การตรวจหาน้ำลายโดยเทคนิค Visible Spectrophotometry และเทคนิค Attenuated Total Reflection Fourier Transform Infrared Spectroscopy (ATR-FTIR)

โดย

นางสาวกชพร อักษรนำ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชานิติวิทยาศาสตร์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร
ปีการศึกษา 2558

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

การตรวจหาน้ำลายโดยเทคนิค Visible Spectrophotometry และเทคนิค Attenuated Total Reflection Fourier Transform Infrared Spectroscopy (ATR-FTIR)

โดย

นางสาวกชพร อักษรนำ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชานิติวิทยาศาสตร์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร
ปีการศึกษา 2558

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

DETECTION OF SALIVA BY VISIBLE SPECTROPHOTOMETRY AND ATTENUATED TOTAL REFLECTION FOURIER TRANSFORM INFRARED SPECTROSCOPY (ATR-FTIR).

By

Miss Kotchaporn Aksornnam

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

Master of Science Program in Forensic Science

Graduate School, Silpakorn University

Academic Year 2015

Copyright of Graduate School, Silpakorn University

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร อนุมัติให้วิทยานิพนธ์เรื่อง “การตรวจหาน้ำลายโดยเทคนิค Visible Spectrophotometry และเทคนิค Attenuated Total Reflection Fourier Transform Infrared Spectroscopy (ATR-FTIR)” เสนอโดย นางสาว กชพร อักษรนำ เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชานิติวิทยาศาสตร์

.....

(รองศาสตราจารย์ ดร.ปานใจ ธารทัศนวงศ์)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่.....เดือน.....ปี.....

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

อาจารย์ ดร.ศิริรัตน์ ชูสกุลเกรียง

คณะกรรมการตรวจสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ

(อาจารย์ ดร.ศุภชัย ศุภลักษณ์นารี)

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

..... กรรมการ

(อาจารย์ ดร.ยุภาพร สมีน้อย)

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

..... กรรมการ

(อาจารย์ ดร.ศิริรัตน์ ชูสกุลเกรียง)

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

55312302 :สาขาวิชานิติวิทยาศาสตร์
คำสำคัญ : น้ำลาย/ วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตเมทรี / นิติวิทยาศาสตร์

กชพร อักษรนำ : การตรวจหาน้ำลายโดยเทคนิค Visible Spectrophotometryและเทคนิค Attenuated Total Reflection Fourier Transform Infrared Spectroscopy (ATR-FTIR). อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ อ. ดร. ศิริรัตน์ ชูสกุลเกรียง. 46 หน้า.

วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้เพื่อศึกษาการตรวจคราบน้ำลายโดยวิธีร่วมกันระหว่างวิธีเบเนดิกต์กับเทคนิค Visible Spectrophotometry และเทคนิค ATR-FTIR ในการทดสอบด้วยวิธีเบเนดิกต์ตรวจพบตะกอนสีแดงอิฐของ Cu_2O ภายหลังจากการนำคราบน้ำลายมาเติมในน้ำแป้งและเติมสารละลายเบเนดิกต์ลงไป จากนั้นนำสารละลายส่วนใสของสารละลายเบเนดิกต์มาวิเคราะห์โดยเทคนิค Visible Spectrophotometry ผลการทดสอบพบพีคที่มีการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นสูงสุด (λ_{max}) ที่ 736 nm. โดยพบว่าสเปกตรัมของสารละลายเบเนดิกต์ที่เติมน้ำลายลงไปมีค่าการดูดกลืนแสงลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับค่าการดูดกลืนแสงที่เติมน้ำกลั่นลงไปในสารละลาย ซึ่งผลการทดลองนี้สามารถยืนยันว่า สามารถตรวจคราบน้ำลายโดยวิธีเบเนดิต์ได้ สำหรับการทดสอบคราบน้ำลายโดยเทคนิค ATR-FTIR โดยตัวอย่างน้ำลายจะถูกหยดลงบนกระจกสไลด์และปล่อยทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องแล้วขูดมาทดสอบที่ช่วงเวลาต่างๆ IR สเปกตรัมที่ได้ปรากฏพีคที่เด่นชัดของโปรตีน Amide I ที่ช่วงเลขคลื่น 1690 – 1650 cm^{-1} และพีค Amide II ที่ช่วงเลขคลื่น 1590 – 1480 cm^{-1} ที่บ่งชี้ว่าเป็นคราบน้ำลายได้ วิธีทั้งสองนี้สามารถใช้ทดสอบคราบน้ำลายที่ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องได้นานถึง 30 วัน จากการศึกษาแสดงให้เห็นว่าการตรวจคราบน้ำลายด้วยวิธีเบเนดิกต์เป็นวิธีที่ง่ายและสารเคมีก็สามารถหาได้ในห้องปฏิบัติการทั่วๆ ไป ส่วนการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค ATR-FTIR พบว่าเป็นเทคนิคที่สะดวกใช้ตัวอย่างในการวิเคราะห์น้อยและสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจคราบน้ำลายในตัวอย่างจริงได้

สาขาวิชานิติวิทยาศาสตร์ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

ลายมือชื่อนักศึกษา..... ปีการศึกษา 2558

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์.....

55312302 : MAJOR : FORENSIC SCIENCE
KEY WORDS : SALIVA / VISIBLE SPECTROPHOTOMETRY / FORENSIC SCIENCE
KOTCHAPORN AKSORNNAM : DETECTION OF SALIVA BY VISIBLE SPECTROPHOTOMETRY AND ATTENUATED TOTAL REFLECTION FOURIER TRANSFORM INFRARED SPECTROSCOPY (ATR-FTIR). THESIS ADVISOR: SIRIRAT CHOOSAKOONKRIANG, Ph.D. 46 pp.

The objective of this research project is to study the detection of saliva stains by the combined method of Benedict test and Visible Spectrophotometry and the technique of ATR-FTIR. In the Benedict test, the red precipitate of Cu_2O was obtained when the saliva stains were added into the starch solution before applying the Benedict solution. The supernatant was taken for the Visible spectrophotometric measurement. A broad absorption band at the λ_{max} of 736 nm. was observed. The intensity of this band diminished in the spectrum of sample taken from saliva testing as compared to that of the blank sample. The result confirmed the detection of saliva by the Benedict test. In the ATR-FTIR experiment the sample for analysis was the saliva stains deposited on a glass slide and kept at room temperature for a period time. The IR spectrum displayed strong bands of amide I in the range of 1690 cm^{-1}- 1650 cm^{-1} and amide II in the 1590 cm^{-1}- 1480 cm^{-1} region, indicating the presence of proteins in the saliva. The two methods can detect the saliva stains that were left at room temperature for 30 days. The Benedict test is a simple method. It uses common reagents that can be found in any laboratory. The ATR-FTIR technique is a convenient method that require very small amount of sample. It can be applied to the detection of saliva in a real crime sample.

Program of Forensic Science Graduate School, Silapakorn University
Student's signature……..... Academic Year 2015
Thesis Advisor's signature…….

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยครั้งนี้ประสบผลสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีเนื่องจากได้รับความอนุเคราะห์อย่างดียิ่งจากอาจารย์ ดร.ศิริรัตน์ ชูสกุลเกรียง อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ที่ให้ความรู้ ความช่วยเหลือตลอดทั้งตรวจแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้งในความกรุณา และขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงมา ณ โอกาสนี้

ผู้วิจัยใคร่ขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์ ดร.ศุภชัย ศุภลักษณ์นารี ประธานกรรมการตรวจสอบวิทยานิพนธ์ และอาจารย์ ดร.ยุภาพร สมีน้อย กรรมการตรวจสอบวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาสละเวลาเวลาอันมีค่าเป็นคณะกรรมการตรวจสอบวิทยานิพนธ์ครั้งนี้ และให้คำแนะนำ ทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้มีความสมบูรณ์และมีคุณค่ามากขึ้น

นอกจากนี้ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการเคมีมหาวิทยาลัยศิลปากร ในการจัดหาสารเคมีและอุปกรณ์ในการทำวิจัยตลอดจนการให้คำแนะนำและคำอธิบายต่างๆ ในการวิจัยครั้งนี้

สุดท้ายนี้ผู้วิจัยขอขอบคุณ บิดา มารดา ครู อาจารย์ทุกท่าน ที่สั่งสอนอบรมให้ความรู้ และปลูกฝังให้เห็นคุณค่าของการศึกษา รวมทั้งผู้ที่มีส่วนเกี่ยวข้องที่มิได้เอ่ยนามซึ่งมีส่วนช่วยในวิทยานิพนธ์นี้มีความสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

มหาวิทยาลัยศิลปากร

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....จ
กิตติกรรมประกาศ.....ฉ
สารบัญตาราง.....ฌ
สารบัญภาพ.....ญ
บทที่
1 บทนำ1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....2
สมมติฐานของการวิจัย.....3
ขอบเขตของการวิจัย.....3
ประโยชน์ที่จะได้รับ.....3
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....4
ความรู้เกี่ยวกับน้ำลาย.....4
เอนไซม์.....6
การทดสอบเบเนดิกต์.....8
เทคนิค วิสิเบิล สเปกโทรโฟโตเมตรี (Visible Spectrophotometry).....9
เทคนิค อินฟราเรด สเปกโทรสโคปี (Infrared Spectroscopy).....13
บทความและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....16
3 วิธีดำเนินการวิจัย.....18
อุปกรณ์ สารเคมี และเครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย.....18
ตัวอย่างน้ำลายที่ใช้ในการวิจัย.....19
วิธีการทดลอง.....19
การเตรียมตัวอย่างน้ำลายโดยใช้วิธีเบเนดิกต์.....19
การวิเคราะห์น้ำลายโดยเทคนิค Visible Spectrophotometry.....20
การวิเคราะห์น้ำลายโดยเทคนิค ATR-FTIR.....20
การทดสอบระยะเวลาในการเก็บตัวอย่างคราบน้ำลาย.....21

