[3] ในปี ค.ศ. 1937 Walter Specht นักนิติวิทยาศาสตร์ชาวเยอรมันค้นพบคุณสมบัติพิเศษของลูมินอลที่สามารถทำปฏิกิริยากับไอออนของเหล็ก (Iron ion) ในสารเฮมิน (Hemin) ที่เป็นองค์ประกอบของฮีโมโกลบินในเลือดเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ส่งผลให้เกิดปฏิกิริยาเคมีลูมิเนสเซนส์ (Chemiluminescence) ปลดปล่อยพลังงานออกมาทำให้เกิดการเรืองแสงสีฟ้า การค้นพบนี้เป็นรากฐานที่สำคัญทางนิติวิทยาศาสตร์ในการพัฒนาวิธีตรวจหาคราบเลือดแฝงที่มองไม่เห็นด้วยตาเปล่าในที่เกิดเหตุและเป็นเครื่องมือสำคัญในการคลี่คลายคดีอาชญากรรม [3, 4] ลูมินอลรวมถึงสารอนุพันธ์ถูกนำไปใช้ประโยชน์ในงานวิจัยด้านชีวภาพอย่างหลากหลายรวมถึงนำไปประยุกต์ใช้ในเทคนิคการวิเคราะห์ทางชีวภาพที่อาศัยหลักการเคมีลูมิเนสเซนส์อีกด้วย [5, 6, 7, 8] ในปัจจุบันลูมินอลยังเป็นที่สำคัญที่เจ้าหน้าที่พิสูจน์หลักฐานใช้ตรวจหาคราบเลือดในที่เกิดเหตุอาชญากรรม โดยเทคนิคนี้เรียกว่า "การทดสอบลูมินอล" (Luminol test) ความไวในการตรวจจับเลือดของลูมินอลและการเรืองแสงด้วยปฏิกิริยาเคมีลูมิเนสเซนส์ จะช่วยให้เจ้าหน้าที่ปฏิบัติงานทางนิติวิทยาศาสตร์สามารถมองเห็นร่องรอยของเลือดที่อาจถูกซ่อนเร้นหรือทำความสะอาดไปแล้วได้อย่างชัดเจน [3, 9]

กลไกการเรืองแสงของลูมินอล

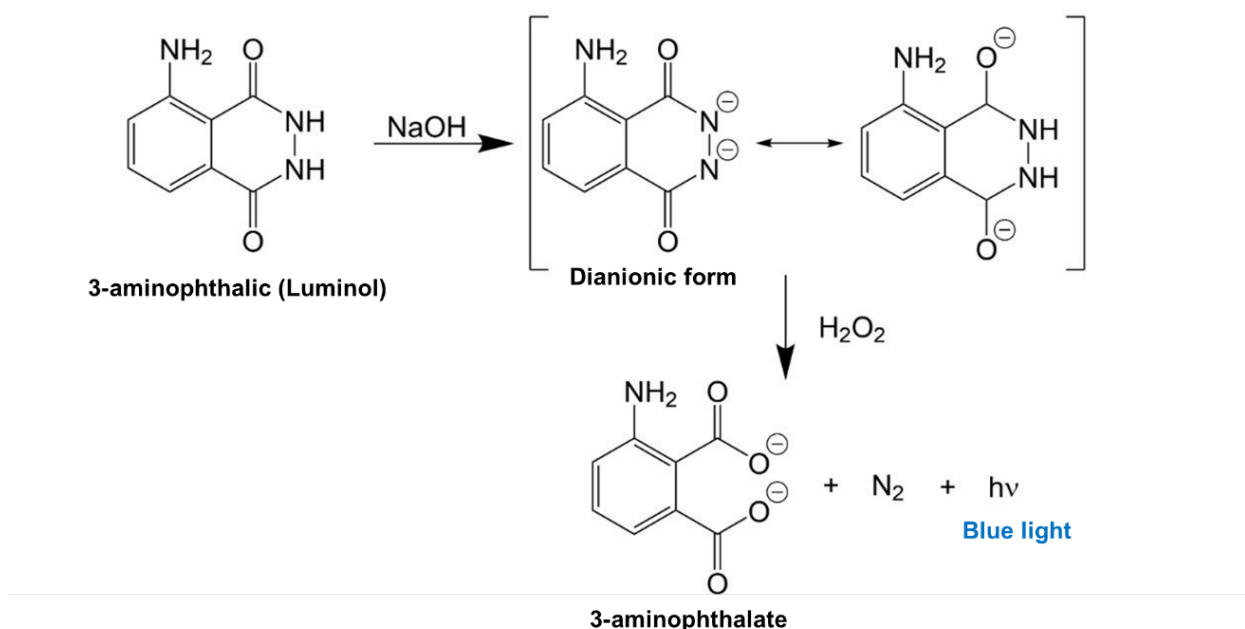
ลูมินอลมีสูตรทางเคมีคือ $\text{C}_8\text{H}_7\text{N}_3\text{O}_2$ จัดเป็นสารในกลุ่ม Acyl hydrazide ที่มีโครงสร้างแบบ Cyclic diacyl hydrazide (รูปที่ 1A) สังเคราะห์ออกมาในรูปของแข็ง มีสีขาวอมเหลือง สามารถละลายได้ดีในตัวทำละลายที่มีขั้ว (ยกเว้นน้ำ) เช่นในสารละลาย Sodium hydroxide (NaOH), Soda ($\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot n\text{H}_2\text{O}$) และ Sodium perborate (NaBO_3) เมื่ออยู่ในรูปสารละลาย ลูมินอลจะมีความไวต่อ ตัวออกซิไดซ์ แสง อีออนของโลหะ กรดและด่างแก่สูง สภาวะที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยาเคมีลูมิเนสเซนส์ของลูมินอลคือในสภาวะที่เป็นด่างโดยมีค่า pH อยู่ในช่วง 10-13 ซึ่งจากการวิจัยพบว่าที่ pH 11.5 เป็นสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการตรวจคราบเลือดแฝงโดยใช้ลูมินอล [1, 10]



รูปที่ 1 A: โครงสร้างทางเคมีของลูมินอล B: ปฏิกิริยาทางเคมีในการสังเคราะห์ลูมินอล [1]

ลูมินอลถูกสังเคราะห์ขึ้นผ่านกระบวนการสองขั้นตอน โดยเริ่มจากนำไฮดราซีน (N_2H_4) และ 3-nitrophthalic acid มาให้ความร้อนในตัวทำละลายจุดเดือดสูง เช่น ไตรเอทิลีนไกลคอล และกลีเซอรอล จากนั้นเมื่อเกิดปฏิกิริยาการควบแน่น โดยมีการสูญเสียน้ำออกไปทำให้เกิดเป็น 3-nitrophthalhydrazide ขึ้น ขั้นตอนถัดมาเป็นการเกิดปฏิกิริยารีดักชัน (Reduction) ของหมู่ไนโตร (Nitro group) ของ 3-nitrophthalhydrazide ไปเป็นหมู่อะมีโน (Amino group) โดยใช้ Sodium dithionite ($Na_2S_2O_4$) ผ่านสารกึ่งกลาง hydroxylamine ทำให้เกิดเป็นสารลูมินอลขึ้น (รูปที่ 1B) [11]

การเรืองแสงของสารละลายลูมินอลนั้นเกิดจากปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างจาก 3-aminophthalic ไปเป็น 3-aminophthalate ในสถานะที่เป็นต่าง โดยลูมินอล (LH_2) จะเกิดการสูญเสียโปรตอน (Deprotonated) เกิดเป็น Monoanionic (LH^-) และ Dianionic form (L^{2-}) จากนั้นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์จะออกซิไดซ์ลูมินอลได้ผลผลิตเป็นสาร Diazoquinone และ Peroxide ions เมื่อสัมผัสกับคราบเลือด เฟอร์รัส (Fe^{++}) อีออนที่เป็นองค์ประกอบในเลือดจะเร่งปฏิกิริยาทำให้ Diazoquinone เกิดเป็น Endoperoxide ซึ่งจะเกิดการสูญเสียไนโตรเจนออกจากโครงสร้างทำให้ได้ผลิตภัณฑ์เป็น Dicarboxylate ion ที่อยู่ใน Excited state คือ 3-amino phthalic และจะปลดปล่อยพลังงานแสงที่มีความยาวคลื่นประมาณ 425 นาโนเมตรออกมาเพื่อกลับสู่ Ground state ในรูปของ 3-aminophthalate [3] (รูปที่ 2)



รูปที่ 2 กลไกการเกิดปฏิกิริยาเคมีลูมิเนสเซนซ์ของลูมินอล [3]

