

การพัฒนาอุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษสำหรับตรวจวัดไนเตรท และไนไตรท์ ในเขม่าดินปืน

Development of Microfluidic Paper Based Analytical Devices for Determination of Nitrate and Nitrite in Gunshot Residues

รุ่ง คำปู้* ศิริรัตน์ ชูสกุลเกรียง และ ศุภชัย ศุภลักษณ์นารี

Rung Kumpoo, Sirirat Choosakoonkriang and Supachai Supalaknari

สาขานิติวิทยาศาสตร์ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร วิทยาเขตสนามจันทร์

Forensic science, Department of Chemistry, Faculty of Science, Silpakorn University, Sanamchandra Palace Campus

*E-mail: rungkumpoo01@gmail.com โทร. 091-4144258

บทคัดย่อ

ผู้วิจัยประดิษฐ์อุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษ (μ PADs) เพื่อใช้ตรวจหาปริมาณไนเตรทและไนไตรท์ในตัวอย่างเขม่าดินปืน โดยการพิมพ์สกรีนบนกระดาษด้วยขี้ผึ้ง และตรวจวิเคราะห์ไนไตรท์ด้วยปฏิกิริยาการเกิดสีกับรีเอเจนต์ Griess การตรวจวัดไนเตรทใช้โลหะ Zn เป็นตัวรีดิวส์ เปลี่ยนไอออนไนเตรทไปเป็นไอออนไนไตรท์ ในการวัดปริมาณไนเตรทและไนไตรท์ด้วยอุปกรณ์นี้ ผู้วิจัยวัดค่าความเข้มของสีที่ปรากฏขึ้นบนอุปกรณ์โดยใช้โปรแกรม imageJ อ่านค่าสี RGB ของภาพอุปกรณ์ในการตรวจวัดพบว่ามีความสัมพันธ์กันในการหาปริมาณเท่ากับ 0.02 nmol สำหรับการตรวจวัดทั้งไนเตรทและไนไตรท์ เมื่อเก็บรักษาอุปกรณ์ตรวจวัดนี้ในที่มืด ณ อุณหภูมิห้อง และแช่แข็งเป็นเวลา 7 วัน อุปกรณ์นี้ยังคงมีความเสถียรในการวัดปริมาณไนไตรท์ ในขณะที่การวัดปริมาณไนเตรทยังคงความเสถียรเมื่อเก็บรักษาอุปกรณ์นี้ในสภาวะข้างต้นเป็นเวลา 2 วัน ตัวอย่างเขม่าดินปืนที่นำมาวิเคราะห์เป็นตัวอย่างที่เก็บมาจากปลอกกระสุนและจากมือผู้ยิงปืน เมื่อเปรียบเทียบปริมาณไนเตรทและไนไตรท์ในเขม่าดินปืนที่วัดได้ด้วยอุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษ กับที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิคไอออนโครมาโตกราฟี พบว่าข้อมูลมีความสัมพันธ์กันเป็นอย่างดีเมื่อพิจารณาจากสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ที่มีค่าเท่ากับ 0.983 และ 0.968 สำหรับไอออนไนเตรทและไนไตรท์ตามลำดับ อย่างไรก็ตามปริมาณไนเตรทและไนไตรท์ในเขม่าดินปืนที่วิเคราะห์ได้ด้วยอุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษมีค่ามากกว่าที่ตรวจวัดด้วยวิธีไอออนโครมาโตกราฟีเล็กน้อย ดังจะเห็นได้จากความชันของกราฟความสัมพันธ์ที่มีค่าเท่ากับ 1.295 และ 1.445 สำหรับไอออนทั้งสองตามลำดับ อุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษที่พัฒนาในงานวิจัยนี้เป็นวิธีวิเคราะห์เขม่าดินปืนที่สะดวก มีค่าใช้จ่ายต่ำ และอาจนำไปใช้ในงานตรวจวัดเขม่าดินปืนในอนาคต

คำสำคัญ : ไนเตรท ไนไตรท์ เขม่าดินปืน อุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษ

Abstract

Microfluidic paper-based analytical devices (μ PADs) have been fabricated to determine nitrate and nitrite ions in samples of gunshot residues (GSR). The μ PADs were created by screen printing with beeswax and the analysis of nitrite ions was based on the color reaction using a Griess reagent. For nitrate analysis, the nitrate ions were converted into nitrite ions by using Zn metal as a reducing agent. The devices were used to quantify the nitrate and nitrite contents from the color intensity of the μ PADs images read by an ImageJ software in RGB color space. It was found that the limits of quantification for both ions were 0.02 nmol. The storage of μ PADs in the dark at ambient temperature and freeze condition for 7 days provided stability for nitrite determination while the stability of μ PADs for nitrate measurement was 2 days in that storage condition. The GSR samples for

the analyses were collected from the cartridge cases and the hands of the shooters. The nitrite and nitrate contents in GSR determined by the μ PADs were compared to those measured by the ion chromatography (IC) technique. The good correlations between the two data sets were observed for both nitrite and nitrate contents as suggested by the correlation coefficients of 0.983 and 0.968 for the two ions respectively. However, the amounts of nitrite and nitrate ions in GSR measured by μ PADs were slightly higher than those determined by the IC technique. The slopes of correlation graphs were 1.295 and 1.445 for nitrite and nitrate ions respectively. The μ PADs developed in this study provides a low-cost and convenient method for GSR analysis and may be used in the field-work detection of GSR.