บทที่ หน้า
4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล....23
การทดสอบน้ำลายโดยใช้วิธีเบเนดิกต์....23
การทดสอบค่าความไวของวิธีการทดสอบน้ำลายโดยใช้วิธีเบเนดิกต์....24
การวิเคราะห์คราบน้ำลายโดยใช้วิธีเบเนดิกต์ร่วมกับ
เทคนิค Visible Specrtophotometry....25
การตรวจสอบคราบน้ำลายทดสอบโดยเทคนิค ATR-FTIR....28
การวิเคราะห์คราบน้ำลายที่หยดทิ้งไว้ที่ระยะเวลาต่าง ๆ....28
5 สรุปและอภิปรายผลการทดลอง....31
สรุปและอภิปรายผลการทดลอง....31
ข้อเสนอแนะ....32
รายการอ้างอิง....33
ภาคผนวก....35
ภาคผนวก ก สเปกตรัมของตัวอย่างน้ำลายโดยเทคนิค Visible Spectrophotometry 36
ภาคผนวก ข สเปกตรัมของตัวอย่างน้ำลายโดยเทคนิค ATR-FTIR....42
ประวัติผู้วิจัย....46

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

1 ตัวอย่างการดูดกลืนรังสีอินฟราเรดของหมู่ฟังก์ชันต่างๆ 14
2 อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย.....18
3 สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย.....18
4 เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย.....19
5 การตั้งสภาวะการทำงานของเครื่อง ATR-FTIR ที่ใช้ในการวิจัย 21
6 ผลการทดสอบน้ำลายที่เจือจางที่อัตราส่วนต่างๆ โดยวิธีเบเนดิกต์.....24
7 ผลการทดสอบน้ำลายโดยวิธีเบเนดิกต์และเทคนิค ATR-FTIR.....29

มหาวิทยาลัยศิลปากร

สารบัญภาพ

ภาพที่ หน้า

1 อวัยวะในช่องปาก 4

2 โครงสร้างเคมีของแป้งที่ได้จากการย่อยแป้งด้วยเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส.....7

3 ส่วนประกอบของเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ 13

4 วิธีการทดสอบปฏิกิริยาของวิธีเบเนดิกต์ 20

5 ตัวอย่างคราบน้ำลายตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 6 ชั่วโมง.....21

6 แผนผังวิธีการทดลองในการวิจัย 22

7 การนำน้ำลายผสมกับน้ำแป้งและสารละลายเบเนดิกต์แล้วนำไปต้มในน้ำเดือดเกิดตะกอนสีแดงอิฐของ Cu_2O 23

8 การทดลองเบเนดิกต์ตัวอย่างน้ำลายที่เจือจางด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วนต่างๆ 25

9 สเปกตราของสารละลายเบเนดิกต์ภายหลังจากการเกิดปฏิกิริยากับน้ำลาย วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 400 – 800 nm.....26

10 สเปกตรัมของสารละลายเบเนดิกต์ภายหลังจากการเกิดปฏิกิริยากับน้ำลายที่เจือจางด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:10 (โดยปริมาตร)วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 400 – 800 nm 27

11 สเปกตรัมของสารละลายเบเนดิกต์ภายหลังจากการเกิดปฏิกิริยากับน้ำลายที่เจือจางด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:20 (โดยปริมาตร)วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 400 – 800 nm 27

12 สเปกตรัมของน้ำลายตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 6 ชั่วโมง นำมาขูดแล้วทำการวิเคราะห์โดยเทคนิค ATR-FTIR โดยใช้เลขคลื่น 4000 – 660 cm^{-1} 28

13 สเปกตรัมของน้ำลายตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นำมาขูดแล้วทำการวิเคราะห์โดยเทคนิค ATR-FTIR โดยใช้เลขคลื่น 4000 – 660 cm^{-1} เส้นสีดำ คือ 6 ชั่วโมง, เส้นสีเหลือง คือ 3 วัน และ เส้นสีฟ้า คือ 14 วัน.....29

บทที่ 1
บทนำ

1. ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

คดีอาชญากรรมที่เกิดขึ้นในปัจจุบัน ทั้งที่เป็นคดีฆาตกรรม ข่มขืน ชิงทรัพย์ อุบัติเหตุ สถานที่เกิดเหตุมักพบพยานหลักฐานต่างๆ โดยเฉพาะพยานหลักฐานทางวัตถุที่เกี่ยวข้องกับคดี เช่น รถยนต์ เสื้อผ้า ภาพถ่าย ภาพวีดีโอจากกล้องวงจรปิด และวัตถุทางชีวภาพ เช่น คราบน้ำลาย คราบน้ำอสุจิ คราบโลหิต เส้นผม เส้นขน ซึ่งพยานหลักฐานเหล่านี้มีความสำคัญและสามารถนำไปใช้ในการสืบสวนได้คราบน้ำลาย เป็นคราบที่พบได้ทั่วไปในสถานที่เกิดเหตุการณ์ เช่น คดีข่มขืน คดีเกี่ยวกับการทำร้ายร่างกาย เป็นต้น คราบน้ำลายสามารถตรวจพิสูจน์หาดีเอ็นเอ ซึ่งจากการตรวจสถานที่เกิดเหตุ หากมีการตรวจพบรอยคราบน้ำลายที่ต้องสงสัยนั้นจะต้องมีการนำมาทดสอบเบื้องต้นก่อน เพื่อให้แน่ใจว่า ของเหลวหรือรอยคราบขาวที่จะทำการเก็บนั้นเป็นคราบน้ำลายจริง คราบน้ำลายที่เก็บได้จากสถานที่เกิดเหตุถูกทิ้งไว้เป็นเวลานาน สภาวะทางกายภาพ เช่น สี จะมีการเปลี่ยนแปลงไป บางครั้งผู้ตรวจสอบอาจทำการเก็บคราบอย่างอื่น เช่น รอยคราบแป้ง ไปส่งตรวจพิสูจน์ในห้องปฏิบัติการเพื่อการพิสูจน์หาดีเอ็นเอ จึงจำเป็นต้องแน่ใจว่าได้ทำการวิเคราะห์จากคราบที่เป็นน้ำลายจริงๆ

น้ำลาย คือ สารที่มีลักษณะคล้ายน้ำและมักจะเป็นฟอง ถูกสร้างขึ้นในปากของมนุษย์และสัตว์อื่นๆ น้ำลายสร้างขึ้นจากต่อมน้ำลาย โดยเฉลี่ยประมาณ 0.75 ลิตรต่อวัน ซึ่งน้ำลายของมนุษย์มีสารประกอบหลักคือน้ำ และประกอบด้วยเอนไซม์อิเล็กโทรไลต์ เมือก สารยับยั้งแบคทีเรีย ซึ่งในน้ำลายมีเอนไซม์ที่สามารถย่อยแป้งได้ น้ำลายประกอบด้วยเอนไซม์อะไมเลส (Amylase) ที่สามารถย่อยแป้งให้กลายเป็นน้ำตาลมอลโทส (Maltose) และเดกซ์ทริน (Dextrin) เป็นขั้นตอนแรกในกระบวนการย่อยอาหารของมนุษย์

การตรวจคราบน้ำลายเบื้องต้น คือการตรวจ Amylase test เป็นวิธีการที่ได้รับความนิยมมากที่สุด เพราะเป็นส่วนประกอบที่มีมากในน้ำลายแต่เนื่องจากเป็นเอนไซม์ดังนั้นย่อมเกิดการสลายได้ การตรวจ Starch-iodine เกิดผลบวกปลอมได้จากโปรตีนตัวอื่นๆ เช่น albumin และการตรวจ Phadebas เป็นวิธีการบดยาเม็ด Phadebas และการฉีดพ่นสารละลาย Phadebas บนกระดาษกรอง เพื่อการตรวจเอนไซม์เอลฟา-อะไมเลสที่พบมากในน้ำลาย การตรวจแอลฟา-อะไมเลสถูกนำมาใช้เป็นตัวบ่งชี้ของน้ำลาย อะไมเลสที่สามารถตรวจพบในของเหลวในร่างกายอื่น ๆ เช่น เลือด

ปัสสาวะ อสุจิ จะมีระดับอะไมเลสต่ำกว่าในน้ำลาย โดยทั่วไปอะไมเลสที่พบในของเหลวในร่างกายอื่น ๆไม่ได้มีปริมาณที่เพียงพอสำหรับการตรวจสอบโดยวิธี Phadebas รวมถึง ครีมทามือ โลชั่นเช็ดหน้า ผงทำความสะอาด ทั้งหมดที่กล่าวมาให้ผลบวกเหมือนน้ำลายเช่นกัน การตรวจที่นิยมและเทคนิคที่ใช้ก่อนหน้านี้ มีการตรวจเฉพาะของสารน้ำแต่ละชนิด ซึ่งการตรวจเบื้องต้นอาจทำให้เกิดความเสียหายของตัวอย่างและไม่สามารถทำการตรวจยืนยันได้