การประยุกต์ใช้ลูมินอลกับงานทางด้านนิติวิทยาศาสตร์

1. การใช้ลูมินอลในการตรวจหาคราบเลือดแฝงในสถานที่เกิดเหตุอาชญากรรม

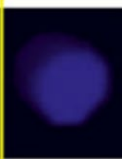
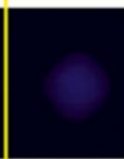
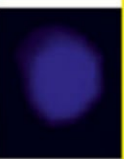
การตรวจหาคราบเลือดแฝงด้วยสารลูมินอลมีบทบาทสำคัญในกระบวนการสืบสวนสอบสวน โดยเจ้าหน้าที่พิสูจน์หลักฐานจะฉีดพ่นสารละลายลูมินอลที่มีส่วนผสมของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ลงบนพื้น ผืนผ้า หรือวัตถุต่างๆ เพื่อสังเกตการเรืองแสง ก่อนจะทำการเก็บหลักฐานคราบเลือดไปทำการตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอ โดยที่ลูมินอลจะทำปฏิกิริยากับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และฮีโมโกลบินในเลือดที่ทำหน้าที่เหมือนเป็นเอนไซม์ Peroxidase (Peroxidase-like activity) เร่งปฏิกิริยาการเกิดออกซิเดชันและเกิดเป็นสารประกอบที่ไม่เสถียร เมื่อสารประกอบนี้สลายตัวจะปล่อยพลังงานออกมาในรูปของการเรืองแสงสีฟ้า (รูปที่ 3) เฟอร์รัส (Fe^{2+}) อีออนที่เป็นองค์ประกอบในฮีโมโกลบินจะทำหน้าที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาช่วยให้ปฏิกิริยาเกิดขึ้นได้รวดเร็วและแสงสีฟ้าที่เปล่งออกมาสว่างชัดขึ้นและเห็นได้ง่ายแม้อยู่ภายใต้สภาพที่มีแสงน้อยหรือมืดสนิท ซึ่งจะช่วยให้เจ้าหน้าที่นิติวิทยาศาสตร์สามารถค้นหาหลักฐานสำคัญที่อาจถูกมองข้าม

ไปได้ [12] ในงานทางนิติวิทยาศาสตร์ สารลูมินอลจะช่วยให้สามารถมองเห็นคราบเลือดบนเสื้อผ้า เฟอร์นิเจอร์ อาวุธ พื้นผิว หรือแม้แต่ร่างกายที่ถูกซุกซ่อนไว้ ทำให้มีประโยชน์อย่างมากในการสืบสวนคดีฆาตกรรม ช่วยระบุจุดเกิดเหตุ เส้นทางของเหยื่อและผู้ต้องสงสัยซึ่งจะนำไปสู่การนำตัวผู้กระทำความผิดมาเข้าสู่กระบวนการยุติธรรมตามกฎหมาย



รูปที่ 3 การเกิดปฏิกิริยาเคมีลูมินเนสเซนซ์ของลูมินอลในการตรวจคราบเลือดแฝง [13]

การตรวจหาคราบเลือดแฝงในที่เกิดเหตุด้วยสารลูมินอลนั้นอาจมีข้อจำกัดบางประการ ซึ่งสารลูมินอลนั้นไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างเลือดมนุษย์กับเลือดจากสัตว์อื่นได้เนื่องจากเฟอร์ริโออินที่เป็นองค์ประกอบในฮีโมโกลบิน นั้นสามารถพบได้ทั้งในมนุษย์และในสัตว์ นอกจากนี้ลูมินอลอาจเกิดปฏิกิริยากับสารอื่นที่ไม่ใช่เลือด เช่น สารฟอกขาว (Sodium hypochlorite) หรือผลิตภัณฑ์ทำความสะอาดต่างๆ ทำให้เกิดผลบวกปลอม (False positive) ขึ้นได้ จึงได้มีการพัฒนาวิธีตรวจสอบให้มีความไวและความจำเพาะมากขึ้นโดยนำสารละลายลูมินอลที่เตรียมจากสูตรที่พัฒนาขึ้นเพื่อใช้กับการตรวจคราบเลือดในทางนิติวิทยาศาสตร์โดย Weber [14] (A: สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.4 M, B: ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ความเข้มข้น 0.176 M, C: ลูมินอล 0.354 กรัมละลายในสารละลาย A ปริมาตร 62.5 มิลลิลิตร จากนั้นทำการผสมสารละลาย A, B, C และ Deionized water ในอัตราส่วน 1:1:1:7) มาเติมสาร Enhancer สองประเภทได้แก่ยูเรีย (Urea) ซึ่งเป็นสารประกอบอินทรีย์ที่ใช้กันทั่วไปในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง ยา และปุ๋ย และสารประกอบไซโคลเดกซ์ทริน (Cyclodextrin) ที่เป็นสารในกลุ่มโอลิโกพอลิแซ็กคาไรด์ที่เป็นวงแหวนทั้งชนิด แอลฟา (α) เบต้า (β) และแกมมา (γ) จากผลการวิจัยพบว่ายูเรียและสารประกอบไซโคลเดกซ์ทรินชนิด โมโนคลอโรไตรอะซีนิล-เบต้า-ไซโคลเดกซ์ทริน (Monochloro-triazinyl- β -cyclodextrin) ที่มีคุณสมบัติในการจับสารโมเลกุลขนาดเล็กได้ดีจะช่วยเพิ่มความเข้มของแสงและระยะเวลาของการเรืองแสงจากน้ำยาลูมินอลได้อย่างมีนัยสำคัญ (รูปที่ 4) โดยเฉพาะอย่างยิ่งยูเรียที่ทำให้ฮีโมโกลบินในเลือดเสียสภาพธรรมชาติ (Denature) ส่งผลให้เฟอร์รัส (Fe^{2+}) อีออนเกิดปฏิกิริยากับลูมินอลได้ดียิ่งขึ้นโดยสามารถตรวจสอบเลือดที่เจือจางได้ถึง 1/16,000 ส่วน เปรียบเทียบกับการตรวจคราบเลือดด้วยวิธีดั้งเดิมของ Weber ที่มีความไวสูงสุดเพียง 1/4,000 ส่วนเท่านั้น (รูปที่ 4) นอกจากนี้ยูเรียยังช่วยดึงน้ำออกจากโมเลกุลของลูมินอลทำให้มีพื้นที่ในการสัมผัสกับเฟอร์รัสอีออนมากขึ้นด้วย [14] วิธีนี้จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการตรวจหาคราบเลือดแฝงโดยเฉพาะสำหรับคราบเลือดเก่าที่ถูกทิ้งไว้เป็นเวลานานหรือเลือดที่ถูกชะล้างออกไปด้วยผลิตภัณฑ์ทำความสะอาดและช่วยลดการเกิดผลบวกปลอมจากสารฟอกขาวอีกด้วย

Weber method + urea 8M				Weber method			
							
1/2000	1/4000	1/8000	1/16000	1/2000	1/4000	1/8000	1/16000
Blood dilutions							

รูปที่ 4 เปรียบเทียบความเข้มของแสงจากการเกิดปฏิกิริยาเคมีลูมิเนสเซนซ์ของลูมินอลที่เตรียมด้วยวิธีของ Weber และวิธี Weber ที่เติม 8M Urea [14]

2. การตรวจคราบเลือดแฝงโดยอาศัยปฏิกิริยาเคมีลูมิเนสเซนซ์ของอาร์ทีมิซินิน-ลูมินอล

อาร์ทีมิซินิน (Artemisinin) จัดเป็นกลุ่มยาที่ใช้สำหรับรักษาโรคมาลาเรียชนิดที่เกิดจากเชื้อ *Plasmodium falciparum* สารนี้แยกได้จากต้นโกฐจุฬาลัมพา *Artemisia annua* ซึ่งเป็นพืชสมุนไพรของแพทย์แผนจีน ปัจจุบันสามารถผลิตสารอาร์ทีมิซินินปริมาณมากในยีสต์ได้ด้วยเทคนิคทางพันธุวิศวกรรมแล้วทำบริสุทธิ์เพื่อนำมาใช้ประโยชน์ในทางการแพทย์ สารชนิดนี้สามารถแสดงสมบัติคล้ายเอนไซม์ออกซิเดสได้ จึงมีการนำมาพัฒนาเพื่อใช้ในการตรวจหาคราบเลือดแฝงในทางนิติวิทยาศาสตร์เรียกว่าเทคนิค Artemisinin-Luminol Chemiluminescence ซึ่งสามารถตรวจจับและบันทึกการเรืองแสงได้โดยง่ายบนสมาร์ทโฟนทั่วไป เป็นเทคนิคที่สะดวก รวดเร็ว ประหยัดและมีประสิทธิภาพสูงในการตรวจหาหลักฐานคราบเลือดที่เกิดเหตุ [15] โดยหลักการทำงานนั้นจะคล้ายกันกับการเกิดปฏิกิริยาเคมีลูมิเนสเซนซ์ของลูมินอลโดยทั่วไป เริ่มจากการเตรียมสารละลาย Artemisinin-Luminol (AL) ที่ประกอบด้วยสาร Artemisinin ที่มีฤทธิ์เป็นตัวออกซิไดซ์ตามธรรมชาติผสมกับสารลูมินอลซึ่งเป็นสารเรืองแสงในสารละลายต่างโดยไม่ต้องใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ จากนั้นนำไปทดสอบกับตัวอย่างคราบเลือด สาร Artemisinin จะเร่งปฏิกิริยาระหว่างฮีโมโกลบินในเลือดกับลูมินอลเกิดเป็นสารเรืองแสงสีฟ้าขึ้นและสามารถชักล่องสมาร์ทโฟนที่มีกล้องถ่ายรูปที่มีความไวแสงสูงบันทึกภาพการเรืองแสงสีฟ้าได้อย่างชัดเจนโดยไม่ต้องใช้เครื่องมือพิเศษหรือทำในห้องปฏิบัติการ ทำให้ใช้งานได้ง่ายมีกระบวนการไม่ซับซ้อน บุคคลทั่วไปสามารถเรียนรู้และใช้งานได้และมีความไวเทียบเท่ากับวิธีการตรวจคราบเลือดโดยทั่วไป [15]