Keywords : Nitrite, Nitrate, Gunshot residues, microfluidic paper based analytical devices

1. บทนำ

ปัญหาอาชญากรรมในสังคมไทยปัจจุบันปรากฏให้เห็นตามสื่อต่าง ๆ ทั่วไป จากการสำรวจ (NIDA Poll, 2017) พบว่าประชาชนทั่วประเทศส่วนใหญ่ร้อยละ 52.32 ระบุว่า เป็นปัญหาที่มีความรุนแรงมาก และปัญหาอาชญากรรมตามสถิติข่าวความรุนแรงปี 2561 ในช่วง 7 เดือนแรก (Workpoint News, 2018) ปรากฏข่าวความรุนแรงในครอบครัว 367 ข่าว โดยเป็นข่าวฆ่ากันตาย 242 ข่าว คิดเป็นร้อยละ 65.9 และเมื่อวิเคราะห์เชิงลึกในรอบ 4 เดือน (GunPolicy.org, 2019) พบว่าอาวุธที่ใช้ในการก่อเหตุมากที่สุดคืออาวุธปืนร้อยละ 40.5 นอกจากนี้พบว่าคนไทยมีการครอบครองอาวุธปืนเป็นอันดับที่ 39 ของโลก (178 ประเทศ) และสูงที่สุดในกลุ่มประเทศอาเซียน โดยปริมาณการครอบครองปืนแบบจดทะเบียน และปืนเถื่อนรวมทั้งสิ้น 10 ล้านกระบอก และยังมีอัตราการเสียชีวิตด้วยอาวุธปืนเป็น 4.45 คนต่อประชากร 100,000 คน ซึ่งสูงรองลงมาจากประเทศฟิลิปปินส์

เมื่อมีการก่อเหตุเกี่ยวกับอาวุธปืนเกิดขึ้นพยานหลักฐานที่ใช้ในการยืนยันการกระทำผิดคือ อาวุธปืน และเขม่าดินปืน ซึ่งเป็นสิ่งที่เกิดขึ้นภายหลังการยิง มีการกระจายออกทุกทิศทาง และมีขนาดเล็กที่ไม่สามารถมองเห็นด้วยตาเปล่า ต้องทำการขยายหรือวิเคราะห์ด้วยเทคนิคที่ละเอียด (Schwoeble *et al.*, 2000) จึงทำการเก็บเขม่าดินปืน ณ สถานที่เกิดเหตุ และนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องมือทางวิทยาศาสตร์ในห้องปฏิบัติการ เช่น SEM และ ICP สำหรับวิเคราะห์เขม่าดินปืนอินทรีย์ (อนุภาคโลหะ) HPLC และ GC สำหรับวิเคราะห์เขม่าดินปืนอินทรีย์ (สารประกอบไนโตร) สำหรับข้อจำกัดของการวิเคราะห์เขม่าดินปืนคือ บุคลากรต้องมีความชำนาญและทักษะเฉพาะในการใช้เครื่องมือ และยังไม่มีอุปกรณ์สำหรับตรวจวัดเชิงคุณภาพเพื่อคัดกรองในเบื้องต้น ก่อนใช้เครื่องมือในการตรวจยืนยันผลซึ่งใช้เวลาวิเคราะห์นาน และมีค่าใช้จ่ายที่สูง

ปัจจุบันมีงานวิจัยมากมายที่มุ่งพัฒนาหรือสร้างอุปกรณ์สำหรับการตรวจวัดสิ่งต่าง ๆ ให้มีความเหมาะสมในการใช้งานภาคสนาม เนื่องจากมีขนาดเล็ก เคลื่อนย้ายได้ ซึ่งอุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษ (Microfluidic paper-based devices) กำลังได้รับความนิยม และได้มีการนำมาประยุกต์ใช้ในทางสิ่งแวดล้อมเช่น ตรวจวัดไอออนที่มีความเป็นพิษในน้ำ (Sriram *et al.*, 2017) ตรวจวัดไนเตรทและไนไตรท์ในแหล่งน้ำธรรมชาติ (Jayawardane *et al.*, 2014) และทางคลินิก เช่น การตรวจวัดไนไตรท์ในน้ำลายเพื่อช่วยตรวจเกี่ยวกับโรคในช่องปาก (Bhakta *et al.*, 2014) และทางนิติวิทยาศาสตร์เช่นกัน เช่น ตรวจวัดปริมาณไนเตรทและไนไตรท์ในเขม่าดินปืน (Tiawtragul, 2017) ตรวจวัด Fe^{2+} ในน้ำวันลูกตาเพื่อประเมินเวลาการเสียชีวิต และทดลองเทียบกับวิธีมาตรฐาน ICP-MS พบว่าค่าความเข้มข้นของ $Fe(II)$ ไปในแนวทางเดียวกัน จึงทำให้อุปกรณ์นี้มีความน่าเชื่อถือ สามารถนำมาใช้งานจริงได้ (Garcia *et al.*, 2017)

อุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษเป็นอุปกรณ์ราคาถูก พกพาได้ ใช้งานง่าย อีกทั้งยังใช้น้ำยาเคมี และตัวอย่างปริมาณน้อย ได้ถูกนำมาใช้ร่วมกับเทคนิคการตรวจวัดแบบเทียบสี (Colorimetric Detection) เพราะเป็นวิธีที่ง่าย และสามารถทำการวัดการเปรียบเทียบสีด้วยตาเปล่า หรือโดยการถ่ายภาพด้วยกล้องถ่ายรูป หรือเครื่องสแกนเนอร์ จากนั้นวิเคราะห์ความเข้ม

ของสีด้วยโปรแกรม ImageJ (Duenchay and Dungchai, 2014)

ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีสนใจที่จะศึกษาเกี่ยวกับอุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษที่กำลังมีบทบาทในการนำมาประยุกต์ใช้ในทางนิติวิทยาศาสตร์ โดยทำการพัฒนาอุปกรณ์ตรวจวัดสำหรับตรวจวัดไนเตรท และไนไตรท์ ในเขม่าดินปืน โดยอาศัยหลักการทางเคมี ติดตามการเปลี่ยนแปลงของความเข้มสีที่เกิดจากการทำปฏิกิริยาระหว่างไอออนไนไตรท์กับรีเอเจนท์ Griess (Tsikas, 2007) และการตรวจวัดไนเตรทใช้โลหะ Zn เป็นตัวรีดิวส์ เปลี่ยนไอออนไนเตรทไปเป็นไอออนไนไตรท์

2. วิธีการทดลอง

เครื่องมือ และอุปกรณ์

ไมโครปิเปต, กระดาษกรอง whatman เบอร์ 1, ปีกเกอร์ 25, 50, 100 mL, ขวดวัดปริมาตร 10, 50, 100 mL, บล็อกสกรีน, ไม้พันสำลี, ขອງพลาสติกซีปล็อก, กระบอกฉีดยา, หลอดบรรจุของเหลว, Nylon membrane filter ขนาดรูพรุน 0.45 μm , หลอดคาปิลลารี, เครื่องชั่งสาร, เครื่องให้ความร้อน, เครื่องไอออนโครมาโทกราฟี และ Ultrasonic water bath

สารเคมี

Sulfanilamide, N-(1-Naphthyl)-ethylenediamine.2HCl (NED), Citric acid, Zinc dust, Sodium nitrite, Potassium nitrate, Deionized water, Sodium chloride, Potassium dihydrogen phosphate, Potassium sulfate, Beeswax

การเตรียมสารเคมี

สารละลายไนเตรท ชั่ง KNO_3 0.1011 g ละลายในน้ำปราศจากไอออน ปรับปริมาตรให้เป็น 100 mL เพื่อให้มีความเข้มข้นเป็น 10 mM และนำมาเจือจางเพื่อเตรียมความเข้มข้นในช่วง 0.01-400 μM

สารละลายไนไตรท์ ชั่ง NaNO_2 0.0690 g ละลายในน้ำปราศจากไอออน ปรับปริมาตรเป็น 100 mL เพื่อให้มีความเข้มข้นเป็น 10 mM และนำมาเจือจางเพื่อเตรียมความเข้มข้นในช่วง 0.01- 200 μM

Griess reagent ชั่ง citric acid 3.4674 g ละลายด้วยน้ำปราศจากไอออน ปรับปริมาตรเป็น 50 mL เพื่อเตรียม citric acid 330 mM และชั่ง sulfanilamide 0.0865 g ละลายด้วย citric acid 330 mM ปรับปริมาตรเป็น 10 mL เพื่อเตรียมสารละลาย sulfanilamide 50 mM และชั่ง NED 0.0270 g ละลายด้วยน้ำปราศจากไอออน ปรับปริมาตรเป็น 10 mL เพื่อเตรียม NED 10 mM

Zn suspension ชั่ง Zn dust 500 mg ละลายด้วยน้ำปราศจากไอออนปริมาตร 10.0 mL

สถานที่เก็บตัวอย่าง

ทำการเก็บตัวอย่างเขม่าดินปืนบนฝ่ามือและหลังมือทั้งสองข้าง และปลอกกระสุนปืน ณ กองบังคับการฝึกอบรมตำรวจกลาง สนามยิงปืนพวก ตั้งอยู่ที่ ตำบล ศาลายา อำเภอกุสุมาลย์ นครปฐม 73170 และมีอาสาให้ความร่วมมือเก็บตัวอย่างเขม่าดินปืนทั้งหมด 5 คน ใช้อาวุธปืนแบบกึ่งอัตโนมัติ Glock ขนาด 9 มม. ตลอดจนการทดลอง โดยทำการยิง 3 นัดติดกัน และทำการเก็บตัวอย่างเขม่าดินปืนทันที

การเก็บตัวอย่าง

ใช้ไม้พันสำลีที่หยดด้วยน้ำปราศจากไอออนเช็ดบริเวณฝ่ามือและหลังมือทั้งสองข้าง และหยดเฉพาะน้ำปราศจากไอออน รวมทั้งสิ้น 5 ก้าน และบรรจุในซองพลาสติกซีปล็อกแยกแต่ละก้าน

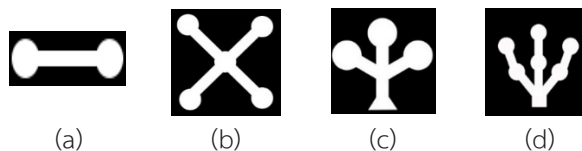
การเตรียมตัวอย่างก่อนการวิเคราะห์

ตัดก้านสำลีแช่ใน vial ที่มีน้ำปราศจากไอออน 2 mL และสำหรับปลอกกระสุนปืน 9 มม. วางแนวตั้งฉากกับปีกเกอร์ และใส่น้ำปราศจากไอออนลงในปลอกกระสุนปืน 0.9 mL และนำไป sonicate เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นนำสารละลายตัวอย่างที่สกัดได้ไปกรองผ่าน Nylon membrane filter ขนาดรูพรุน 0.45 μm และนำไปตรวจวัดด้วย

อุปกรณ์ตรวจวัดไนเตรท และไนไตรท์บนกระดาษ และเครื่องไอออนโครมาโตกราฟ

การประดิษฐ์อุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษด้วยเทคนิค screen printing

1. ออกแบบอุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษด้วยโปรแกรม Adobe Photoshop CS6 ทั้งหมด 4 รูปแบบ ดังภาพที่ 1
2. จัดวางให้ขนาดพอดีกับกระดาษกรองขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 125 ซม. และนำไปทำบล็อกสกรีนขนาด A4 สำหรับสร้างอุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษ
3. วางกระดาษกรองบน hot plate ให้ความร้อนประมาณ 50 °C และวางทับด้วยบล็อกสกรีน
4. สกรีนด้วยสีฟุ้งให้ทั่ว และให้ความร้อนประมาณ 10-15 วินาที หรือจนกว่าสีฟุ้งละลายและซึมลงบนกระดาษกรอง



ภาพที่ 1 รูปแบบอุปกรณ์ตรวจวัด

(a) แบบที่ 1

(b) แบบที่ 2

(c) แบบที่ 3 (Ortiz-Gomez *et al.*, 2016)

(d) แบบที่ 4 (Rossini *et al.*, 2018)

ศึกษาปริมาณสารตัวอย่างและสารละลายมาตรฐาน

หดยดสารละลายสีผสมอาหารลงบริเวณตรวจวัดด้วยหลอดคาปิลลารี และสังเกตการไหลไปยังบริเวณตรวจวัดด้วยปริมาตรที่แตกต่างกันในช่วง 3-20 μL

ศึกษาปริมาตร Griess reagent

หดยดสารละลายสีผสมอาหารลงบริเวณตรวจวัดด้วยหลอดคาปิลลารี และด้วยไมโครปิเปตปริมาตร 1 μL และ 2 μL

ศึกษารูปแบบอุปกรณ์ตรวจวัดที่เหมาะสม

หดยดสารละลายมาตรฐานไนไตรท์ 180 μM และไนเตรท 800 μM บริเวณตรวจวัดตัวอย่าง และเมื่อทำปฏิกิริยากับ Griess reagent และตัวรีดิวซ์ Zn ทำการบันทึกภาพทุก ๆ นาทีจนครบ 5 นาที หลังจากนั้นบันทึกภาพทุก 5 นาทีจน 20 นาที

ศึกษาเวลาที่เหมาะสมในการถ่ายภาพ

หดยด Griess reagent บริเวณตรวจวัดและทิ้งให้แห้ง หลังจากนั้นหดยดสารละลายมาตรฐานไนไตรท์ 1000 μM สังเกตการเปลี่ยนแปลงสีที่เกิดขึ้น และถ่ายภาพทุก ๆ นาทีจนครบ 5 นาที หลังจากนั้นบันทึกภาพทุก 5 นาทีจน 60 นาที

ศึกษาผลของตัวรบกวน

นำสารละลายผสมไนเตรท ไนไตรท์ และสารละลายรบกวน ClSO_4^{2-} และ PO_4^{3-} ความเข้มข้น 1 mM วิเคราะห์ด้วย IC หดยดสารละลายรบกวน ClSO_4^{2-} และ PO_4^{3-} 10 mM ลงบนอุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษ

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ด้วยอุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษ

ความเป็นเส้นตรง หดยดสารละลายมาตรฐานไนเตรท 1-400 μM และไนไตรท์ 1-120 μM บริเวณตรวจวัดตัวอย่างบนอุปกรณ์ตรวจวัดที่มีการเตรียมรีเอเจนต์ และตัวรีดิวซ์ Zn ไว้แล้ว

ความแม่นยำ หดยดสารละลายมาตรฐานไนเตรท 15, 120 และ 400 μM และสารละลายมาตรฐานไนไตรท์ 10, 60 และ 120 μM ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ บริเวณตรวจวัดตัวอย่างบนอุปกรณ์ตรวจวัดที่มีการเตรียมรีเอเจนต์ และตัวรีดิวซ์ Zn ไว้แล้ว

ขีดจำกัดในการหาปริมาณ เลือกใช้ปริมาณไนเตรท และไนไตรท์ที่จุดแรกของกราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณไนเตรท และไนไตรท์ (nmol) กับค่าความเข้มสีเขียว

ความเสถียร หยดสารละลายมาตรฐานไนเตรท 600 μM และไนไตรท์ 120 μM บนอุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษที่มีการบรรจุรีเอเจนต์และตัวรีดิวซ์ไว้ก่อนแล้ว ที่เก็บไว้ภายใต้สภาวะอุณหภูมิห้องแสง อุณหภูมิห้องโดนแสง แสงเย็น และแช่แข็ง วิเคราะห์ต่อเนื่องเป็นเวลา 10 วัน

วิเคราะห์ตัวอย่างเขม่าดินปืนด้วยอุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษ

หยดตัวอย่างเขม่าดินปืนที่ลงบนอุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษที่มีการบรรจุรีเอเจนต์ Griess และตัวรีดิวซ์ไว้ก่อนแล้ว ทั้งให้เกิดสีที่สมบูรณ์ และบันทึกภาพผลการทดลองด้วยกล้อง 6s ระยะห่าง 15 ซม. และนำไปวิเคราะห์ความเข้มสีด้วยโปรแกรม imageJ

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ด้วย Ion chromatography

ความเป็นเส้นตรง วิเคราะห์สารละลายมาตรฐานไนเตรท และไนไตรท์ 0.01-200 μM และนำมาสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ใต้พีคกับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน

ความจำเพาะ วิเคราะห์สารละลายผสมไนเตรทและไนไตรท์ 200 μM และสารละลายไนเตรทไนไตรท์ผสมกับสารรบกวน $\text{Cl}^- \text{SO}_4^{2-} \text{PO}_4^{3-}$ 1 mM และสารละลายไนเตรทไนไตรท์ 1 mM ที่ผสมลงในตัวอย่างเขม่าดินปืน

ความแม่นยำ วิเคราะห์สารละลายผสมไนไตรท์ ไนไตรท์ที่ความเข้มข้น 3 ระดับ 5, 30 และ 120 μM ทดสอบซ้ำความเข้มข้นละ 3 ครั้ง

LOD และ LOQ วิเคราะห์สารละลายมาตรฐานไนเตรท 0.005 μM และไนไตรท์ 0.01 μM ทดสอบซ้ำ 10 ครั้ง

วิเคราะห์ตัวอย่างเขม่าดินปืนด้วย Ion chromatography

หาปริมาณของไนเตรท และไนไตรท์ในตัวอย่างเขม่าดินปืนโดยใช้เครื่อง Ion chromatography โดยควบคุมให้อยู่ในสภาวะที่เหมาะสมดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 สภาวะเครื่อง Ion chromatography (IC)

Ion Chromatography (IC) Dionex ICS-1000	
Program	Dionex CM Dongle Chromeleon 680 SPI build 2238
Eluent	Potassium Hydroxide
Detector	Conductivity
Run time	10 min
Eluting flow rate	1.0 mL/min
Gradient elution	ความเข้มข้นเริ่มต้น 5 mM และความเข้มข้นสุดท้าย 25 mM

3. ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

ผลการประดิษฐ์อุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษ

อุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษประดิษฐ์ขึ้นโดยอาศัยเทคนิค screen printing โดยการสกรีนด้วยซีพิ้งได้ดังภาพที่ 2



ภาพที่ 2 อุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษที่ประดิษฐ์ขึ้นทั้ง 4 แบบ

ผลการศึกษาปริมาตรรีเอเจนท์

การทดสอบด้วยสารละลายปริมาตร 1 และ 2 μL มีการไหลออกมาเกินบริเวณตรวจวัด ดังนั้นการใช้หลอดคาปิลลารีควบคุมปริมาตรให้พอดีกับบริเวณตรวจวัดจึงมีความเหมาะสมกับอุปกรณ์ตรวจวัดไนโตรทและไนไตรท์ทั้ง 4 รูปแบบมากที่สุด

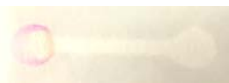
ผลการศึกษาปริมาตรสารตัวอย่างหรือสารละลายมาตรฐาน

สำหรับอุปกรณ์ตรวจวัดไนโตรทและไนไตรท์แบบที่ 1, 2, 3 และ 4 ปริมาตรสารตัวอย่างหรือสารละลายมาตรฐานที่เหมาะสมได้แก่ 7 μL , 10 μL , 20 μL และ 10 μL ตามลำดับ เพราะสามารถเคลื่อนที่จากบริเวณหยดสารตัวอย่างไปยังบริเวณตรวจวัดได้พอดี ส่วนปริมาตรที่น้อยเกินไปจะไม่สามารถเคลื่อนที่ไปยังบริเวณตรวจวัดได้

ผลการศึกษารูปแบบอุปกรณ์ตรวจวัดตรวจวัดบนกระดาษที่เหมาะสม

สำหรับอุปกรณ์ตรวจวัดไนโตรทบนกระดาษแบบที่ 2 และ 4 มีพื้นที่บริเวณตรวจวัดขนาดเล็กมาก ดังนั้นเมื่อหยดรีเอเจนท์จึงควบคุมปริมาตรได้ยาก และไหลเกินออกมายังช่องทางไหล อีกทั้งช่องทางไหลมีขนาดแคบทำให้สารละลายเคลื่อนที่ได้ไม่ดี และสำหรับอุปกรณ์ตรวจวัดไนโตรทบนกระดาษแบบที่ 1 ไม่มีพื้นที่ที่เหมาะสมสำหรับ Zn suspension ดังนั้นอุปกรณ์ตรวจวัดไนโตรทและไนไตรท์บนกระดาษแบบที่ 3 จึงมีความเหมาะสมมากที่สุด แสดงดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 อุปกรณ์ตรวจวัดไนโตรทและไนไตรท์บนกระดาษ 4 รูปแบบ

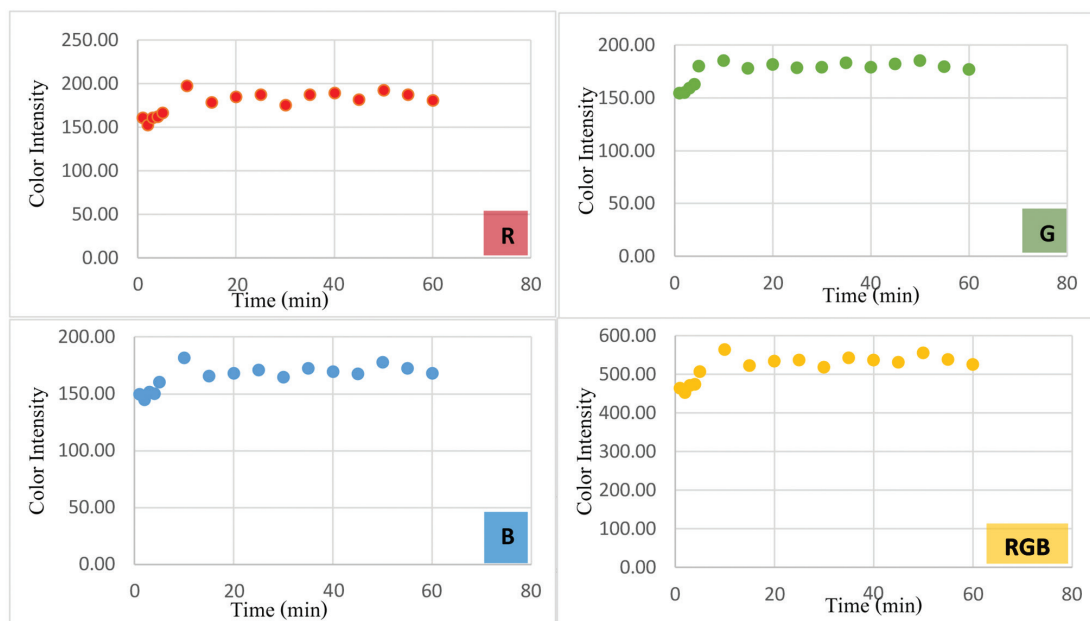
อุปกรณ์ตรวจวัด	ตรวจวัดไนไตรท์ (NO_2^-)	ตรวจวัดไนโตรท (NO_3^-)
แบบที่ 1		
แบบที่ 2		-
แบบที่ 3		
แบบที่ 4		-