ปัจจุบันมีการนำเทคนิคทางด้านเคมีมาใช้ในงานทางด้านนิติวิทยาศาสตร์ และที่ผู้วิจัยสนใจคือเทคนิค Visible Spectrophotometry เป็นเทคนิคการวิเคราะห์สารโดยมีหลักการดูดกลืนแสงที่อยู่ในช่วงอัลตราไวโอเลตและวิสิเบิลที่มีช่วงความยาวคลื่นประมาณ 190-1000 นาโนเมตรของสารนั่นๆได้แก่ สารอินทรีย์สารอนินทรีย์และสารประกอบเชิงซ้อน โดยการนำสารตัวอย่างใส่ในหลอดบรรจุสารตัวอย่าง (cuvette) แล้ววางในบริเวณใกล้แหล่งกำเนิดแสงสารตัวอย่างจะดูดกลืนรังสีหรือแสงบางส่วนไว้แสงที่ไม่ดูดกลืนจะผ่านออกมายังเครื่องวัดแสง (Photomultiplier Tube) เครื่องวัดแสงจะทำการวัดปริมาณแสงที่ออกมาโดยการหักล้างกับปริมาณของแสงก่อนดูดกลืน จากนั้นจะทำการประมวลผลเป็น Curve หรือสเปกตรัมซึ่งแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance) และค่าความยาวคลื่นเทคนิคนี้เป็นเทคนิคที่ง่ายในการวิเคราะห์ตัวอย่างที่ใช้เป็นวัตถุพยานที่ได้จากสถานที่เกิดเหตุ และเทคนิค Attenuated Total Reflection Fourier Transform Infrared Spectroscopy (ATR-FTIR) เป็นเทคนิคที่เกี่ยวข้องกับแสงหรือคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าที่มีลักษณะเป็นแถบพลังงาน สำหรับคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าในช่วงอินฟราเรด จะมีเลขคลื่นในช่วง 4000 – 660 cm^{-1} เป็นเทคนิคสำหรับการวิเคราะห์พื้นผิวของวัตถุ และเทคนิคนี้เหมาะสมกับตัวอย่างที่มีลักษณะทึบแสงหรือมีความหนามาก ใช้ตัวอย่างที่มีขนาดและปริมาณที่น้อยมาก ดังตัวอย่างงานวิจัยของ Charlotte-Maria Orphanou ในปี 2015 ทดสอบของเหลวในร่างกายมนุษย์ที่สามารถพบได้ในการก่อเหตุอาชญากรรม คือ เลือด น้ำลาย น้ำอสุจิและสารคัดหลั่งในช่องคลอด ในงานวิจัยนี้มีการประยุกต์ใช้เทคนิค ATR-FTIR ผลที่ได้สามารถตรวจสอบและแยกความแตกต่างกันระหว่างของเหลวในร่างกายโดยปรากฏสเปกตรัมที่เป็นพีคของโปรตีนในโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับของเหลวในร่างกาย

2. วัตถุประสงค์ของการศึกษา

เพื่อการตรวจยืนยันคราบน้ำลายที่ตรวจพบในสถานที่เกิดเหตุโดยเทคนิค Visible Spectrophotometry และศึกษาระยะเวลาที่สามารถตรวจคราบน้ำลายที่พบในสถานที่

เกิดเหตุได้โดยเทคนิค Attenuated Total Reflection Fourier Transform Infrared Spectroscopy (ATR-FTIR)

3. สมมติฐานของการศึกษา

เทคนิค Visible Spectrophotometry และเทคนิค Attenuated Total Reflection Fourier Transform Infrared Spectroscopy (ATR-FTIR) สามารถตรวจจำแนกน้ำลายได้ และสามารถนำมาใช้ในการตรวจพิสูจน์หลักฐานที่ตรวจพบคราบน้ำลายบนวัตถุต่างๆ เพื่อตรวจหาอะไมเลสที่มีในคราบน้ำลายในปริมาณที่มากพอ ซึ่งเป็นการตรวจยืนยันคราบน้ำลาย

4. ขอบเขตของการศึกษา

ใช้น้ำลายจากอาสาสมัครเพศหญิงนำมาตรวจโดยเทคนิค Visible Spectrophotometry เป็นการศึกษาคราบน้ำลายโดยการหาการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 400 – 800 nm .และเทคนิค Attenuated Total Reflection Fourier Transform Infrared Spectroscopy (ATR-FTIR) จะมีเลขคลื่นในช่วง 4000 – 660 cm^{-1} เป็นศึกษาระยะเวลาคราบน้ำลายโดยตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 30 วัน เพื่อนำมาประยุกต์ใช้ในงานนิติวิทยาศาสตร์ เพื่อใช้เป็นหลักฐานยืนยันการกระทำความผิดของบุคคลต้องสงสัย

5. ประโยชน์ที่จะได้รับ

สามารถใช้เทคนิค Visible Spectrophotometry และเทคนิค Attenuated Total Reflection Fourier Transform Infrared Spectroscopy (ATR-FTIR) ในการตรวจคราบน้ำลายที่พบในสถานที่เกิดเหตุ เพื่อยืนยันว่าเป็นคราบน้ำลายจริงและสามารถยืนยันตัวผู้กระทำความผิดได้ในขั้นตอนต่อไปในทางนิติวิทยาศาสตร์ได้อีกด้วย

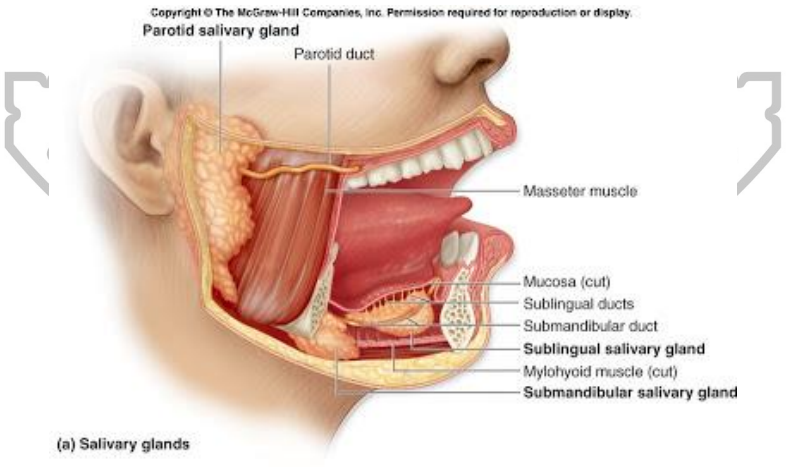
บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. ความรู้เกี่ยวกับน้ำลาย

น้ำลาย คือสารที่มีลักษณะคล้ายน้ำและมักจะเป็นฟอง ถูกสร้างขึ้นในปากของมนุษย์และสัตว์อื่นๆ น้ำลายสร้างขึ้นจากต่อมน้ำลาย โดยเฉลี่ยประมาณ 0.75 ลิตรต่อวัน ซึ่งน้ำลายของมนุษย์มีสารประกอบหลักคือน้ำและประกอบด้วยเอนไซม์อิเล็กโทรไลต์ เมือกสารยับยั้งแบคทีเรีย ซึ่งในน้ำลายมีเอนไซม์ที่สามารถย่อยแป้งได้ เป็นขั้นตอนแรกในกระบวนการย่อยอาหารของมนุษย์

สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมมีต่อมน้ำลายดังนี้

1. Paratid Glands อยู่ที่บริเวณกกหู สร้างน้ำลายชนิดใส
2. Submaxilly Glands อยู่ที่บริเวณขากรรไกรล่าง เป็นส่วนหลักที่สร้างน้ำลายชนิดเหนียว และชนิดใส
3. Sublingual Glands อยู่ใต้ลิ้น สร้างน้ำลายชนิดเหนียวและชนิดใส
4. Minor salivary glands ต่อมน้ำลายย่อยๆ กระจายตัวอยู่ตามริมฝีปากด้านในกระพุ้งแก้มภายในลำคอ



ภาพที่ 1 อวัยวะภายในช่องปาก

ที่มา: น้ำลาย, **อวัยวะภายในช่องปาก**,สืบค้นเมื่อวันที่ 25 พฤศจิกายน 2557. เข้าถึงได้จาก http://bp.blogspot.com/XMH2Og4Jpeo/TeIDodUxV6I/AAAAAAAAOYk/uzvMjGjoPSg/s1600/f26-4a_salivary_glands_c.jpg

1.1 น้ำลายมนุษย์ ประกอบด้วย (สารานุกรมไทยสำหรับเยาวชนไทย, 2557)

1. น้ำมีทั้งหมด 98%
2. อิเล็กโทรไลต์, เอนไซม์, เมือก และสารต้านแบคทีเรีย มีทั้งหมด 2 %

1.1 อิเล็กโทรไลต์ (Electrolytes)

1.1.1 แคลเซียม

1.1.2 แมกนีเซียม

1.1.3 โซเดียม

1.1.4 โพแทสเซียม

1.1.5 สารประกอบคลอไรด์

1.1.6 สารประกอบไบคาร์บอเนต

1.1.7 สารประกอบฟอสเฟต

1.2 เอนไซม์ (Enzyme) มี 3 ชนิดหลักคือ

1.2.1 แอลฟา-อะไมเลส (α-amylase)

1.2.2 ไลโซไซม์ (Lysozyme)

1.2.3 ไลเพสในปาก (Lingual lipase)

1.3 เมือก (Mucus) ประกอบด้วย

1.3.1 ไกลโคโปรตีน (Glycoprotein)

1.3.2 มิวโคพอลิแซ็กคาไรด์ (Mucopolysaccharides)

1.4 สารยับยั้งแบคทีเรีย (Antibiotic)

1.4.1 อิมมูโนกลอบูลินเอ (Immunoglobulin A: IgA)

1.4.2 ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ (Hydrogen peroxide)

1.4.3 สารประกอบไทโอไซยาเนต (Thiocyanate)

3. เซลล์ (Cell) เซลล์ของมนุษย์และเซลล์แบคทีเรีย ซึ่งผลผลิตของแบคทีเรียจะถูกปล่อยปนกับน้ำลาย อันเป็นสาเหตุของอาการปากเหม็น (Halitosis)

4. Opiorphin สารที่ใช้สำหรับบรรเทาอาการปวด

1.2 หน้าที่ของน้ำลาย

1. น้ำลายในช่องปากเป็นระบบการย่อยอาหารส่วนแรกซึ่งน้ำลายเป็นสารหล่อลื่นที่ช่วยในการกลืนอาหารได้อย่างง่ายน้ำลายประกอบด้วยเอนไซม์อะไมเลส (Amylase) ที่สามารถย่อยแป้งให้กลายเป็นน้ำตาลมอลโทส (Maltose) และเดกซ์ทริน (Dextrin) ดังนั้นการย่อยอาหารจึง

เริ่มต้นตั้งแต่ในช่องปากก่อนและลงสู่กระเพาะอาหาร และยังสามารถสร้างเอนไซม์ไลเพส (Lipase) ซึ่งช่วยทำให้ไขมันมีโมเลกุลเล็กลงได้

2. น้ำลายมีสารฆ่าเชื้อมีโปรตีนชนิดหนึ่งที่เรียกว่า Nerve Growth Factor (NGF) ช่วยในการรักษาแผลให้หายเร็วขึ้นเป็นสองเท่า จากการทดลองในหนูทดลองแต่ในน้ำลายของมนุษย์ไม่มีการตรวจพบ NGF แต่มีสารยับยั้งแบคทีเรียอย่างอื่นเช่น อิมมูโนกลอบูลินเอ