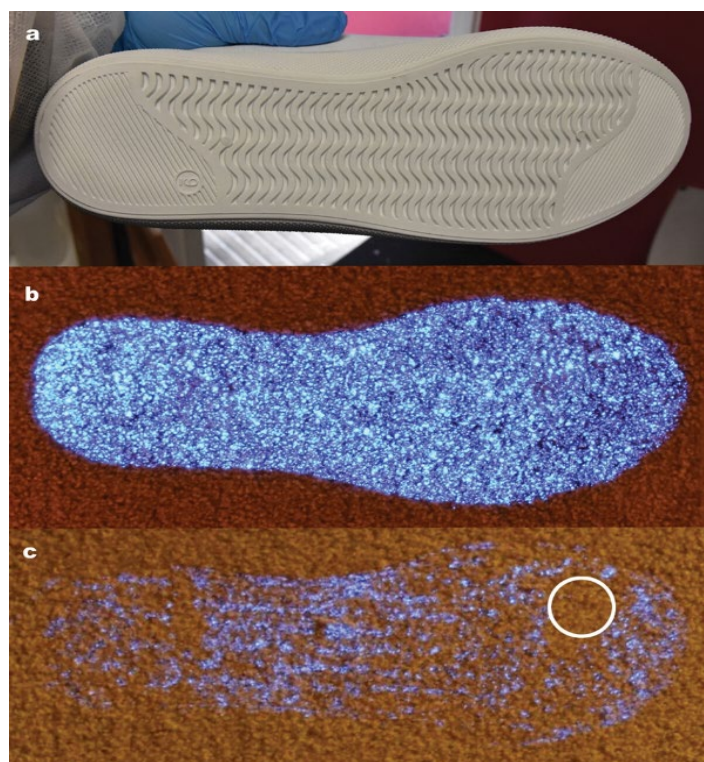
3. การใช้ลูมินอลในการประเมินช่วงเวลาหลังเสียชีวิต

ลูมินอลถูกนำมาใช้ในการประเมินช่วงเวลาหลังการเสียชีวิต (Postmortem Interval, PMI) ซึ่งมีความสำคัญอย่างยิ่งในงานทางนิติวิทยาศาสตร์และอาจรวมไปถึงงานทางด้านโบราณคดีอีกด้วย การประเมิน PMI จะช่วยให้ทราบระยะเวลาที่บุคคลนั้นเสียชีวิตก่อนที่จะพบศพหรือแม้แต่กระทั่งชิ้นส่วนโครงกระดูก ข้อมูล PMI มีความสำคัญต่อการสืบสวนสอบสวน การกำหนดลำดับเหตุการณ์และการประเมินหลักฐานทางนิติวิทยาศาสตร์อื่นๆ ประกอบในคดีอาชญากรรม ซึ่งการที่จะประเมิน PMI ได้แม่นยำนั้นเป็นเรื่องที่ยากเนื่องจากมีปัจจัยต่างๆ มากมายที่เกี่ยวข้อง ปัจจัยเหล่านี้รวมถึงสภาพแวดล้อมภายหลังการเสียชีวิต กระบวนการย่อยสลายของร่างกายเป็นต้น วิธีการประเมิน PMI จะทำได้โดยการตรวจสอบสภาพร่างกายและอวัยวะส่วนต่างๆ การวิเคราะห์กระดูก การวิเคราะห์ชนิดของแมลงที่พบบนศพรวมไปถึงวงจรชีวิตและพฤติกรรมต่างๆ ของแมลง วิธีการเหล่านี้มีข้อจำกัดหลายประการและอาจส่งผลให้การประเมิน PMI ขาดความแม่นยำรวมถึงอาจต้องใช้เวลาและทรัพยากรมาก

เทคนิคการใช้ลูมินอลในการประเมิน PMI เป็นเทคนิคใหม่ที่ใช้ลูมินอลซึ่งเป็นสารเคมีที่สามารถเรืองแสงได้เมื่อสัมผัสกับเลือดและสามารถใช้ตรวจจบบริเวณเลือดที่มองไม่เห็นด้วยตาเปล่า เทคนิคนี้มีข้อดีหลายประการ เช่น รวดเร็ว ง่ายและราคาไม่แพง โดยที่ความเข้มของแสงจากเกิดปฏิกิริยาเคมีลูมินเนสเซนซ์ของลูมินอลจะลดลงเมื่อ PMI เพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตามยังมีปัจจัยอื่นอีกหลายประการที่ส่งผลต่อการประเมิน PMI ด้วยสารลูมินอล ในปีค.ศ. 2024 มีงานวิจัยที่ศึกษาอิทธิพลของปัจจัยที่ส่งผลต่อการย่อยสลายของร่างกายหลังเสียชีวิต (Taphonomic factors) ต่อความแม่นยำของเทคนิคการใช้ลูมินอลในการประเมิน PMI ปัจจัยเหล่านี้รวมถึงอุณหภูมิ ความชื้น ค่า pH และประเภทของดิน [16] โดยใช้กระดูกไหปลาร้า (Clavicles) จำนวน 30 ชิ้นจากตัวอย่างที่ได้จากการชันสูตรร่างผู้เสียชีวิตทั้งเพศชายและเพศหญิงที่มีอายุตอนเสียชีวิตอยู่ในช่วง 25-86 ปี แบ่งกระดูกออกเป็น 8 กลุ่มทดลองแล้วนำไปฝังดินเป็นเวลา 12 เดือน ภายใต้ Decomposition conditions ที่แตกต่างกันคือ ชนิดของดิน (ดินทราย ดินปลูกต้นไม้ pH 4 และ ดินปลูกต้นไม้ pH 6.9) นำไปฝังในพื้นที่ภายนอกอาคารและภายในเรือนเพาะชำ ส่วนอีก 2 กลุ่มจะนำกระดูกไปเผาในเตาเผาอุณหภูมิสูงแบบไฟฟ้า (Electric muffle furnace) ที่อุณหภูมิ 400°C เป็นเวลา 30 นาทีและที่อุณหภูมิ 700°C เป็นเวลา 60 นาที ก่อนที่จะนำตัวอย่างกระดูกทุกกลุ่มไปทดสอบด้วยลูมินอล จากผลการวิจัยพบว่า กระดูกที่ถูกนำไปเผาก่อนการทดสอบไม่พบการเรืองแสงของลูมินอล ส่วนกระดูกที่ฝังไว้ในดินทรายจะเกิดปฏิกิริยาเคมีลูมินเนสเซนซ์ได้ดีกว่าดินชนิดอื่น ๆ [16, 17] ซึ่งแสดงให้เห็นว่าปัจจัยที่ส่งผลต่อการย่อยสลายของร่างกายหลังเสียชีวิตนั้นมีผลต่อการเกิดปฏิกิริยาเคมีลูมินเนสเซนซ์ของลูมินอล เมื่อนำมาใช้ในการประเมิน PMI จึงจำเป็นที่จะต้องคำนึงถึงปัจจัยต่างๆ เหล่านี้ด้วยเช่นกัน

4. การวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA profile) จากคราบเลือดแฝงที่ผ่านการตรวจด้วยสารลูมินอล