ผลการศึกษาเวลาที่เหมาะสมในการถ่ายภาพ

กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเข้มสีแดง เขียว ฟ้า และ RGB ของการตรวจวัดไนโตรท 1000 μM กับระยะเวลาในการถ่ายภาพ 60 นาที แสดงดังภาพที่ 3 พบว่าช่วงเวลา 10-50 นาที ค่าความเข้มสีทั้ง 4 ชนิดมีค่าใกล้เคียงกัน และคงที่ โดยเฉพาะค่าความเข้มสีเขียวมีค่าใกล้เคียงกันมากที่สุด ดังนั้นจึงเลือกค่าความเข้มสีเขียวในการวิเคราะห์ และใช้เวลาถ่ายภาพที่ 10 นาที

ผลการศึกษาตัวรบกวน

จากการหยดสารละลายรบกวน Cl^- , SO_4^{2-} และ PO_4^{3-} บนอุปกรณ์ตรวจวัดไนโตรทบนกระดาษที่มีการหยด Griess รีเอเจนท์ไว้แล้ว เมื่อทิ้งให้เกิดปฏิกิริยาพบว่าไม่เกิดการเปลี่ยนเป็นสีม่วงแดง ดังนั้นการตรวจวัดไนโตรท และไนไตรท์ด้วย Griess รีเอเจนท์บนอุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษไม่ถูกรบกวนด้วยสารรบกวนดังกล่าว



ภาพที่ 3 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเวลาถ่ายภาพ กับค่าความเข้มสี

ผลการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ด้วย μ PAD

ตารางที่ 3 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ μ PAD

	ไนโตรท์	ไนเตรท
สมการเส้นตรง	$y = 23.077x + 168.18$	$y = 3.9272x + 184.94$
R^2	0.9962	0.9943
ความแม่นยำ	0.2 nmol ; %RSD = 0.79 1.2 nmol ; %RSD = 0.59 2.4 nmol ; %RSD = 3.80	0.3 nmol ; %RSD = 2.01 2.4 nmol ; %RSD = 1.57 8.0 nmol ; %RSD = 1.74
LOQ	0.02 nmol	0.02 nmol
ความเสถียร	เก็บได้นานสุด 7 วันที่อุณหภูมิห้องแสง และแช่แข็ง	เก็บได้นานสุด 2 วันทุกสภาวะ

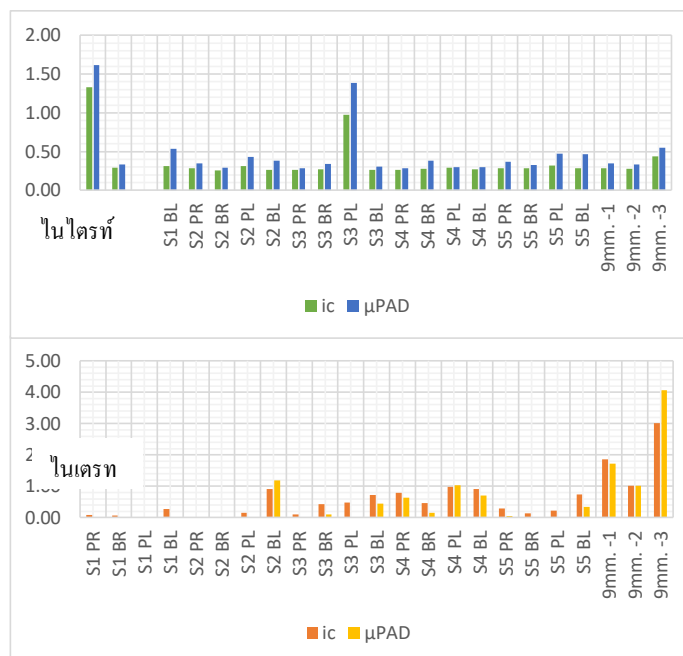
ผลการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ด้วย IC

ตารางที่ 4 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ด้วย IC

	ไนโตรท์	ไนเตรท
สมการเส้นตรง	$y = 0.3897x - 0.0098$	$y = 0.4164x + 0.0107$
R^2	0.9997	0.9974
ความแม่นยำ	0.125 nmol ; %RSD = 3.94 0.75 nmol ; %RSD = 1.80 3 nmol ; %RSD = 0.55	0.125 nmol ; %RSD = 2.54 0.75 nmol ; %RSD = 0.68 3 nmol ; %RSD = 0.87
LOD	0.0016 nmol	0.0015 nmol
LOQ	0.0053 nmol	0.0050 nmol