2. เอนไซม์

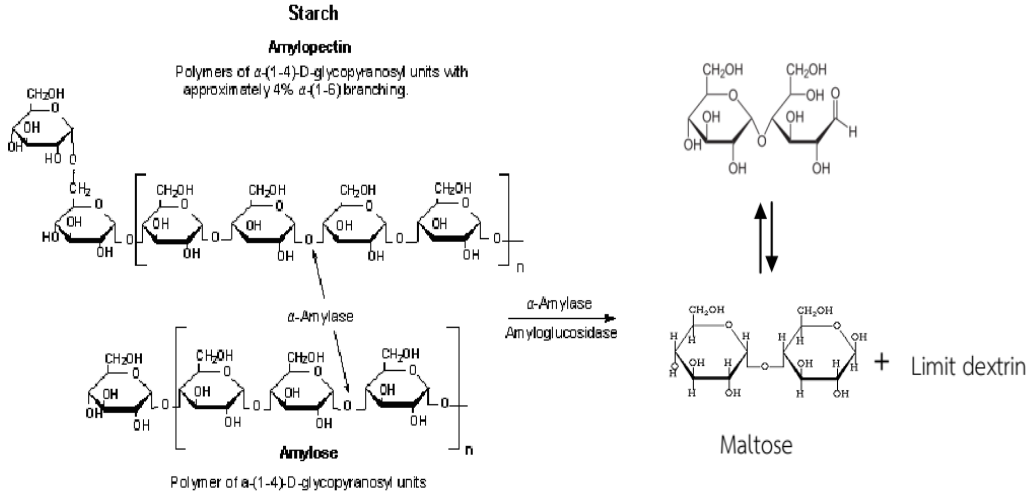
เอนไซม์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาเคมีในสิ่งมีชีวิตการเปลี่ยนแปลงของสารเคมีในสิ่งมีชีวิตในกระบวนการที่เรียกว่าเมตาบอลิซึม จะถูกเร่งโดยเอนไซม์ทั้งสิ้น เอนไซม์ส่วนมากเป็นโปรตีน ดังนั้นสมบัติทางเคมีหลายๆอย่างจึงคล้ายกับโปรตีนเช่นสามารถทำงานได้ดีที่อุณหภูมิหรือค่าความเป็นกรด-เบสที่เหมาะสมเท่านั้น หรือสามารถถูกทำให้เสียสภาพได้

เอนไซม์อะไมเลสถูกค้นพบขึ้นเป็นครั้งแรกในปี ค.ศ.1831 โดย ศูนย์ฟรีดริช พวกเขาได้อธิบายถึงการย่อยสลายแป้งด้วยน้ำลายซึ่งอาศัยเอนไซม์ที่อยู่ในน้ำลายที่มีชื่อว่า “ไทยาลิน” (Ptyalin) หรือเรียกอีกอย่างหนึ่งว่า “อะไมเลส” (Amylase)

อะไมเลส (Amylase) เป็นเอนไซม์ในกลุ่ม Hydrolases และเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (Catalyst) ในการเปลี่ยนแป้งเป็นน้ำตาลโดยไฮโดรไลซ์พันธะ 1,4-glycosidase bond ในโมเลกุลของสตาร์ช (starch) ให้มีขนาดของโมเลกุลเล็กลง ทำให้ได้เป็นเดกซ์ทริน (dextrin) และน้ำตาล (sugar) ไดแซ็กคาไรด์ เช่น มอลโทส (maltose) มอโนแซ็กคาไรด์ เช่น กลูโคส (glucose) อะไมเลสส่วนใหญ่พบในน้ำลาย ตับอ่อน อะไมเลสที่พบในน้ำลายจะเรียกว่า ไทยาลิน (Ptyalin) ซึ่งสามารถพบได้ในคนและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม

2.1 ชนิดของเอนไซม์อะไมเลส สามารถแบ่งได้ 3 ชนิดคือ

2.1.1.แอลฟา-อะไมเลส (alpha-amylase)เป็นเอนไซม์ที่ไฮโดรไลซ์ไกลโคไซด์ในสายพอลิเมอร์ของโมเลกุลสตาร์ช (starch) และไกลโคเจน (glycogen) ที่ตำแหน่งแอลฟา 1-4 แบบสุ่มทำให้โมเลกุลของสตาร์ช และไกลโคเจนถูกไฮโดรไลซ์ได้ น้ำตาล เช่น น้ำตาลมอลโทส (maltose) และกลูโคส (glucose) อย่างรวดเร็ว เอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส พบทั่วไปในระบบการย่อยอาหารของมนุษย์ และสัตว์เช่น ในน้ำลายและน้ำย่อยจากตับแอลฟา-อะไมเลสเป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาย่อยสลายแป้ง (starch) ซึ่งเป็นคาร์โบไฮเดรตโมเลกุลใหญ่ได้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำตาลโมเลกุลคู่คือมอลโทส(maltose) และเด็กซ์ทรินสายสั้น (limit dextrin) ดังแสดงในภาพที่ 2เอนไซม์ชนิดนี้พบมากในน้ำลายซึ่งสามารถสังเกตเห็นได้ว่าเวลาเราเคี้ยวข้าวในปากเป็นเวลานานจะมีรสหวานเกิดขึ้น ซึ่งเป็นผลสืบเนื่องมาจากการทำงานของแอลฟา-อะไมเลสในการย่อยแป้งในข้าวนั่นเอง



ภาพที่ 2 โครงสร้างเคมีของแป้งที่ได้จากการย่อยแป้งด้วยเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส
ที่มา: ศรัณยู คาเมือง และ รักฤดี สารธิมาภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม,**แอลฟา-อะไมเลส,** เมื่อวันที่ 15 กรกฎาคม 2557. เข้าถึงได้จาก บริการวิชาการโรงเรียนปทุมรัตต์พิทยาคม จ.ร้อยเอ็ด

2.1.2.บีตา-อะไมเลส (beta-amylase) เป็นเอนไซม์ที่ไฮโดรไลซ์สตาร์ช (starch) ที่ตำแหน่งแอลฟา1-4 ของพันธะไกลโคไซด์ที่เฉพาะส่วนปลายสายด้านที่เป็นนอนรีดิวส์ (non reducing end) เข้ามาทีละ 2 หน่วย ทำให้ได้น้ำตาลมอลโทส (maltose) เอนไซม์นี้ไม่พบในน้ำย่อยของมนุษย์ แต่พบในรา (mold) แบคทีเรีย (bacteria) เช่น Bacillus cereus และพบในผลไม้ระหว่างการสุก

2.1.3.แกมมา-อะไมเลส (gamma-amylase)กลูโคอะไมเลสชื่อตามระบบ γ-1,4-glucan glucohydrolaseเป็นเอนไซม์ที่ไฮโดรไลซ์สายพอลิเมอร์ของสตาร์ช (starch) ได้ทั้งที่พันธะไกลโคไซด์ที่ตำแหน่งแอลฟา 1-4 และแอลฟา 1-6 จึงสามารถไฮโดรไลซ์โมเลกุลของอะไมโลเพกทิน (amylopectin) ซึ่งโมเลกุลมีสายแขนง โดยจะไฮโดรไลซ์จากส่วนปลายด้านนอนรีดิวส์ (non reducing end) เข้ามาทีละ 1หน่วยได้น้ำตาลกลูโคส (glucose) ผลิตได้โดยราและแบคทีเรีย

3. การทดสอบเบเนดิกต์

คาร์โบไฮเดรต (Carbohydrate) คือ สารอินทรีย์ที่ประกอบด้วยธาตุ C H และ O อัตราส่วนโดยอะตอมของ H:O = 2:1 เช่น $C_3H_6O_3$ $C_6H_{12}O_6$ $(C_6H_{10}O_5)_n$ โดยมีหมู่คาร์บอกซาลดีไฮด์ (-CHO) และหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) หรือหมู่คาร์บอนิล (-CO) และหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) เป็นหมู่ฟังก์ชันประเภทของคาร์โบไฮเดรต

คาร์โบไฮเดรตสามารถแบ่งตามโครงสร้างออกเป็น 3 ประเภท คือ

1. มอนอแซ็กคาไรด์ (Monosaccharides) หรือน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว มีสูตรทั่วไปเป็น $C_nH_{2n}O_n$จะมี2 ประเภทคือ

1.1 น้ำตาลอัลโดส (aldoses) เป็นน้ำตาลที่มีหมู่คาร์บอกซาลดีไฮด์เช่น กลูโคส กาแลกโตส และไรโบส เป็นต้น

1.2 น้ำตาลคีโตส (ketoses) เป็นน้ำตาลที่มีหมู่คาร์บอนิล ได้แก่ ฟรุกโตส เป็นต้น

2. ไดแซ็กคาไรด์ (Disaccharides) หรือน้ำตาลโมเลกุลคู่ ได้แก่ แลคโตสมอลโตส และซูโครส ซึ่งเกิดจาก การรวมตัวของมอนอแซ็กคาไรด์2 โมเลกุล โดยกำจัดน้ำออกไป 1 โมเลกุล เช่น ซูโครส ($C_{12}H_{22}O_{11}$)เกิดจากกลูโคสรวมตัวกับฟรุกโตส

3. พอลีแซ็กคาไรด์ (Polysaccharides) เช่น แป้ง เซลลูโลส ไกลโคเจน เกิดจากมอนอแซ็กคาไรด์หลายๆ โมเลกุลจำนวนมากมายต่อรวมกันเป็นพอลิเมอร์ ดังสมการ

$$nC_6H_{12} \text{----------->} (C_6H_{10}O_5)n + nH_2O$$

การทดสอบคาร์โบไฮเดรต

1. มอนอแซ็กคาไรด์และไดแซ็กคาไรด์ ซึ่งเป็น สารอินทรีย์ที่มีหมู่คาร์บอกซาลดีไฮด์ (-CHO) เมื่อต้มกับ สารละลายเบเนดิกซ์ (Cu^{2+} / OH -)

$$R\text{-}\overset{\overset{O}{\|}}{C}\text{-}H + 2Cu^{2+} + 5OH^- \xrightarrow{\Delta} R\text{-}\overset{\overset{O}{\|}}{C}\text{–}O^- + Cu_2O + 3H_2O$$