ในปี ค.ศ. 2023 ได้มีการวิจัยเบื้องต้นเพื่อประเมินความเป็นไปได้ในการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของมนุษย์จากคราบเลือดแฝงที่ผ่านการตรวจด้วยสารลูมินอลซึ่งเป็นสารเคมีที่เจ้าหน้าที่นิติวิทยาศาสตร์ใช้ตรวจหาคราบเลือดแฝงในที่เกิดเหตุที่มีปริมาณเล็กน้อยและไม่สามารถมองเห็นด้วยตาเปล่า โดยได้ทำการทดลองโดยให้อาสาสมัคร 5 คนที่มีลักษณะทางกายภาพแตกต่างกัน สร้างรอยเลือดจากรองเท้าบนพื้นผิววัสดุ 3 ชนิดที่พบได้ทั่วไปในสถานที่เกิดเหตุจริง ได้แก่ คอนกรีต, เสื่อน้ำมัน และพรม จากนั้นทำการบันทึกปริมาณและการกระจายตัวของทั้งรอยเลือดที่มองเห็นได้ด้วยตาเปล่าและจากรอยเลือดแฝงที่เกิดปฏิกิริยาเคมีลูมินเนสเซนซ์หลังจากทดสอบด้วยลูมินอล จากนั้นทำการเก็บตัวอย่างดีเอ็นเอจากรอยเท้าก้าวแรกและก้าวที่สิบโดยนับจากรอยเท้าที่ตรวจไม่พบสัญญาณการเรืองแสงเคมีลูมินเนสเซนซ์ในบริเวณที่กำหนด (รูปที่ 5) แล้วนำตัวอย่างเหล่านี้ไปเข้าสู่กระบวนการสกัดและวิเคราะห์ดีเอ็นเอ ผลการศึกษาพบว่า แม้รอยเลือดนั้นจะจางจนมองไม่เห็นการเรืองแสงเมื่อตรวจด้วยลูมินอล แต่ก็ยังสามารถสกัดดีเอ็นเอจากแหล่งที่มาของเลือดได้ โดยจากตัวอย่างทั้งหมด 30 ตัวอย่าง สามารถสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอแบบ STR (Short Tandem Repeat) ที่สมบูรณ์ได้ 2 ตัวอย่างที่มีความเฉพาะตัวสูงสามารถนำไปใช้ในการใช้ในการระบุตัวบุคคลได้ นอกจากนี้ นักวิจัยยังสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอบางส่วนที่ประกอบด้วยแอลลีล (Allele) 4 ตำแหน่งขึ้นไปได้ 18 ตัวอย่าง และสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอบางส่วนที่มีแอลลีล ระหว่าง 1 ถึง 3 ตำแหน่งได้อีก 3 ตัวอย่าง (ตารางที่ 1) ถึงแม้ว่าตัวอย่างส่วนใหญ่จะนำไปสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอแบบ STR ได้บางส่วนแต่ก็อาจมีประโยชน์ในการช่วยเหลือการสืบสวนสอบสวนคดีได้ และเป็นที่น่าสนใจว่า ตัวอย่าง 6 จาก 7 ตัวอย่างที่ไม่สามารถสร้างรูปแบบดีเอ็นเอได้เลยนั้นมาจากพื้นคอนกรีตซึ่งพื้นผิวนั้นอาจส่งผลต่อการคงอยู่ของดีเอ็นเอ นอกจากนั้นพบว่าสามารถสร้างรูปแบบดีเอ็นเอได้มากที่สุดและสมบูรณ์ที่สุดจากตัวอย่างรอยเท้าบนเสื่อน้ำมันเมื่อเปรียบเทียบกับพื้นคอนกรีตหรือพรม งานวิจัยนี้ชี้ให้เห็นว่าแม้รอยเลือดจะจางจนไม่สามารถตรวจพบการเรืองแสงด้วยลูมินอล แต่ก็มีความเป็นไปได้ที่จะนำไปทำการสกัดและวิเคราะห์ดีเอ็นเอเพื่อการพิสูจน์ตัวบุคคลและจะเป็นประโยชน์ต่อกระบวนการเก็บหลักฐานและวัตถุพยานในสถานที่เกิดเหตุ [18]



รูปที่ 5 การนำตัวอย่างรอยเลือดจากรองเท้าที่ผ่านการตรวจด้วยลูมินอลไปวิเคราะห์รูปแบบดีเอ็นเอ a) พื้นรองเท้าที่ใช้ในการทดสอบ b) การเรืองแสงรอยเลือดจากรองเท้าที่ตรวจด้วยลูมินอล c) วงกลมสีขาวแสดงถึงบริเวณที่ไม่มีการเรืองแสงและทำการเก็บตัวอย่างไปวิเคราะห์ดีเอ็นเอ [18]

ตารางที่ 1 แสดงผลการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอแบบ STR (Short Tandem Repeat) จากร่องรอยเลือดแฝงที่ผ่านการตรวจด้วยสารลูมินอล

ชนิดของพื้นผิว	จำนวนของอัลลีล			
	0 (No DNA Profile)	1-3 (Partial DNA Profile)	4-39 (Partial DNA Profile)	40 (Full DNA Profile)
พื้นคอนกรีต	6	0	5	0
พรม	1	2	6	0
เสื่อน้ำมัน	0	1	7	2

การประยุกต์ใช้ลูมินอลกับงานทางด้านชีวการแพทย์

ลูมินอลสามารถนำไปประยุกต์ใช้กับงานวิจัยทางชีวการแพทย์ได้หลากหลายด้วยคุณสมบัติการเรืองแสงที่เฉพาะเจาะจงเมื่อทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ในคลาส Oxido-reductase เช่น Peroxidase หรือ Laccase ในสภาวะที่มีไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ คุณสมบัติพิเศษนี้ทำให้ลูมินอลกลายเป็นสารที่ถูกนำไปใช้ในงานวิจัยทางชีวการแพทย์ในการตรวจจับกรดนิวคลีอิกโดยอาศัยความสามารถในการจับกับโมเลกุลดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเออย่างเฉพาะเจาะจงเมื่อเอนไซม์ Peroxidase ทำปฏิกิริยากับลูมินอลที่จับกับดีเอ็นเอหรืออาร์เอ็นเอ จะเกิดการเรืองแสงสีฟ้าขึ้นช่วยให้นักวิจัยสามารถวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอหรืออาร์เอ็นเอได้อย่างถูกต้องแม่นยำ ประโยชน์ของลูมินอลยังขยายไปถึงการตรวจจับเซลล์ที่ตายแล้วในเซลล์ร่างกายมนุษย์ที่เพาะเลี้ยงโดยการติดตามเซลล์ที่ตายแล้วในร่างกายด้วยกลไกการปล่อยเอนไซม์ Peroxidase จากเซลล์ดังกล่าว เมื่อเอนไซม์ทำปฏิกิริยากับลูมินอลจะปรากฏการเรืองแสงสีฟ้าที่สามารถ

ใช้ในการศึกษาปรากฏการณ์การตายของเซลล์ได้ ยิ่งไปกว่านั้นลูมินอลยังมีบทบาทสำคัญในการตรวจจับแบคทีเรียและไวรัสบางชนิดที่ผลิตเอนไซม์ Peroxidase ได้ในตัวอย่างทางชีวภาพต่างๆ ด้วยคุณสมบัติอันหลากหลายลูมินอลจึงมีบทบาทสำคัญในการศึกษาโมเลกุลชีวภาพ เซลล์และจุลินทรีย์ ที่อาจนำไปสู่การพัฒนาเทคนิคการวินิจฉัยและรักษาโรคใหม่ๆ ได้ [7, 8, 19]

1. การใช้ลูมินอลในการตรวจ Fecal occult blood (FOB)

ภาวะ Fecal occult blood (FOB) หรือภาวะที่มีเลือดออกปนเปื้อนมากับอุจจาระเป็นสัญญาณบ่งบอกถึงปัญหาสุขภาพที่เกิดจากโรคในระบบทางเดินอาหารซึ่งแพทย์ใช้เป็นเครื่องมือสำคัญในการวินิจฉัยโรคต่างๆ อาทิ แผลในกระเพาะอาหาร ลำไส้เล็กหรือลำไส้ใหญ่ รวมไปถึงโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่ ในทางการแพทย์จะมีวิธีมาตรฐานในการตรวจหา FOB อยู่ 2 วิธี ดังนี้คือ 1) Guaiac test วิธีนี้ถึงแม้จะมีราคาถูกแต่มีความจำเพาะค่อนข้างต่ำและอาจมีผลบวกปลอม (False positive) ที่เกิดขึ้นจากการมีสารบางชนิดเช่นสารเร่งเนื้อแดงหรือยาบางประเภทปนเปื้อน หลักการของทดสอบนี้คือการอาศัยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และอีโมโกลบินของเลือดที่ทำหน้าที่เสมือนเป็นเอนไซม์ Peroxidase ไปเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของ Guaiac ทำให้เกิดเป็นสีน้ำเงินหรือสีเขียว 2) ทดสอบทางภูมิคุ้มกัน (Immunochemical test) วิธีนี้มีความแม่นยำและจำเพาะสูงกว่า เนื่องจากใช้แอนติบอดีที่เฉพาะเจาะจงต่ออีโมโกลบินของมนุษย์ (Anti-human Hb) แต่มีราคาสูงกว่า Guaiac test [20, 21]