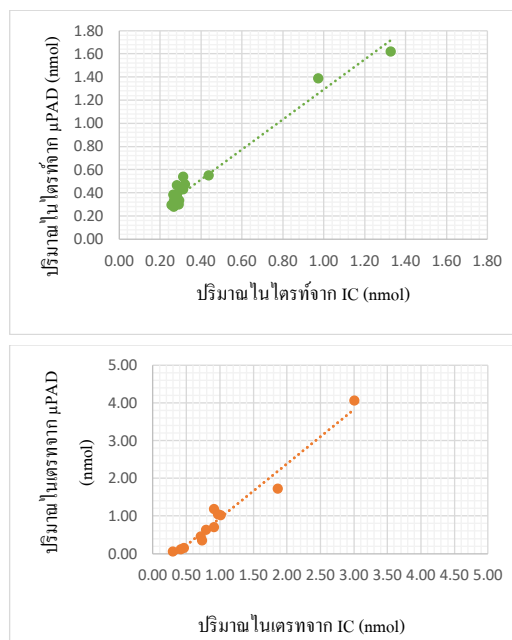
ผลการวิเคราะห์ตัวอย่างเขม่าดินปืน

การศึกษาปริมาณไนเตรทและไนไตรท์ในตัวอย่างเขม่าดินปืน 8 ตัวอย่าง ด้วยเทคนิคไอออนโครมาโทกราฟี และอุปกรณ์ตรวจวัดไนเตรท และไนไตรท์บนกระดาษ (μ PAD) นำข้อมูลไปสร้างแผนภูมิแท่งเปรียบเทียบระหว่างปริมาณไนเตรทและไนไตรท์ ที่ตรวจวัดด้วย 2 วิธีดังกล่าวดังภาพที่ 4



ภาพที่ 4 แผนภูมิแท่งแสดงปริมาณไนไตรท์ และไนเตรทในตัวอย่างเขม่าดินปืน

จากภาพที่ 4 พบว่าปริมาณไนเตรทและไนไตรท์ที่ตรวจวัดได้จาก 2 วิธี ส่วนใหญ่มีค่าที่ใกล้เคียงกัน และเมื่อนำมาวิเคราะห์สหสัมพันธ์ (correlative analysis) สร้างกราฟเพื่อเปรียบเทียบปริมาณไนเตรท และไนไตรท์จากเทคนิค IC และ μ PAD ดังภาพที่ 5 และแสดงสมการเส้นตรงและค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) ดังตารางที่ 5



ภาพที่ 5 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างไนไตรท์และไนเตรทจาก IC และ μ PAD

ตารางที่ 5 สมการเส้นตรงและสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์

ปริมาณที่วิเคราะห์	ไนโตร	ไนเตรท
สมการเส้นตรง	$y = 1.2949x - 0.0036$ $R^2 = 0.966$	$y = 1.4452x - 0.5082$ $R^2 = 0.962$
ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r)	0.983	0.968
ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของ slop	0.054	0.091
ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของ y intercept	0.024	0.0113

จากภาพที่ 5 แสดงให้เห็นว่าการตรวจวัดด้วยวิธี IC และ μ PAD สำหรับปริมาณไนโตรที่มีความสัมพันธ์กัน โดยมีสมการเส้นตรงเป็น $y = 1.2949x - 0.0036$ และปริมาณไนเตรทที่มีความสัมพันธ์โดยมีสมการเส้นตรงเป็น $y = 1.24452x - 0.5082$ เมื่อพิจารณาค่าความชัน (slope) จากสมการเส้นตรงของปริมาณไนโตร และไนเตรทมีค่าเป็น 1.2949 และ 1.4452 ตามลำดับ และเมื่อพิจารณาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) พบว่าการหาปริมาณไนโตรและไนเตรทจากทั้ง 2 วิธีมีความสัมพันธ์กันเป็นอย่างดี โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) เป็น 0.983 และ 0.968 ตามลำดับ ดังนั้นการตรวจวัดไนโตรและไนเตรทด้วยอุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษมีประสิทธิภาพในการตรวจวัดได้เทียบเท่ากับวิธีมาตรฐาน (เทคนิค IC)

4. สรุปผลการทดลอง

งานวิจัยนี้ได้ทำการพัฒนาอุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษเพื่อตรวจวัดไนเตรท และไนโตรในเขม่าดินปืน โดยเลือกใช้เทคนิคการพิมพ์สกรีนด้วยขี้ผึ้งในการสร้างอุปกรณ์ตรวจวัด โดยผู้วิจัยเลือกใช้อุปกรณ์ตรวจวัดรูปแบบที่ 3 ในการตรวจวัดไนเตรท และไนโตร โดยเลือกใช้ปริมาตรรีเอเจนท์ Griess น้อยกว่า 1 μ L หยดด้วยหลอดคาปิลลารี ใช้ปริมาตรสารละลายมาตรฐานหรือสารตัวอย่าง 20 μ L และทำการถ่ายภาพที่เวลา 10 นาที และรักษาระยะห่างระหว่างอุปกรณ์ตรวจวัดกับกล้องที่ 15 ซม.