เมื่อทดสอบน้ำตาลพวกมอนอแซกคาไรด์กับไดแซกคาไรด์ ยกเว้นซูโครสรวมกับสารละลายเบเนดิกต์เมื่อนำไปต้มเกิดปฏิกิริยาของเกลือของกรดอินทรีย์เป็นตะกอนสีแดงอิฐของคอปปอร์ออกไซด์และน้ำ

2. พอลีแซ็กคาไรด์

2.1. แป้งเติมสารละลายไอโอดีนจะได้ตะกอนสีน้ำเงินแต่ไม่ให้ตะกอนสีแดงกับสารละลายเบเนดิกต์

แป้ง + I_2 ⟶ สารเชิงซ้อนสีน้ำเงินที่เป็นตะกอน

2.2.น้ำตาลโมเลกุลใหญ่ เช่น แป้ง และสำลี (เซลลูโลส) เมื่อนำมาเติมสารละลายเบเนดิกต์ จะไม่เห็นการเปลี่ยนแปลง แต่ถ้าเติมกรดแล้วนำมาต้มจะเกิดปฏิกริยาไฮโดรลิซิส ซึ่งสามารถเกิดตะกอนสีแดงอิฐกับสารละลายเบเนดิกต์ได้

4. เทคนิควิสิเบิลสเปกโตรโฟโตเมตรี (Visible Spectrophotometry)

สเปกโทรโฟโตเมตรีเป็นเทคนิคที่ใช้วิเคราะห์สารโดยอาศัยสมบัติการดูดแสงของสาร เทคนิคนี้จัดเป็นเทคนิคพื้นฐานที่สำคัญที่มีการใช้ในงานทางชีวเคมี เนื่องจากให้ความรวดเร็วในการวิเคราะห์ มีความแม่นยำสูง ปริมาณสารที่ใช้ในการวิเคราะห์น้อยถึงในระดับไมโครกรัมแม้ว่าสารที่ต้องการวิเคราห์นั้นจะอยู่ในสารละลายผสมก็ตาม

แสงสีและการดูดกลืนแสงของสาร (ชัยวัฒน์วามวรรัตน์, 2557)

ช่วงคลื่นอัลตราไวโอเลต (ช่วงเลขคลื่น 180 - 350 นาโนเมตร) และช่วงคลื่นที่ตามองเห็น (ช่วงเลขคลื่น350 – 780 นาโนเมตร) เป็นช่วงคลื่นแสงที่มีประโยชน์สำหรับงานทางชีวเคมี แสงในช่วงคลื่นทั้งสองนี้มีระดับพลังงานที่เพียงพอต่อการกระตุ้นให้อิเล็กตรอนที่อยู่วงนอกสุดของโมเลกุลสารในสภาวะพื้น (ground state) เปลี่ยนไปอยู่ในสภาวะเร้า (excited state) ซึ่งอิเล็กตรอนที่ถูกกระตุ้นมักเป็นอิเล็กตรอนของพันธะคู่ (double bond) และพันธะสาม (triple bond) สมบัติการดูดแสงของสารถูกกำหนดจากลักษณะโครงสร้างทางเคมีของโมเลกุลสารนั้นๆ โครงสร้างโมเลกุลที่มีพันธะคู่สลับกับพันธะเดี่ยว (conjugated double bond) ไม่มากนัก ทั้งที่เป็นสารประกอบแอโรแมติกและเฮเทอโรไซคลิก เช่น กรดอะมิโนไทโรซีนเฟนิลอะลานีนและทริปโตเฟนไนโตรจีนัสเบสพิวรีนและไพริมิดีน เป็นต้น สารพวกนี้มักดูดกลืนแสงอัตราไวโอเลตได้ดี โครงสร้างโมเลกุลมีพันธะคู่สลับเดี่ยวกันมากขึ้น เช่น เบต้า-คาโรทีน (β - carotene) หรือโมเลกุลที่มีไอออนของธาตุแทรนซิชันรวมอยู่ด้วย

กฎของเบียร์และแลมเบิร์ต

เมื่อให้ลำแสงความยาวคลื่นเดี่ยว (monochromatic light) ส่องผ่านเข้าไปในสารละลายโมเลกุลของสารที่มีสมบัติดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นหนึ่งละลายอยู่ บางส่วนของแสงจะถูกดูดกลืนไว้และแสงส่วนที่เหลือจะผ่านออกมา ดังนั้นความเข้มของแสงที่ผ่านออกจากสารละลายมีความเข้มที่น้อยลงกว่าเดิม การดูดกลืนแสงที่เกิดขึ้นเป็นไปตามกฎ 2 ข้อ คือกฎของเบียร์และกฎของแลมเบิร์ตกฎของเบียร์กล่าวว่าปริมาณแสงที่ถูกดูดกลืนเป็นปฏิภาคโดยตรงกับความเข้มข้นของสารที่มีสมบัติดูดกลืนแสงส่วนกฎของแลมเบิร์ตกล่าวถึงปริมาณแสงที่ถูกดูดกลืนนั้นเป็นปฏิภาคโดยตรงกับระยะทางที่แสงส่องผ่านเมื่อรวมกฎทั้ง 2 ข้อเข้าด้วยกัน เรียกว่ากฎของเบียร์และแลมเบิร์ต (Beer-Lambert's law) โดยทั่วไปมักเรียกกันสั้นๆ ว่ากฎของเบียร์ (Beer's law) ซึ่งสามารถเขียนเป็นสมการได้

$$A = abc \quad \text{หรือ} \quad A = \frac{\log I_0}{I}$$

โดยที่ A คือ ค่าการดูดแสง (absorbance) หรืออาจเรียกในชื่อเดิมซึ่งปัจจุบันไม่เป็นที่นิยมแล้วว่า Optical density (O.D.) ค่านี้ไม่มีหน่วย

a คือ ค่าสัมประสิทธิ์การดูดแสง (extinction coefficient)

b คือ ระยะทางที่แสงส่องผ่านเป็นเซนติเมตร (path length) โดยทั่วไปเป็น 1 เซนติเมตร

c คือ ความเข้มข้นของสารที่มีสมบัติดูดกลืนแสง

I_0 คือ ความเข้มของแสงก่อนส่องผ่านสารละลาย

I คือ ความเข้มของแสงที่ผ่านออกจากสารละลาย

เมื่อความเข้มข้นมีหน่วยเป็นโมลาร์และระยะทางที่แสงส่องผ่านเป็น 1 เซนติเมตร ค่าสัมประสิทธิ์การดูดแสงเรียกว่า molar extinction coefficient ซึ่งมักใช้สัญลักษณ์เป็น ε แทน a และมีหน่วยเป็น $M^{-1}\ cm^{-1}$ ในกรณีไม่ทราบน้ำหนักโมเลกุลของสารที่มีสมบัติดูดกลืนแสงได้ อาจกำหนด a เป็น $E^{1\%}_{1\ cm}$ ซึ่งก็คือค่าการดูดแสงของสารละลายที่มีความเข้มข้นของสารดูดกลืนแสงเป็น 1 กรัมเปอร์เซ็นต์และความยาวของระยะทางที่แสงส่องผ่านเป็น 1 เซนติเมตรค่าสัมประสิทธิ์การดูดแสงเป็นค่าคงที่เฉพาะของสารแต่ละชนิดและมีค่าเปลี่ยนแปลงไปเมื่อความยาวคลื่นหรือสภาวะอื่นๆ เช่น อุณหภูมิ ตัวทำละลายหรือพีเอชของสารละลายเปลี่ยนแปลงไปการหาค่าสัมประสิทธิ์การดูดแสงของสารสามารถทำได้โดยวัดค่าการดูดแสงของสารละลายที่มีความเข้มข้นของสารเป็น 1 หน่วยความเข้มข้นและระยะทางที่แสงส่องผ่านสารละลายเป็น 1 เซนติเมตร

ในทางปฏิบัติจะวัดปริมาณแสงที่ถูกดูดกลืนโดยสารที่ต้องการวิเคราะห์เปรียบเทียบกับ

ปริมาณแสงที่ถูกดูดกลืนโดยสารละลายเปล่า (blank solution) ซึ่งเป็นสารละลายที่มีสารทุกชนิดละลายอยู่เหมือนในสารละลายที่ต้องการวิเคราะห์ยกเว้นสารที่ต้องการวิเคราะห์ปริมาณแสงที่ผ่านออกจากสารละลายเปล่าจะเทียบค่าให้เท่ากับI_0ปริมาณแสงที่วัดได้จากสารละลายที่ต้องการวิเคราะห์ให้เท่ากับIความส่องผ่าน (transmittance) ของสารที่ต้องการวิเคราะห์จะแสดงในรูปของอัตราส่วนดังสมการ

$$\text{Transmittance} \quad \text{หรือ} \quad T = \frac{I}{I_0}$$

อัตราส่วนนี้โดยทั่วไปมักเปลี่ยนเป็นค่าเปอร์เซ็นต์ เรียกว่าเปอร์เซ็นต์แสงส่องผ่าน (%Transmittance)

$$\% \text{ Transmittance} = \frac{I}{I_0} \text{ x } 100\ \%$$

เมื่อความเข้มข้นของสารที่ดูดกลืนแสงสูงขึ้น แสงถูกดูดกลืนมากขึ้นและมีปริมาณแสงที่ผ่านออกมาได้น้อยลง*(% T*น้อยลง) การลดลงของเปอร์เซ็นต์แสงส่องผ่านจึงเป็นปฏิภาคผกผันเชิงล็อคกับความเข้มข้น โดยทั่วไปเรามักนิยมแสดงเป็นค่าการดูดแสง (A) ซึ่งเป็นปฏิภาคโดยตรงกับความเข้มข้น ดังนั้นความสัมพันธ์ระหว่าง A และ*%T*แสดงด้วยสมการซึ่งมีวิธีพิสูจน์

$$A = -\log \frac{I}{I_0} = -\log T = \log \frac{1}{T}$$

แปลง T ให้เป็น $\%T$ จะได้ $A = \log \frac{1}{T} \text{ x } \frac{100}{100} = \log \frac{100}{\%T}$

$$A = \log 100 - \log \%\, T$$

$$\boxed{A = 2 - \log \%\, T}$$

ส่วนประกอบหลักของเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์

1. แหล่งกำเนิดแสง (light source) การวัดการดูดแสงในช่วงคลื่นที่ตามองเห็นจะใช้ความยาวคลื่นที่ต้องการอย่างต่อเนื่องโดยจะใช้ดวงไฟทังสเตน (tungsten lamp) ซึ่งให้แสงในช่วงความยาวคลื่น340-800 นาโนเมตร ส่วนการวัดการดูดแสงในช่วงคลื่นอัลตราไวโอเลตจะใช้ดวงไฟไฮโดรเจน (hydrogen lamp) หรือดวงไฟดิวเทอเรียม (deuterium lamp) ซึ่งให้แสงในช่วงความยาวคลื่น 200 – 340 นาโนเมตร