ในปีค.ศ. 2018 มีงานวิจัยที่ใช้สัตว์ทดลองเป็นตัวแทนในการพัฒนาวิธีการตรวจหา FOB โดยใช้หนูทดลอง และใช้ชุดทดสอบลูมินอล (Luminol Reaction Experiment Kit®) ซึ่งใช้ในทางนิติวิทยาศาสตร์เพื่อตรวจหาคราบเลือดในสถานที่เกิดเหตุ โดยเป็นวิธีที่ง่าย รวดเร็วและประหยัด โดยหลักการของเทคนิคนี้จะใช้อีโมโกลบินของเลือดไปเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารลูมินอลในชุดทดสอบส่งผลให้เกิดปฏิกิริยาเคมีลูมิเนสเซนส์เป็นแสงสีฟ้าซึ่งสามารถมองเห็นได้ชัดเจนในที่มืด วิธีนี้ไม่จำเป็นต้องใช้เครื่องมือหรือสารเคมีเฉพาะทางที่ซับซ้อน ใช้เวลาในการทดสอบเพียงระยะสั้นๆ และมีราคาถูก ผลการวิจัยพบว่าวิธีที่ใช้ลูมินอลตรวจหา FOB นั้นทำได้รวดเร็วกว่าวิธีทางภูมิคุ้มกันอีกทั้งยังมีความไวสูงสามารถตรวจจับเลือดในปริมาณเล็กน้อยได้อย่างมีประสิทธิภาพ ในปัจจุบันยังมีความพยายามที่จะพัฒนาเทคนิคนี้ให้มีประสิทธิภาพที่ดี มีความแม่นยำและมีความจำเพาะมากยิ่งขึ้น เพื่อประโยชน์ในการศึกษาทางชีวการแพทย์ต่อไป [20]

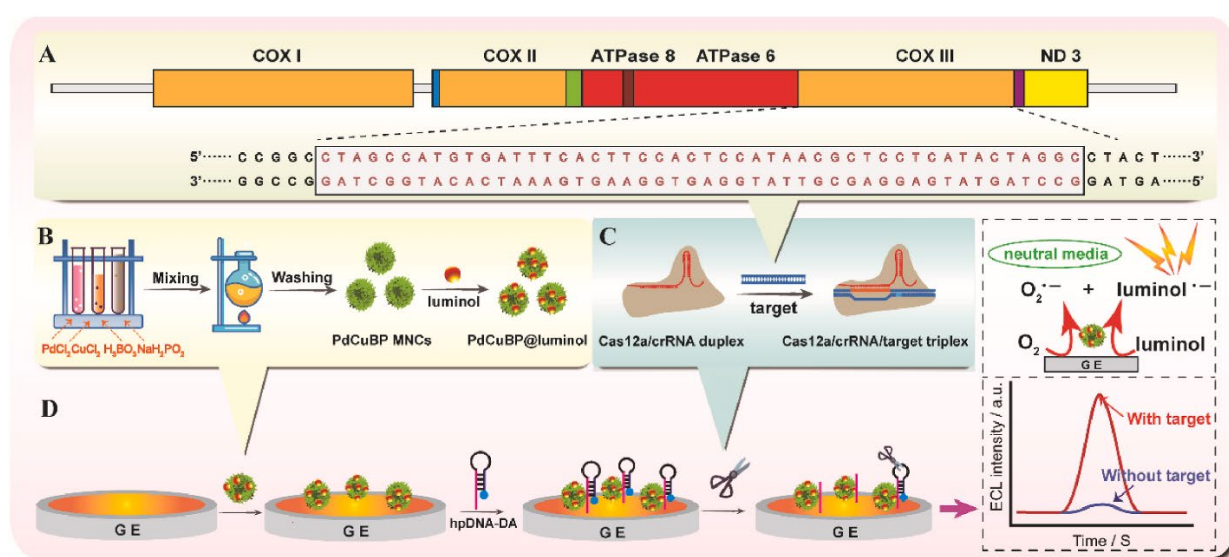
2. การใช้ลูมินอลในการตรวจจับคราบเลือดบนเครื่องมือทันตกรรมหลังการรักษา

ในคลินิกทางทันตกรรมภายหลังการรักษาอาจมีการปนเปื้อนของเลือดบนเครื่องมือที่ทันตแพทย์ใช้เช่น คีมถอนฟัน เข็มฉีดยาและเครื่องมือที่ใช้ขูดหินปูนซึ่งอาจส่งผลต่อสุขอนามัยของผู้ป่วยรวมถึงทันตแพทย์ผู้ทำการรักษาอีกด้วย นอกจากนี้ยังอาจเป็นพาหะของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคต่างๆ ที่เป็นอันตรายต่อสุขภาพ การตรวจหาคราบเลือดบนเครื่องมือทันตกรรมจึงมีความสำคัญ ในปีค.ศ. 2024 ได้มีงานวิจัยที่นำลูมินอลมาใช้ในการตรวจจับคราบเลือดบนเครื่องมือทันตกรรมโดยใช้เลือดมนุษย์ทาบนเครื่องมือทันตกรรมต่างๆ หลังจากนั้นทำการล้างทำความสะอาดเครื่องมือด้วยน้ำและน้ำยาฆ่าเชื้อ แล้วทำการทดสอบการเรืองแสงของสารลูมินอลภายใต้แสงสว่างปกติและภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตทั้งก่อนและหลังการทำความสะอาดเครื่องมือ ผลการวิจัยพบว่าลูมินอลสามารถตรวจจับคราบเลือดบนเครื่องมือทันตกรรมได้อย่างมีประสิทธิภาพ แม้หลังจากผ่านการล้างทำความสะอาดด้วยน้ำและน้ำยาฆ่าเชื้อแล้วและสามารถให้ผลบวกสำหรับเลือดทุกกรุปภายใต้ทั้งแสงสว่างปกติและแสงอัลตราไวโอเล็ต ส่วนประสิทธิภาพของลูมินอลอาจได้รับผลกระทบจากปัจจัยต่างๆ เช่น ปริมาณเลือด สภาพพื้นผิวของเครื่องมือและระยะเวลาที่เลือดเกาะอยู่บนเครื่องมือ [22]

3. การประยุกต์ใช้ลูมินอลกับไบโอเซนเซอร์

ลูมินอลจึงถูกนำมาประยุกต์ใช้ในงานวิจัยทางชีวภาพหลายสาขา รวมถึงการนำไปพัฒนาเทคโนโลยีไบโอเซนเซอร์ (Biosensor) สำหรับการวินิจฉัยโรค ไบโอเซนเซอร์ลูมินอลทำงานบนหลักการของการเกิดปฏิกิริยาเรืองแสงด้วยไฟฟ้าเคมี (Electrochemiluminescence: ECL) ระหว่างลูมินอลกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ปฏิกิริยานี้เกิดขึ้น

เมื่อมีเอนไซม์ที่เกี่ยวข้อง เช่น Peroxidase มากระตุ้น โดยเอนไซม์นี้จะถูกติดฉลากกับแอนติบอดีที่จับกับโมเลกุลเป้าหมายทางชีวภาพ เช่น โปรตีนหรือกรดนิวคลีอิก ในปี ค.ศ. 2022 มีงานวิจัยที่นำลูมินอลมาใช้เป็นไบโอเซนเซอร์สำหรับการวินิจฉัยโรคไตวายเฉียบพลัน โดยใช้ยีน Cytochrome c oxidase subunit III (COX III) ซึ่งเป็นเครื่องหมายชีวภาพที่มีประสิทธิภาพสูงสำหรับการวินิจฉัยโรคไตวายเฉียบพลันระยะแรก โดยทำการตรวจจับยีน COX III ด้วย Electrochemiluminescence Biosensor ชนิดใหม่ที่มีความไวสูง โดยอาศัยหลักการทำงานของระบบ CRISPR/Cas12a ซึ่งเป็นเทคนิคทางพันธุวิศวกรรมในการตัดต่อดีเอ็นเอที่มีความแม่นยำสูงร่วมกับอนุภาคนาโน (Nanoparticles) ที่บรรจุสารลูมินอล อนุภาคนาโนเหล่านี้ถูกออกแบบมาจากโลหะทรานซิชันผสมระหว่างแพลเลเดียม (Palladium: Pd) ทองแดง (Copper: Cu) และมีโบรอน (Boron: B) รวมถึง ฟอสฟอรัส (Phosphorus: P) เป็นองค์ประกอบทำให้อนุภาคนาโนชนิดนี้มีคุณสมบัติพิเศษที่สามารถเปล่งแสง ECL ได้เองในสภาวะกลาง (Neutral media) โดยไม่ต้องอาศัยการกระตุ้นจากภายนอก นอกจากนี้ยังมีพื้นที่ผิวสัมผัสจำเพาะเหมาะสำหรับการยึดจับกับลูมินอลและแสดงฤทธิ์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาคายเอนไซม์ออกซิเดส (Oxidase-like activity) ที่มีประสิทธิภาพสูง (รูปที่ 6)



รูปที่ 6 แสดงโครงสร้างของไบโอเซนเซอร์ลูมินอลชนิดเรืองแสงไฟฟ้าเคมี (Electrochemiluminescence) สำหรับการวิเคราะห์ยีน COX III โดยใช้เทคนิค CRISPR/Cas12a และนาโนอิมิตเตอร์ PdCuBP@luminol: (A) บริเวณเป้าหมายของยีน COX III; (B) ขั้นตอนการสังเคราะห์นาโนอิมิตเตอร์ PdCuBP@luminol; (C) การกระตุ้นระบบ CRISPR/Cas12a; (D) กระบวนการตรวจจับของไบโอเซนเซอร์ลูมินอลและกลไกการปล่อยแสงไฟฟ้าเคมี