อุปกรณ์ตรวจวัดไนเตรทและไนโตรบนกระดาษมีขีดจำกัดในการหาปริมาณเป็น 0.02 nmol และสามารถเก็บรักษาอุปกรณ์ตรวจวัดในที่มืด ณ อุณหภูมิห้อง และแห้งเป็นเวลา 7 วัน อุปกรณ์นี้ยังคงมีความเสถียรในการวัดปริมาณไนโตร ในขณะที่ยังคงความเสถียรเมื่อเก็บรักษาอุปกรณ์นี้ในสภาวะข้างต้นเป็นเวลา 2 วัน เมื่อนำผลการวิเคราะห์หาปริมาณไนเตรท และไนโตรในเขม่าดินปืนที่มี และปลดปล่อยสารจากวิธีอุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษมาเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน IC นำมาวิเคราะห์สหสัมพันธ์ (correlative analysis) จากกราฟความสัมพันธ์ของการหาปริมาณไนโตรที่มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เป็น 0.983 และไนเตรทมีค่าเป็น 0.968 ซึ่งทั้งสองมีค่าใกล้เคียงกันและเข้าใกล้ 1 ดังนั้นการตรวจวัดด้วยอุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษมีความสัมพันธ์เป็นอย่างดีกับวิธีมาตรฐาน (เทคนิค IC) และพบว่าไนโตรและไนเตรทในเขม่าดินปืนที่วิเคราะห์ได้ด้วยอุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษมีค่ามากกว่าที่ตรวจวัดด้วยวิธีไอออนโครมาโทกราฟีเล็กน้อย จะเห็นได้จากความชันของกราฟความสัมพันธ์ที่มีค่าเท่ากับ 1.295 และ 1.445 สำหรับไอออนทั้งสองตามลำดับ และอุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษที่พัฒนาในงานวิจัยนี้เป็นวิธีวิเคราะห์เขม่าดินปืนที่สะดวก มีค่าใช้จ่ายต่ำ และอาจนำไปใช้ในงานตรวจเขม่าดินปืนในภาคสนาม

จากผลการศึกษาข้างต้นสอดคล้องกับผลวิจัยของ Jayawardane *et al.* (2014) และคณะสามารถใช้รีเอเจนท์ Griess และตัววัด Zn ในการตรวจวัดไนเตรท และไนโตรได้ รวมไปถึงยังสามารถหาปริมาณไนโตรและไนเตรทจากการวัดค่าความเข้มสีด้วยโปรแกรม imageJ และสามารถเก็บรักษาอุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษได้นานในสภาวะแห้ง และยังสามารถสอดคล้องกับผลวิจัยของ Tiawtragul (2017) ที่ทำการเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ด้วยอุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษพบว่าประสิทธิภาพเทียบเท่ากับวิธีมาตรฐาน หรือให้ผลที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

5. เอกสารอ้างอิง

- Bhakta, S. A., R. Borba, M. Taba Jr, C. D. Garcia and E. Carrilho. 2014. **Determination of nitrite in saliva using microfluidic paper-based analytical devices.** *Analytica chimica acta.* 809: 117-122.
- Duenchay P. and W. Dungchai. 2014. **Paper-based Analytical Device.** *Pathumwan Academic Journal.* 4(10):37-47. (in Thai)
- Garcia, P. T., E. F. Gabriel, G. S. Pessôa, J. C. S. Júnior, P. C. Mollo Filho, R. B. Guidugli and W. K. Coltro. 2017. **based microfluidic devices on the crime scene: A simple tool for rapid estimation of post-mortem interval using vitreous humour.** *Analytica chimica acta.* 974: 69-74.
- GunPolicy.org. 2019. **Armed Violence and Guns in South East Asia.**, <https://www.gunpolicy.org/firearms/region/south-east-asia>. Accessed 2 July 2019.
- Jayawardane, B. M., S. Wei, I. D. McKelvie and S. D. Kolev, 2014. **Microfluidic paper-based analytical device (μ PADs) for the detection of nitrite and nitrate.** *analytical chemistry.* 86(15): 7274-7279.
- NIDA Poll. **Current crime problems in Thai society.** 2017. <http://nidapoll.nida.ac.th/index.php?op=polls-detail&id=556>. Accessed 2 July 2019. (in Thai)
- Ortiz-Gomez, I., M. Ortega-Muñoz, A. Salinas-Castillo, J. A. Álvarez-Bermejo, M. Ariza-Avidad, I. de Orbe-Payá and L. F. Capitan-Vallvey. 2016. **Tetrazine-based chemistry for nitrite determination in a paper microfluidic device.** *Talanta.* 160:721-728.
- Rossini, E. L., M. I. Milani, E. Carrilho, L. Pezza and H. R. Pezza. 2018. **Simultaneous determination of renal function biomarkers in urine using a validated paper-based microfluidic analytical device.** *Analytica chimica acta.* 997:16-23.
- Schwoeble, A. J. and D. L. Exline. 2000. **Current methods in forensic gunshot residue analysis.** 1st ed. CRC Press Publihers. Florida.
- Sriram, G., M. P. Bhat, P. Patil, U. T. Uthappa, H.Y. Jung, T. Altalhi and M. D. Kurkuri. 2017. **based microfluidic analytical devices for colorimetric detection of toxic ions: A review.** *TrAC Trends in Analytical Chemistry.* 93:212-227.
- Tiawtragul O. 2017. **Determination of nitrites and nitrates in gunshot residues by a paper-based device.** *Veridian E-Journal.* 4(5):104-116. (in Thai)
- Tsikis, D. 2007. **Analysis of nitrite and nitrate in biological fluids by assays based on the Griess reaction: appraisal of the Griess reaction in the L-arginine/nitric oxide area of research.** *Journal of Chromatography B.* 851(1-2): 51-70.

(Received: 3/Apr/2019, Revised: 4/May/2020, Accepted: 11/May/2020)