2. ตัวทำแสงความความยาวคลื่นเดี่ยว (monochromator) ทำหน้าที่คัดกรองแสงที่ออกจากแหล่งกำเนิดแสงให้ได้แถบแสงความยาวคลื่นเดี่ยว (monochromatic light) ตามต้องการโดยการใช้ปริซึม (prism)

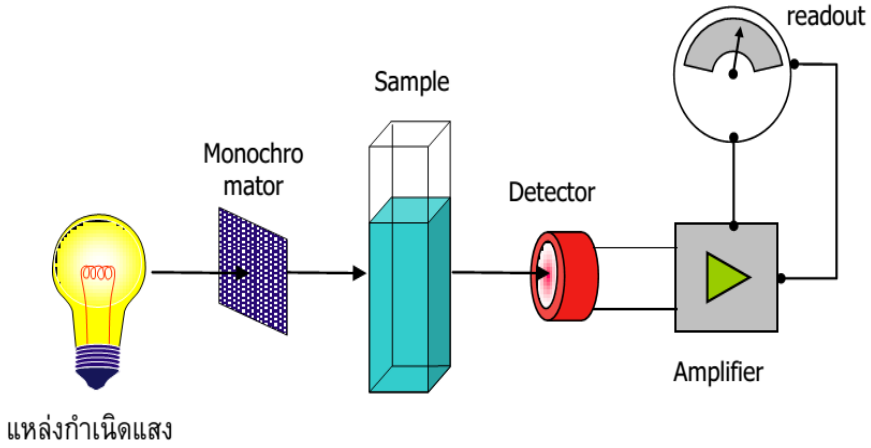
3. หลอดบรรจุสารตัวอย่าง (cuvette) ผลิตจากแก้วควอทซ์ (Quartz) หรือพลาสติก เช่น พอลิเมทราคลิเลต (polymethacrylate) และพอลิสไตรีน (polystyrene) รูปทรงที่ใช้เป็นแบบหลอดสี่เหลี่ยมจัตุรัสและแบบหลอดทดลอง การวิเคราะห์ในช่วงคลื่นที่ตามองเห็นใช้หลอดที่ทำจากวัสดุชนิดใดก็ได้แต่การวิเคราะห์ในช่วงคลื่นอัลตราไวโอเลตต้องจะใช้หลอดที่ทำจากควอทซ์เท่านั้น

4. ช่องเล็กยาว (Slit) ที่ทำหน้าที่ปรับความเข้มของแสงก่อนส่งผ่านไปยังสารละลายให้มีความเข้มที่เหมาะสมกับความไวของหลอดรับแสง

5. อุปกรณ์ตรวจวัดแสง (detector) เมื่อแสงผ่านสารตัวอย่างออกมาหลอดรับแสง (photomultiplier tube) ทำหน้าที่วัดความเข้มของแสงที่ผ่านออกมาจากสารละลายโดยเปลี่ยนพลังงานแสงเป็นพลังงานไฟฟ้าแล้วส่งสัญญาณไฟฟ้านั้นต่อไปยังเครื่องบันทึกข้อมูล

6. เครื่องบันทึกข้อมูล (meter หรือ recorder) เป็นหน่วยแสดงค่าที่วัดได้ เครื่องมือบางแบบ เช่น Spectronic 21 เปลี่ยนพลังงานไฟฟ้าที่ผ่านเข้าสู่แกลแวนอมิเตอร์ให้เป็นพลังงานกลดันให้เข็มบนหน้าปัดของเครื่องเคลื่อนไปบนสเกลแบบอื่นๆ อาจต่อกับเครื่องพิมพ์คอมพิวเตอร์พิมพ์ผลการวัดและผลวิเคราะห์ต่างๆ ออกมาได้ตามคำสั่ง

โดยทั่วไปเครื่องมือที่ใช้วัดการดูดแสงคลื่นแสงในช่วงวิสิเบิลมักจะรวมคลื่นแสงในช่วงอุลตราไวโอเลตไว้ด้วย ซึ่งนิยมเรียกว่า UV-VIS Spectrophotometer ซึ่งประกอบด้วยส่วนต่างๆ ดังแสดงในภาพที่ 3



ภาพที่ 3 ส่วนประกอบของเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์

ที่มา : เครื่องวัดการดูดกลืนแสง, **ส่วนประกอบของเครื่อง Spectrophotometer**, สืบค้นเมื่อวันที่ 3 มีนาคม 2558. เข้าถึงได้จาก http://www.aquatoyou.com/index.php/2013-05-16-04-06-08/874-uv-vis-spectrophotometer

5. เทคนิคอินฟราเรด สเปกโทรสโคปี (Infrared Spectroscopy)

อินฟราเรด สเปคโทรสโคปี (Infrared spectroscopy) เป็นเทคนิคที่นิยมในการตรวจหาหมู่ฟังค์ชันในโมเลกุลของสารประกอบอินทรีย์ซึ่งเป็นเทคนิคที่เกี่ยวข้องกับแสงหรือคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าที่มีลักษณะเป็นแถบพลังงาน

สำหรับคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าในช่วงอินฟราเรด จะมีเลขคลื่นในช่วง 4000 – 660cm^{-1} หรือมีความยาวคลื่นในช่วง 15.4 – 2.5 μm ซึ่งเมื่อแสงอินฟราเรดตกกระทบโมเลกุลสารจะเกิดแรงกระทำระหว่างโมเลกุลสารกับแสงแสงอินฟราเรดในบางช่วงซึ่งมีความถี่ตรงกันกับความถี่ของการสั่นของพันธะในโมเลกุลของสาร จะถูกดูดกลืนไป เรียกว่า การเกิดเรโซแนนซ์ (resonance) ทำให้ความเข้มของแสงอินฟราเรดที่ทะลุผ่านสารตัวอย่าง (transmitted Infrared) จึงมีความเข้มแสงลดลงในบางช่วงของความถี่ทั้งหมดของอินฟราเรด เมื่อพิจารณากราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มของแสงอินฟราเรดที่ทะลุผ่านสารตัวอย่างกับความถี่หรือเลขคลื่น จะมีค่าเท่ากับส่วนกลับของความถี่แสง

การดูดกลืนรังสีอินฟราเรดตรงกับพลังงานในช่วง 2-10 กิโลแคลอรี่ต่อโมลพลังงานของรังสีแม่เหล็กไฟฟ้าในย่านนี้ก่อให้เกิดการสั่นแบบยืด (stretching) และแบบงอ (bending) ของพันธะในโมเลกุลของสารการดูดกลืนรังสีอินฟราเรดเป็นขบวนการควันไทส์ (quantized) กล่าวคือการที่สารจะดูดกลืนรังสีอินฟราเรดนั้นความถี่ของรังสีที่ถูกดูดกลืนจะต้องตรงกับความถี่ของการสั่นของ

พันธะเท่านั้นซึ่งมีตัวอย่างการดูดกลืนรังสีอินฟราเรดของหมู่ฟังก์ชั่นต่างๆ ที่แสดงรายละเอียดต่างๆ ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1ตัวอย่างการดูดกลืนรังสีอินฟราเรดของหมู่ฟังชันต่างๆ ในช่วงเลขคลื่น 4,000–660 cm^{-1}

cm^{-1}	**หมู่ฟังค์ชัน**	**รายละเอียด**
3600-3400	O–H stetching	3650-3590 cm^{-1} (sh, w) แอลกอฮอลอิสระ 3400-3200 cm^{-1} (b) แอลกอฮอลที่เกิดพันธะไฮโดรเจน 3400-2400 cm^{-1} (vs, vb) กรดคาร์บอกซิลิก
2850-2780	C–H stretching	แอลดีไฮด์
2260-2100	C=C stretching	อัลไคน์ (w) โมเลกุลที่สมมาตรจะไม่มีแถบนี้ปรากฏ
1820-1760 (s)	C=O stretching	แอนไฮไดรด์ (s) มี 2 แถบ
1710 (s)	C=O stretching	กรดคาร์บอกซิลิก
1690-1650 (s)	C=O stretching	เอไมด์
1520 (s) และ 1350 (s)	NO2 bending	สารประกอบไนโตร
1400-1000	C–F stretching	สารประกอบฟลูออไรด์
1300-1150	CH_2–X	สารประกอบเฮโลเจน
1220	C–O stretching	ฟีนอล
1050	C–O stretching	1^{O}แอลกอฮอล
970	C–H (OOP bending)	อัลคีน (หมู่แทนที่ 2 หมู่ , trans)
890	C–H (OOP bending)	อัลคีน (หมู่แทนที่ 2 หมู่ , $R_2C=CH_2$)
750 และ 690	C–H (OOP bending)	เบนซีน (หมู่แทนที่ 1 หมู่)
600-500	C-Br	สารประกอบโบรไมด์
~ 500	C–I	สารประกอบไอโอไดด์

ที่มา : ความถี่ของการดูดกลืนรังสีอินฟาเรดของหมู่ฟังก์ชันที่สามัญบางชนิด
ความถี่ย่านรังสี IR ที่เป็นลักษณะพิเศษของหมู่ฟังก์ชันบางหมู่, อ้างถึงใน วิชัย ริ้วตระกูล, **การประยุกต์สเปคโทรสโคปีในเคมีอินทรีย์.** (กรุงเทพมหานคร: โรงพิมพ์นำอักษรการพิมพ์.)