ระบบ CRISPR/Cas12a จะทำหน้าที่จำแนกยีน COX III ได้อย่างแม่นยำและทำการตัดแยก Quencher ที่อยู่ติดกับบริเวณ DNA hairpin ซึ่งมีโดปามีน (Dopamine) เป็นองค์ประกอบ Quencher เปรียบเหมือนสารลดทอนแสงซึ่งการตัดแยกส่วนนี้ออกโดยระบบ CRISPR/Cas12a จะทำให้เกิดสัญญาณแสง ECL ที่ชัดเจน ไบโอเซนเซอร์ชนิดนี้ทำให้วิเคราะห์และตรวจจับยีน COX III ได้อย่างมีประสิทธิภาพโดยไม่ต้องอาศัยสารร่วมปฏิกิริยา (Co-reactant) จากภายนอก ด้วยคุณสมบัติการเปล่งแสง ECL ประสิทธิภาพสูงของอนุภาคนาโนและการตัดแยก Quencher โดย CRISPR/Cas12a ทำให้ไบโอเซนเซอร์พัฒนาขึ้นนี้มีความไวสูงต่อ COX III โดยมีขีดจำกัดการตรวจจับ (Detection limit) ต่ำถึง 0.18 pM นอกจากนี้ยังสามารถนำไปประยุกต์ใช้กับตัวอย่างปัสสาวะในงานวินิจฉัยทางคลินิกได้อย่างมีประสิทธิภาพและมีศักยภาพที่จะช่วยให้แพทย์สามารถวินิจฉัยโรคไตวายเฉียบพลันได้อย่างรวดเร็ว แม่นยำและง่ายต่อการใช้งานซึ่งจะส่งผลต่อการรักษาผู้ป่วยได้อย่างทันท่วงที [23]

ในปี ค.ศ. 2022 ได้มีการศึกษาการเพิ่มความเข้มของแสงที่เกิดจากปฏิกิริยาเคมีลูมิเนสเซนส์จากระบบที่ใช้ลูมินอล-ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์-Horseradish peroxidase (HRP) ที่ใช้ในงานไบโอเซนเซอร์หรือระบบตรวจจับชีวโมเลกุลอื่นๆ ด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตแบบคอสโมโทรปิก (Kosmotropic) ซึ่งเป็นวิธีการใหม่ในการเพิ่มประสิทธิภาพของการเกิดเคมีลูมิเนสเซนส์ ทำให้เทคนิคการตรวจวัดแบบลูมิเนสเซนส์มีศักยภาพที่ดีรวมถึงมีความไวและความแม่นยำที่สูงขึ้น [8] โดยกลไกการเพิ่มประสิทธิภาพนั้นจะอาศัยการใช้แอมโมเนียมซัลเฟต (AS) ซึ่งเป็นเกลือที่ละลายน้ำได้ดี มักใช้ในการตกตะกอนโปรตีนในงานวิจัยทางชีวภาพต่างๆ เมื่อเติม AS ที่ความเข้มข้นมากกว่า 2.8 โมลาร์ลงในปฏิกิริยาที่มีลูมินอล-ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์-HRP จะส่งผลต่อความเข้มของแสงเคมีลูมิเนสเซนส์อย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งอาจเป็นผลมาจากผลกระทบของ AS แบบคอสโมโทรปิกต่อโครงสร้างโปรตีน HRP โดย AS จะทำให้เกิดการจัดเรียงโมเลกุลของน้ำรอบๆ โปรตีน HRP ในลักษณะเฉพาะ โดยการจัดเรียงนี้ส่งผลให้ โครงสร้างโมเลกุล HRP เกิดปฏิกิริยาออกซิดะชันกับลูมินอลได้ดียิ่งขึ้นและเกิดการเรืองแสงที่มากขึ้นนั่นเอง การค้นพบนี้มีศักยภาพที่จะนำไปประยุกต์ใช้ในหลากหลายสาขา เช่นนำไปพัฒนาไบโอเซนเซอร์แบบลูมิเนสเซนส์ที่มีความไวสูงเพื่อตรวจจับสารชีวโมเลกุลต่างๆ หรือนำไปใช้ในการวิเคราะห์เอนไซม์แบบลูมิเนสเซนส์และศึกษาปฏิกิริยาของเอนไซม์เป็นต้น อย่างไรก็ตามยังจำเป็นต้องมีการศึกษาและวิจัยเพิ่มเติมในอนาคตเพื่อทำความเข้าใจกลไกการเกิดปฏิกิริยาที่แน่ชัดซึ่งจะนำไปสู่การพัฒนาเทคนิคการตรวจวัดแบบลูมิเนสเซนส์ที่มีประสิทธิภาพสูงขึ้นสำหรับการวิเคราะห์สารชีวโมเลกุลต่างๆ [8]

งานวิจัยในปี ค.ศ. 2023 ได้พัฒนาวิธีการตรวจจับแอลฟา-ฟีโตโปรตีน (Alpha-fetoprotein: AFP) ซึ่งเป็นเครื่องหมายชีวภาพสำหรับการวินิจฉัยโรคมะเร็งตับที่แม่นยำและมีความไวสูงโดยใช้ไบโอเซนเซอร์ที่อาศัยหลักการถ่ายเทพลังงานผ่านกระบวนการ Electrochemiluminescence resonance energy transfer (ECL-RET) กลไกนี้ใช้ประโยชน์จากการทับซ้อนกันระหว่างสเปกตรัมการเปล่งแสง (Emission spectrum) ของสารให้พลังงาน (Donor) กับสเปกตรัมการดูดกลืนแสง (Absorption spectrum) ในช่วงอัลตราไวโอเลต-วิสิเบิล (Ultraviolet-visible, UV-Vis) ของสารรับพลังงาน (Acceptor) โดยใช้ลูมินอลทำหน้าที่เป็นสารให้พลังงานเนื่องจากมีศักย์ออกซิเดชันต่ำ มีประสิทธิภาพการเรืองแสงที่สูงและมีความคงตัวของสัญญาณ ECL แต่ข้อจำกัดของการใช้ลูมินอลคือยึดติดกับพื้นผิวอิเล็กโทรด (Electrode) ได้ยาก ส่งผลต่อประสิทธิภาพ ดังนั้นจึงได้มีการประยุกต์ใช้อนุภาคนาโนแบบหลายชั้น (Multilayer nano particles) เพื่อปรับปรุงประสิทธิภาพการยึดติดโดยใช้เลเยอร์ดับเบิลไฮดรอกไซด์ (Layered double hydroxide: LDH) ซึ่งจัดเป็นวัสดุอนินทรีย์ที่มีความสามารถในการปรับองค์ประกอบทางเคมีของชั้น (Tunable lamellar chemical composition) และแลกเปลี่ยนแอนไอออนระหว่างชั้น (Exchangeable interlayer anions) และยังมีคุณสมบัติเป็นวัสดุพาหะ (Carrier) ที่ดีสำหรับสารชีวโมเลกุลต่างๆ เพราะ มีความเข้ากันได้ทางชีวภาพ (Biocompatible) ไม่เป็นพิษ (Non-toxic) และมีพื้นที่ผิวสัมผัสขนาดใหญ่ (Large surface area) เหมาะสำหรับการยึดติดและกระจายตัวของลูมินอลอย่างสม่ำเสมอ จากนั้นนำ ลูมินอล-LDH และอนุภาคนาโนทองคำ (Au NPs) มาสังเคราะห์นาโนฟิล์มแบบหลายชั้นโดยใช้ Copper sulfide (CuS) เป็นตัวรับพลังงาน ผลการวิจัยพบว่าไบโอเซนเซอร์ที่ปลอดภัยและมีประสิทธิภาพสูงในการตรวจจับ AFP แม้เพียงปริมาณเล็กน้อยได้อย่างแม่นยำสามารถนำไปใช้ในการวิเคราะห์โรคในทางคลินิกได้ [24]

4. การประยุกต์ใช้ลูมินอลในการตรวจวัดสารชีวโมเลกุลเป้าหมายด้วยเทคนิคอิเล็กโทรเคมีลูมิเนสเซนส์อิมมูโนแอสเซย์ (Electrochemiluminescence Immunoassay, ECLIA)