เครื่องมือที่ใช้บันทึก IR สเปคตรัม

เครื่องมือที่ใช้บันทึก IR สเปคตรัมคือ Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) และ Attenuated total reflectance – Fourier transform infrared (ATR-FTIR)

1. Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR)

เทคนิค FTIR เป็นเทคนิคสำหรับการวิเคราะห์เพื่อการจำแนกประเภทสารอินทรีย์ สารอนินทรีย์และพันธะเคมีในโมเลกุล และสามารถบอกถึงปริมาณองค์ประกอบที่มีอยู่ในโมเลกุลของสารตัวอย่างได้อีกด้วยโดยใช้การตรวจวัดการดูดกลืนรังสีอินฟราเรดของตัวอย่างที่ความถี่ต่างๆ ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของแต่ละพันธะการดูดกลืนรังสีอินฟราเรดที่อุณหภูมิสูงกว่าอุณหภูมิศูนย์องศาสมบูรณ์ อะตอมในโมเลกุลจะมีการสั่นอยู่ตลอดเวลา เมื่อความถี่ของการสั่นเท่ากับความถี่ของรังสีอินฟราเรดที่ฉายมายังโมเลกุล โมเลกุลก็จะดูดกลืนรังสี จำนวนแถบการดูดกลืนทั้งหมดที่สังเกตได้จะมีค่าไม่เท่ากับการสั่นมูลฐานของโมเลกุลทั้งหมด โดยจะมีค่าลดลงเพราะจะมีบางแถบพลังงานที่ไม่มีการตอบสนองต่อพลังงานในช่วงรังสีอินฟราเรด เครื่องวิเคราะห์ด้วยอินฟราเรดในระบบ FTIR มีส่วนประกอบหลัก คือ แหล่งกำเนิดรังสี Interferometer และเครื่องตรวจวัดที่นิยมใช้มากที่สุดสำหรับ FTIR คือ Deuterated Triglycine Sulfate (DTGS) และ Mercury Cadmium Telluride (MCT) หลักการทำงานของ FTIR รังสีอินฟราเรดจากแหล่งกำเนิดจะถูกฉายไปยัง Interferometer ซึ่งตัวที่นิยมใช้ คือ Michelson Interferometer ประกอบด้วยกระจกที่สามารถเคลื่อนที่ได้ และมีกระจกที่ติดอยู่กับที่ โดยกระจกทั้งสองจะตั้งฉากกันและมีตัวแยกแสงซึ่งเป็นอุปกรณ์กึ่งสะท้อนแสง โดยส่วนมากทำมาจากการนำฟิล์มบางของเจอร์มาเนียมวางลงบน KBr ที่เป็นตัวแยกแสง รังสีครึ่งหนึ่งจะทะลุผ่านไปที่กระจกที่ติดอยู่กับที่และรังสีอีกครึ่งหนึ่งจะสะท้อนไปที่กระจกที่สามารถเคลื่อนที่ได้ หลังจากนั้นรังสีก็จะสะท้อนจากกระจกกลับมารวมกันที่ตัวแยกแสงเกิดการแทรกสอดขึ้นหลังจากนั้นรังสีก็จะผ่านไปยังตัวอย่างและในที่สุดก็จะตกลงบนเครื่องตรวจวัด อย่างไรก็ตามเทคนิค FTIR นี้มีความไวและใช้ระยะเวลาในการตรวจสอบน้อยกว่าเทคนิค IR ชนิดอื่น

2. Attenuated total reflectance – Fourier transform infrared (ATR-FTIR)

เทคนิค ATR-FTIR เป็นเทคนิคสำหรับการวิเคราะห์พื้นผิวของวัตถุ และเทคนิคนี้เหมาะสมกับตัวอย่างที่มีลักษณะทึบแสงหรือมีความหนามาก โดยแสงอินฟราเรดจะตกกระทบสารตัวอย่างโดยแสงจะเดินทางจากตัวกลางที่มีค่าดัชนีหักเหสูงกว่า (ATR-FTIR prism) มาตกกระทบที่บริเวณรอยต่อระหว่าง ATR-FTIR prism กับตัวอย่างที่มีค่าดัชนีหักเหแสงต่ำกว่าด้วยมุมตกกระทบที่มากกว่ามุมวิกฤต แต่จะเกิดการสะท้อนกลับที่บริเวณผิวหน้าของตัวอย่างซึ่งทำให้เกิดสนามไฟฟ้า

ขึ้นที่บริเวณดังกล่าว ในการวิจัยครั้งนี้จะใช้ dimond cell ซึ่งมีความดันสูงที่สามารถนำไปใช้กับตัวอย่างที่ต้องการในทุกรูปแบบและใช้ตัวอย่างที่มีขนาดและปริมาณที่น้อยมาก อย่างไรก็ตาม เทคนิค ATR-FTIRเป็นเทคนิคที่ต้องอาศัยการสัมผัสกันระหว่าง ATR-FTIR prism กับตัวอย่างและคุณภาพของการสัมผัสพื้นผิวโดยตรง ซึ่งเทคนิคนี้สามารถประยุกต์ใช้กับตัวอย่างทั้งที่เป็นของเหลวและของแข็งสำหรับตัวอย่างที่สามารถสัมผัสกับ prism ได้ดีเช่น ของเหลว หรือของแข็งที่ผิวหน้าเรียบนุ่มและยืดหยุ่นได้นั้นสามารถทำการตรวจวิเคราะห์ได้ผลเป็นอย่างดี

6.บทความและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Hajime Tsutsumiet al. (1991) การตรวจที่เฉพาะเจาะจง (เอนไซม์/โปรตีนเข้มข้น) ของอะไมเลสที่ถูกกำหนด มีความจำเพาะเจาะจงกับอะไมเลสคราบน้ำลายมีการลดลงของอะไมเลสอย่างรวดเร็วในช่วงชั่วโมงแรก แต่ในวันที่ 1-28 วัน มีการลดลงน้อยมากเมื่อคราบถูกเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง คราบของวัตถุชีวภาพต่างๆของมนุษย์ที่ได้จากเต้านม น้ำมูกและสารคัดหลั่งจากช่องคลอด อะไมเลสมีฤทธิ์ค่อนข้างสูง แต่คราบน้ำลายมีความจำเพาะเจาะจงของอะไมเลสสูงกว่า 2 ยูนิต/มิลลิกรัม เมื่อคราบน้ำลายที่ถูกปนเปื้อนด้วยเลือดหรือสารคัดหลั่งในช่องคลอดที่อัตราส่วนต่างๆ ความจำเพาะเจาะจงของอะไมเลสจะลดลงตามการเพิ่มขึ้นของอัตราส่วนของสารปนเปื้อน โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อการปนเปื้อนเลือด อย่างไรก็ตามความจำเพาะเจาะจงของอะไมเลสก็ยังคงสูงกว่า 2 ยูนิต/มิลลิกรัม

Johannes Hedman et al. (2010) ในอดีตการทดสอบอะไมเลสถูกนำมาใช้เป็นการตรวจสอบการหาน้ำลายที่ได้จากสถานที่เกิดเหตุ ที่ผ่านมาส่วนใหญ่เพื่อการหาคราบน้ำลายที่ได้จากใบหน้า เราได้พัฒนาโปรแกรมการตรวจคัดกรองน้ำลายกับร่องรอยที่เกิดเหตุ โดยการ swabs ใช้กระดาษ อะไมเลส (Phadebas ทดสอบทางนิติเวช). ผลบวกที่ได้รับสำหรับทุกการทดสอบคราบน้ำลายแห้ง (0.5-32 มิลลิลิตร) ด้วยการทดสอบอะไมเลสระดับสูงหรือกลาง ผลที่ได้โดยทั่วไปภายใน 5 นาทีและกลุ่มตัวอย่างทั้งหมดที่ผลิตโปรไฟล์ดีเอ็นเอเป็นบวก แต่อะไมเลสมีการสลายเช่นเดียวกับที่ความเข้มข้นของดีเอ็นเอแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ในแต่ละบุคคลแสดงให้เห็นว่ามีความสัมพันธ์ระหว่างการทดสอบอะไมเลสและปริมาณของดีเอ็นเอในน้ำลายสด ดังนั้นแม้ผลการทดสอบ อะไมเลสเป็นบวกแสดงว่ามีน้ำลายและสามารถแสดงตัวตนของดีเอ็นเออะไมเลสได้อีกด้วย

Charlotte-Maria Orphanou. (2015) ของเหลวในร่างกายมนุษย์ที่สามารถพบได้ในการก่อเหตุอาชญากรรม คือ เลือด น้ำลาย น้ำอสุจิและสารคัดหลั่งในช่องคลอด ปัจจุบันมีการนำมาเพื่อบงชี้การเกิดขึ้นของของเหลวในร่างกายโดยการทดสอบความไว การวิเคราะห์ mRNA และโปรตีนใน

งานวิจัยนี้มีการประยุกต์ใช้เทคนิค ATR-FTIR เป็นการทำงานของสเปกโทรสโคปีสำหรับการตรวจสอบเลือด น้ำลาย น้ำอสุจิและสารคัดหลั่งในช่องคลอด ผลที่ได้แสดงว่า การทดสอบโดยเทคนิค ATR-FTIR สามารถตรวจสอบและแยกความแตกต่างระหว่างของเหลวในร่างกายโดยปรากฏสเปกตรัมที่เป็นพีคของโปรตีนในโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับของเหลวในร่างกาย การวิจัยเบื้องต้นในการทดสอบโดยเทคนิค ATR-FTIR เพื่อนำไปใช้ตรวจคัดกรองหลักฐานทางชีวภาพและมีการตรวจได้อย่างรวดเร็วและมีประสิทธิภาพในทางนิติวิทยาศาสตร์