เทคนิคอิเล็กโทรเคมีลูมิเนสเซนส์อิมมูโนแอสเซย์ (Electrochemiluminescence Immunoassay, ECLIA) เป็นเทคนิคการตรวจวัดทางชีวการแพทย์ที่มีความไวและความแม่นยำสูง ใช้ในการตรวจวัดปริมาณของสารชีวโมเลกุลเป้าหมาย (Target biomolecules) ในตัวอย่างทางชีวภาพต่างๆ เช่น เลือด ปัสสาวะ หรือเนื้อเยื่อ เทคนิค ECLIA นี้ได้รับการพัฒนาขึ้นและในปัจจุบันกลายเป็นเครื่องมือสำคัญที่ใช้ในงานวิจัยและวินิจฉัยทางการแพทย์ หลักการของเทคนิค ECLIA นั้นจะอาศัยปฏิกิริยาจับคู่ระหว่างแอนติบอดี-แอนติเจนที่จำเพาะเจาะจง แอนติบอดีจะถูกเชื่อมต่อกับสารเรืองแสง (Luminophore) ผ่านปฏิกิริยาไบโอคอนจูเกชัน (Bioconjugation) สารเรืองแสงนี้จะถูกกระตุ้นให้เกิดแสงสว่างภายใต้กระแสไฟฟ้า ตัวอย่างทางชีวภาพที่ประกอบด้วยสารเป้าหมายจะถูกนำไปรวมกับสารละลายที่มีแอนติบอดี

ที่เชื่อมต่อกับสารเรืองแสง แอนติบอดีจะจับคู่กับสารเป้าหมายอย่างจำเพาะ ส่งผลให้สารเรืองแสงถูกดึงดูดยังพื้นผิวของอิเล็กโทรด เมื่อใช้กระแสไฟฟ้า สารเรืองแสงจะถูกกระตุ้นให้เกิดแสงสว่าง ความเข้มของแสงที่วัดได้จะแปรผันตามปริมาณของสารเป้าหมายในตัวอย่าง [25] เทคนิค ECLIA มีข้อดีหลายประการเมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิคการตรวจวัดอื่นๆ เช่นมีความไวสูงสามารถตรวจจับสารเป้าหมายในปริมาณที่น้อยมากได้อีกทั้งยังให้ผลลัพธ์ที่สอดคล้องกันและเชื่อถือได้นอกจากนี้ยังสามารถให้ผลลัพธ์ได้อย่างรวดเร็วและสามารถวัดปริมาณสารเป้าหมายในช่วงความเข้มข้นที่กว้าง เทคนิคนี้ถูกนำไปประยุกต์ใช้ในหลากหลายสาขาทางการแพทย์และชีวการแพทย์เช่น ใช้ในการวินิจฉัยโรคต่างๆ เช่น มะเร็ง โรคหัวใจ โรคติดเชื้อและโรคทางภูมิคุ้มกันหรือใช้ในการศึกษากลไกของโรครวมถึงการพัฒนาวิธีการวินิจฉัยและรักษาโรคเป็นต้น [26] การประยุกต์ใช้สารลูมิเนสเซนส์ในเทคนิค ECLIA จะใช้หลักการของการแสงเรืองแสงสีฟ้าที่เกิดจากปฏิกิริยาเคมีลูมิเนสเซนส์ของลูมิเนสเซนส์ภายหลังการกระตุ้นด้วยไฟฟ้า (Electrochemiluminescence) โดยสารลูมิเนสเซนส์มีคุณสมบัติในการเรืองแสงสีฟ้าเมื่อถูกกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้นทางไฟฟ้าเคมี โดยในเทคนิค ECLIA แบบแซนด์วิช แอนติบอดีจะจับคู่กับแอนติเจนเป้าหมายบนพื้นผิวแข็ง จากนั้นแอนติบอดีอีกด้านหนึ่งจะจับคู่กับ Secondary antibody ที่เชื่อมต่อกับเอนไซม์ Peroxidase เอนไซม์นี้จะเร่งปฏิกิริยาการเกิดออกซิเดชันของลูมิเนสเซนส์และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ทำให้เกิดการเรืองแสงไฟฟ้าเคมีออกมา เทคนิค ECLIA ที่ใช้ลูมิเนสเซนส์มีความไวสูงกว่าเทคนิคการตรวจวัดแบบเรืองแสงอื่นๆ เหมาะสมสำหรับนำไปใช้ในการตรวจวัดสารชีวโมเลกุลที่มีปริมาณน้อยในร่างกายเช่นฮอร์โมนต่างๆ ได้อย่างมีประสิทธิภาพ [5]

บทสรุป

การเกิดปฏิกิริยาเคมีลูมิเนสเซนส์เป็นวิธีการทางวิทยาศาสตร์ที่ถูกนำไปประยุกต์ใช้สำหรับการวิเคราะห์และวัดปริมาณของสารชีวโมเลกุลกันอย่างแพร่หลายโดยใช้สารเรืองแสงเคมีลูมิเนสเซนส์ (Chemiluminescent agents) หลากหลายชนิดที่ เช่น ลูมิเนสเซนส์ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ฟลูออเรสซิน ไดออกซิเจน อนุพันธ์ออกซาเลตและสีย้อมอะคริดิเนียม โดยแต่ละชนิดจะมีความจำเพาะทางชีวภาพ (Biological specificity) และประโยชน์ใช้สอยที่แตกต่างกัน บทความนี้ได้นำเสนอแนวโน้มและการประยุกต์ใช้ลูมิเนสเซนส์เป็นสารเรืองแสงเคมีลูมิเนสเซนส์ในงานด้านนิติวิทยาศาสตร์ ชีวการแพทย์และวิทยาศาสตร์คลินิก ลูมิเนสเซนส์เป็นสารเรืองแสงเคมีลูมิเนสเซนส์ที่ได้รับความนิยมอย่างมากสำหรับการศึกษาและวิจัยทางชีวภาพเนื่องจากสามารถหาได้ง่ายและมีราคาประหยัด สารละลายลูมิเนสเซนส์ในสถานะที่เป็นต่างจะเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันกับตัวออกซิไดซ์ต่างๆ อาทิ โอโซน (Ozone) ฮาโลเจน (Halogens) ซิงเกิลเลตออกซิเจน (Singlet oxygen) เปอร์ซัลเฟต (Persulphates) ไฮโปคลอไรท์ (Hypochlorite) หรือ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) และ $K_3Fe(CN)_6$ ส่งผลให้เกิดการเรืองแสงเคมีลูมิเนสเซนส์สีฟ้าที่มีความยาวคลื่นสูงสุด (λ_{max}) 425 นาโนเมตร ซึ่งสารลูมิเนสเซนส์ไม่เพียงแต่ทำปฏิกิริยาออกซิเดชันกับตัวออกซิไดซ์โดยตรงเท่านั้นแต่ยังสามารถทำปฏิกิริยากับสารออกซิเดชันอื่นๆ ได้อีกด้วยโดยอาศัยตัวเร่งปฏิกิริยา (Catalyst) เช่น เอนไซม์ฮอร์สเรดิชเพอร์ออกซิเดส (Horseradish peroxidase: HRP) แลคโตเพอร์ออกซิเดส (Lactoperoxidase) และแลคเคส (Laccase) เป็นต้น โดยที่ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์จะเป็นตัวออกซิไดซ์ที่มีความสำคัญที่สุดในการเรืองแสงเคมีลูมิเนสเซนส์ เนื่องจากช่วยเพิ่มความเข้มของแสงของลูมิเนสเซนส์ได้อย่างดี ดังนั้นระบบ HRP-ลูมิเนสเซนส์-ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ จึงจัดเป็นระบบการออกซิเดชันเพื่อให้เกิดการเรืองแสงเคมีลูมิเนสเซนส์ที่สำคัญและถูกนำไปประยุกต์ใช้ในงานวิจัยทางชีวภาพอย่างมากมาย นอกจากนั้นเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสสามารถเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันกับลูมิเนสเซนส์ได้ในสถานะที่ไม่รุนแรงต่างจากสารออกซิเดชันอื่นๆ ที่จะเกิดการออกซิเดชันในสถานะแวดล้อมที่มีความเป็นต่างสูงที่อาจส่งผลให้เกิดการเสียสภาพ (Denaturation) ของโปรตีนและส่งผลต่อการทำงานของเอนไซม์ได้

ตารางที่ 2 แสดงการเปรียบเทียบความไวและความจำเพาะของการตรวจคราบเลือดด้วย Presumptive test [27]

Presumptive test	Sensitivity	Specificity
Kastle–Meyer test	18%	100%
Leucomalachite green	18%	98%
Benzidine test	0%	100%
Luminol test	90%	100%

สารลูมินอลยังมีความจำเพาะสูง (High Specificity) สามารถเกิดปฏิกิริยาได้อย่างจำเพาะกับสารบางชนิดเท่านั้นทำให้การวิเคราะห์มีความแม่นยำสูง นอกจากนี้สารลูมินอลยังใช้งานได้ง่าย (Simplicity) ไม่ซับซ้อนโดยอาศัยเพียงการผสมสารละลายลูมินอลกับตัวอย่างและสารเร่งปฏิกิริยา (Catalyst) โดยไม่ต้องใช้เครื่องมือที่ยุ่งยากทำให้เหมาะสำหรับใช้งานในห้องปฏิบัติการขนาดเล็กหรือแม้กระทั่งในภาคสนาม ลูมินอลยังมีความไวสูง (High sensitivity) สามารถตรวจจับสารได้ในปริมาณที่น้อยมากซึ่งคุณสมบัติข้อนี้มีประโยชน์อย่างยิ่งในทางการแพทย์ ด้วยข้อดีเหล่านี้จึงมีการนำลูมินอลไปประยุกต์ใช้ในหลากหลายสาขา ตัวอย่างที่เด่นชัดที่สุดคือในทางนิติวิทยาศาสตร์ที่สารลูมินอลถูกนำไปใช้ตรวจหาคราบเลือดแฝงในสถานที่เกิดเหตุอาชญากรรม ลูมินอลจะทำปฏิกิริยากับเหล็ก (Iron) ในฮีโมโกลบินของเม็ดเลือดแดงส่งผลให้เกิดการเรืองแสงสีฟ้าขึ้น นอกจากนี้ในงานด้านชีวการแพทย์มีการนำลูมินอลไปพัฒนาไปโอเซนเซอร์ที่สามารถตรวจจับสารชีวโมเลกุลต่างๆ ได้อย่างแม่นยำ ตัวอย่างเช่นการตรวจหาปริมาณโปรตีนหรือฮอร์โมนในร่างกายที่ต่ำผิดปกติซึ่งอาจเป็นสัญญาณของการเกิดโรคได้เป็นต้น สารลูมินอลถูกนำไปใช้กับเทคนิคอิมมูโนแอสซัย (Immunoassays) เพื่อแสดงการทำงานของยีนหรือการมีอยู่ของสารชีวโมเลกุลชนิดใดชนิดหนึ่งในร่างกายได้เช่นกัน ในปัจจุบันยังคงมีการค้นคว้าและวิจัยอย่างต่อเนื่องเพื่อนำสารลูมินอลไปประยุกต์ใช้ในศาสตร์แขนงอื่นๆไม่ว่าจะเป็นการใช้เป็นยีนรายงานผล (Reporter gene) สำหรับงานทางด้านพันธุวิศวกรรมในการติดตามตำแหน่งของยีนที่ทำการตัดต่อลงไปภายในเซลล์จากการเรืองแสงของลูมินอลแทนการใช้ยีน Chloramphenicol acetyl transferase (CAT) หรือใช้ในการติดตามสภาพแวดล้อม (Environmental monitoring) โดยอาศัยความสามารถในการตรวจจับโลหะหนักหรือสารปนเปื้อนอื่นๆ เป็นต้น

เอกสารอ้างอิง

- [1] Silva R, Agustini B, Lopes da Silva AL, Frigeri H. Luminol in the forensic science. *Journal of Biotechnology and Biodiversity*. 2012;3:172-7.
- [2] Brenzini V, Pathak R. A comparison study of the detection of bloodstains on painted and cleaned surfaces with luminol. *Forensic Science International*. 2018;289:75-82.
- [3] Firoozbakhtian A, Hosseini M. Chemiluminescence Sensors in Bioanalysis. In: Narayan R, editor. *Encyclopedia of Sensors and Biosensors (First Edition)*. Oxford: Elsevier; 2023. p. 341-56.
- [4] Barni F, Lewis SW, Berti A, Miskelly GM, Lago G. Forensic application of the luminol reaction as a presumptive test for latent blood detection. *Talanta*. 2007;72(3):896-913.
- [5] Firoozbakhtian A, Sojic N, Xu G, Hosseini M. Electrochemiluminescence Sensors in Bioanalysis. In: Narayan R, editor. *Encyclopedia of Sensors and Biosensors (First Edition)*. Oxford: Elsevier; 2023. p. 317-40.
- [6] Hong X, Qi F, Wang R, Jia Z, Lin F, Yuan M, et al. Ascorbate peroxidase 1 allows monitoring of cytosolic accumulation of effector-triggered reactive oxygen species using a luminol-based assay. *Plant physiology*. 2023;191(2):1416-34.

- [7] Sánchez-Trasviña C, Galindo-Estrada JD, Tinoco-Valencia R, Serrano-Carreón L, Rito-Palomares M, Willson RC, et al. Laccase-luminol chemiluminescence system: an investigation of substrate inhibition. *Luminescence : the journal of biological and chemical luminescence*. 2023;38(3):341-9.
- [8] Karatani H. Luminol-hydrogen peroxide-horseradish peroxidase chemiluminescence intensification by kosmotrope ammonium sulfate. *Analytical sciences : the international journal of the Japan Society for Analytical Chemistry*. 2022;38(3):613-21.
- [9] Mohammad Beigi S, Mesgari F, Hosseini M, Aghazadeh M, Ganjali MR. An enhancement of luminol chemiluminescence by cobalt hydroxide decorated porous graphene and its application in glucose analysis. *Analytical Methods*. 2019;11(10):1346-52.
- [10] Khan P, Idrees D, Moxley MA, Corbett JA, Ahmad F, von Figura G, et al. Luminol-based chemiluminescent signals: clinical and non-clinical application and future uses. *Applied biochemistry and biotechnology*. 2014;173(2):333-55.
- [11] Huntress E, Stanley L, Parker A. The Preparation of 3-Aminophthalhydrazide for Use in the Demonstration of Chemiluminescence. *Journal of the American Chemical Society*. 1934;56(1):241-2.
- [12] Cassidy BM, Lu Z, Martin JP, Tazik SK, Kellogg KW, DeJong SA, et al. A quantitative method for determining a representative detection limit of the forensic luminol test for latent bloodstains. *Forensic Science International*. 2017;278:396-403.
- [13] Cameron A, Oxenham M. Chapter 7 - The postmortem interval and skeletal remains. In: Hayman J, Oxenham M, editors. *Estimation of the Time since Death*: Academic Press; 2020. p. 141-64.
- [14] Stoica BA, Bunescu S, Neamtu A, Bulgaru-Iliescu D, Foia L, Botnariu EG. Improving Luminol Blood Detection in Forensics. *Journal of forensic sciences*. 2016;61(5):1331-6.
- [15] Gao W, Wang C, Muzyka K, Kitte SA, Li J, Zhang W, et al. Artemisinin-Luminol Chemiluminescence for Forensic Bloodstain Detection Using a Smart Phone as a Detector. *Analytical Chemistry*. 2017;89(11):6160-5.
- [16] Ermida C, Cunha E, Ferreira MT. Luminol and the postmortem interval estimation - influence of taphonomic factors. *International journal of legal medicine*. 2024;138(3):1109-16.
- [17] Sarabia J, Pérez-Martínez C, Hernández del Rincón JP, Luna A. Study of chemiluminescence measured by luminometry and its application in the estimation of postmortem interval of bone remains. *Legal Medicine*. 2018;33:32-5.
- [18] Taylor A, van Oorschot RAH, Durdle A. Detection of fresh blood by luminol and DNA after walking over various substrates. *Australian Journal of Forensic Sciences*. 2023:1-10.
- [19] Tian M, Zhao L, Wang Y, Liu G, Zhang P. Determination of Glucose by the Catalysis of Luminol Chemiluminescence Using One-Step Synthesized Platinum/Silver Nanoparticles as a Peroxidase Mimetic. *Analytical Letters*. 2023;56(4):643-55.
- [20] Park AM, Tsunoda I. Forensic luminol reaction for detecting fecal occult blood in experimental mice. *BioTechniques*. 2018;65(4):227-30.
- [21] Federici A, Giorgi Rossi P, Borgia P, Bartolozzi F, Farchi S, Gausticchi G. The immunochemical faecal occult blood test leads to higher compliance than the guaiac for colorectal cancer screening programmes: a cluster randomized controlled trial. *Journal of medical screening*. 2005;12(2):83-8.

- [22] Senthilkumar A, Ravindran V, Arthanari A, Ramalingam K. Evaluation of Forensic Luminol in Detection of Blood Stains in Instruments Following Dental Treatment. *Cureus*. 2024;16(4):e57676.
- [23] Liu C, Ren L, Li X, Fan N, Chen J, Zhang D, et al. Self-electrochemiluminescence biosensor based on CRISPR/Cas12a and PdCuBP@luminol nanoemitter for highly sensitive detection of cytochrome c oxidase subunit III gene of acute kidney injury. *Biosensors & bioelectronics*. 2022;207:114207.
- [24] Liang W, Cong B, Lai W, Jiang M, Ma C, Zhao C, et al. An electrochemiluminescence resonance energy transfer biosensor based on Luminol-LDH and CuS@Pt for detection of alpha-fetoprotein. *Talanta*. 2023;261:124669.
- [25] Ju H, Lai G, Yan F. 6 - Electrochemiluminescent immunosensing. In: Ju H, Lai G, Yan F, editors. *Immunosensing for Detection of Protein Biomarkers*: Elsevier; 2017. p. 171-206.
- [26] Hong G, Su C, Huang Z, Zhuang Q, Wei C, Deng H, et al. Electrochemiluminescence Immunoassay Platform with Immunoglobulin G-Encapsulated Gold Nanoclusters as a “Two-In-One” Probe. *Analytical Chemistry*. 2021;93(38):13022-8.
- [27] Butler J, Chaseling J, Wright K. A Comparison of Four Presumptive Tests for the Detection of Blood on Dark Materials. *Journal of forensic sciences*. 2019;64(6):1838-43.