ดังนั้นผู้วิจัยที่จะทำการศึกษาเกี่ยวกับการตรวจสอบเบื้องต้นของคราบน้ำลายที่พบในสถานที่เกิดเหตุว่าเป็นน้ำลายจริง เพื่อที่ใช้ในการตรวจพิสูจน์หาดีเอ็นเอต่อไป ในการตรวจหาดีเอ็นเอเป็นการตรวจที่มีราคาค่อนข้างแพงหากตัวอย่างที่ได้จากสถานที่เกิดเหตุนั้นไม่ได้เป็นชีววัตถุที่สามารถตรวจหาดีเอ็นเอได้นั่นจะทำให้เสียเวลาและเสียค่าใช้จ่ายไป ผู้วิจัยจึงทำการทดสอบเบื้องต้นของน้ำลายมี 2 ขั้นตอน คือ ขั้นตอนแรกทดสอบโดยการใช้ปฏิกิริยาทางเคมีที่ใช้วิธีการสังเกตการเกิดตะกอนสีแดงอิฐของ Cu_2O ของสารละลายเบเนดิกต์ คือการทดสอบหาน้ำตาลโดยใช้น้ำลายนำมาย่อยน้ำแป้งและใช้วิธีเบเนดิกต์ในการทดสอบ ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้เครื่องมือพื้นฐานในห้องปฏิบัติการทางเคมีในการทดสอบและเป็นวิธีที่ง่ายร่วมกับการทดสอบโดยเทคนิค Visible Spectrophotometry ที่ทดสอบส่วนที่เหลือของสารละลายเบเนดิกต์จากปฏิกิริยา และทดสอบโดยเทคนิค ATR-FTIR ซึ่งเป็นการทดสอบคราบน้ำลายที่พบจากสถานที่เกิดเหตุ ซึ่งเทคนิคนี้เป็นวิธีที่ใช้สารตัวอย่างในปริมาณน้อย ง่าย สะดวก และมีความรวดเร็วในการวิเคราะห์ต่อไป

มหาวิทยาลัยศิลปากร

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

1. อุปกรณ์ สารเคมี และเครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

1.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

ตารางที่ 2 อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

อุปกรณ์	แหล่งที่มา
บีกเกอร์ ปริมาตร 20, 50, 80และ100 mL	BOMEX
กระบอกตวง 10, 25และ 250mL	BOMEX
ปิเปตต์แบบปริมาตร ปริมาตร 1 และ10 mL	KIMAX
หลอดทดลอง	KIMAX
ที่วางหลอดทดลอง	KIMAX
หลอดหยด	KIMAX
เทอร์โมมิเตอร์	GLASSCO
แผ่นกระจกสไลด์	SAIL BRAND
Hot plate	IKA – C – MAG HS7

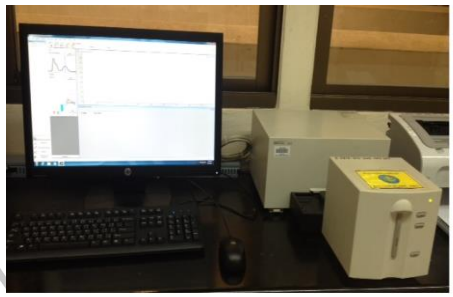
1.2 สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

ตารางที่ 3 สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

สารเคมี	แหล่งที่มา
สารละลายเบเนดิกต์ การเตรียมสารละลายเบเนดิกต์ *1.* tri – sodium citrate 173 g + Anh. Sodium carbonate 100 g ละลายในน้ำ 800 ml. *2.* cupric sulfate 17.3 g ที่ละลายแล้วในน้ำ 100 ml. *(1 + 2)* แล้วทำให้เป็น 1 ลิตร ถ้าเตรียมมากน้อยก็เพิ่มลดตามอัตราส่วน	ห้องปฏิบัติการเคมี มหาวิทยาลัยศิลปากร
สารละลายน้ำแป้ง 0.5 % (Starch) การเตรียมน้ำแป้ง 1. ผง starch 2. น้ำกลั่น	ห้องปฏิบัติการเคมี มหาวิทยาลัยศิลปากร

1.3 เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

ตารางที่ 4 เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

เครื่องมือ	
เครื่อง Hewlett Packard HP 8453 Diode Array UV-Visible Spectrophotometer	
เครื่อง Attenuated total reflectance – Fourier transform infrared (ATR-FTIR) ยี่ห้อ PerkinElmer รุ่น Spectrum 10	

2. ตัวอย่างน้ำลายที่ใช้ในการวิจัย

ตัวอย่างน้ำลายจากอาสาสมัคร เพศหญิง อายุ 28 ปี น้ำหนัก 60 กิโลกรัม ส่วนสูง 157 เซนติเมตร

3. วิธีการทดลอง

ในการตรวจวิเคราะห์คราบน้ำลาย ซึ่งเป็นการวิจัยเชิงทดลอง มีวัตถุประสงค์เพื่อยืนยันคราบน้ำลายที่พบในสถานที่เกิดเหตุว่าเป็นคราบน้ำลายจริงหรือไม่ ส่วนการทดสอบน้ำลายที่ใช้ในการย่อยน้ำแป้งและใช้วิธีเบเนดิกต์ในการทดสอบร่วมกับเทคนิค Visible spectrophotometry และเทคนิค ATR-FTIR มีขั้นตอนการทดลองดังนี้

3.1 การเตรียมตัวอย่างน้ำลายทดสอบโดยวิธีเบเนดิกต์

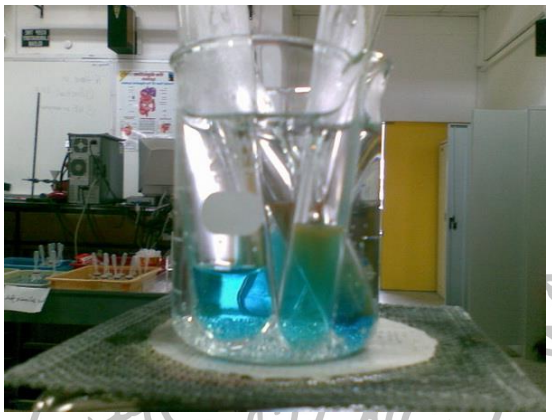
3.1.1 นำตัวอย่างน้ำลายมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:10, 1:20, 1:30, 1:40, 1:50, 1:60, 1:70, 1:80, 1:90 และ 1:100

3.1.2 ปิเปตตัวอย่างน้ำลายที่ทำการเจือจางไว้ลงในหลอดทดลองปริมาณ 1 mL ทั้งหมด 10 หลอด 1:10,1:20, 1:30, 1:40, 1:50, 1:60, 1:70, 1:80, 1:90 และ 1:100 ตามลำดับ

3.1.3 ปิเปตสารละลายน้ำแป้ง และสารละลายเบเนดิกต์ อย่างละ 1 mL ใส่ในหลอดทดลองในข้อ 3.1.2 เขย่าให้เข้ากัน

3.1.4 นำหลอดทดลองในข้อ 3.1.3 ต้มในน้ำเดือดที่อุณหภูมิ 90 °C เป็นเวลา 5 นาที

3.1.5 เมื่อครบเวลา สังเกตและบันทึกผลการทดสอบการเกิดตะกอนสีแดงอิฐของ Cu_2O ของสารละลายเบเนดิกต์



ภาพที่ 4 วิธีการทดสอบปฏิกิริยาของวิธีเบเนดิกต์

3.2 การวิเคราะห์น้ำลายโดยเทคนิค Visible Spectrophotometry

3.2.1 นำสารตัวอย่างน้ำลายในข้อ 3.1.4 ทั้ง 10 หลอด นำส่วนใสของสารละลายเบเนดิกต์ที่เหลือจากปฏิกิริยามาทำการวัดการดูดกลืนแสง โดย scan ที่ความยาวคลื่น 400 - 800 nm โดยใช้ น้ำกลั่น เป็น blank

3.2.2 ทำการวิเคราะห์ผลการทดลอง

3.3 การวิเคราะห์น้ำลายโดยเทคนิค Attenuated total reflectance - Fourier transform infrared (ATR-FTIR)

3.3.1 ใช้โปรแกรม Spectrum และตั้งสภาวะการทำงานของเครื่อง ATR-FTIR ที่ใช้ในการวิจัย ดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 การตั้งสภาวะการทำงานของเครื่อง ATR-FTIRที่ใช้ในการวิจัย

Cell	**Diamond cell**
Scan range	4000-660 cm^{-1}
Scan	16 ครั้ง
Resolution	2 cm^{-1}
Force	100

3.3.2 ทำการ Run background ตรวจความพร้อม ใช้งานของ Diamond cell

3.3.3 นำตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ใส่ลงบนช่องสำหรับวางตัวอย่างด้านบน เซลล์จะมีตัวหมุนสำหรับกดให้ตัวอย่างสัมผัสกับผิวเซลล์ใช้แรงกดประมาณ 100 แล้วจึงเริ่มสแกนตัวอย่าง

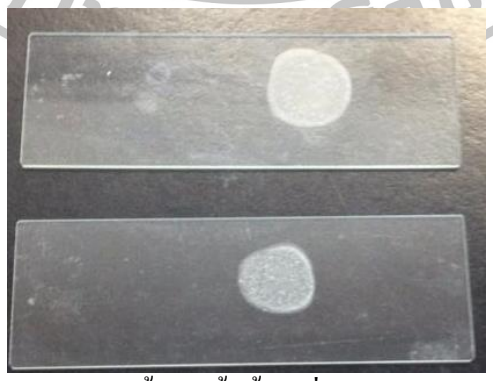
3.3.4 บันทึกผลสเปกตรัม (Spectrum) ที่ได้นำหมู่ฟังก์ชัน (Functional group) ที่พบเป็นองค์ประกอบของตัวอย่าง นำไปประมวลผลต่อไป

3.4 การทดสอบระยะเวลาในการเก็บตัวอย่างคราบน้ำลาย

3.4.1 เตรียมน้ำลายปริมาณ 1 mL หยดลงบนแผ่นกระจกสไลด์

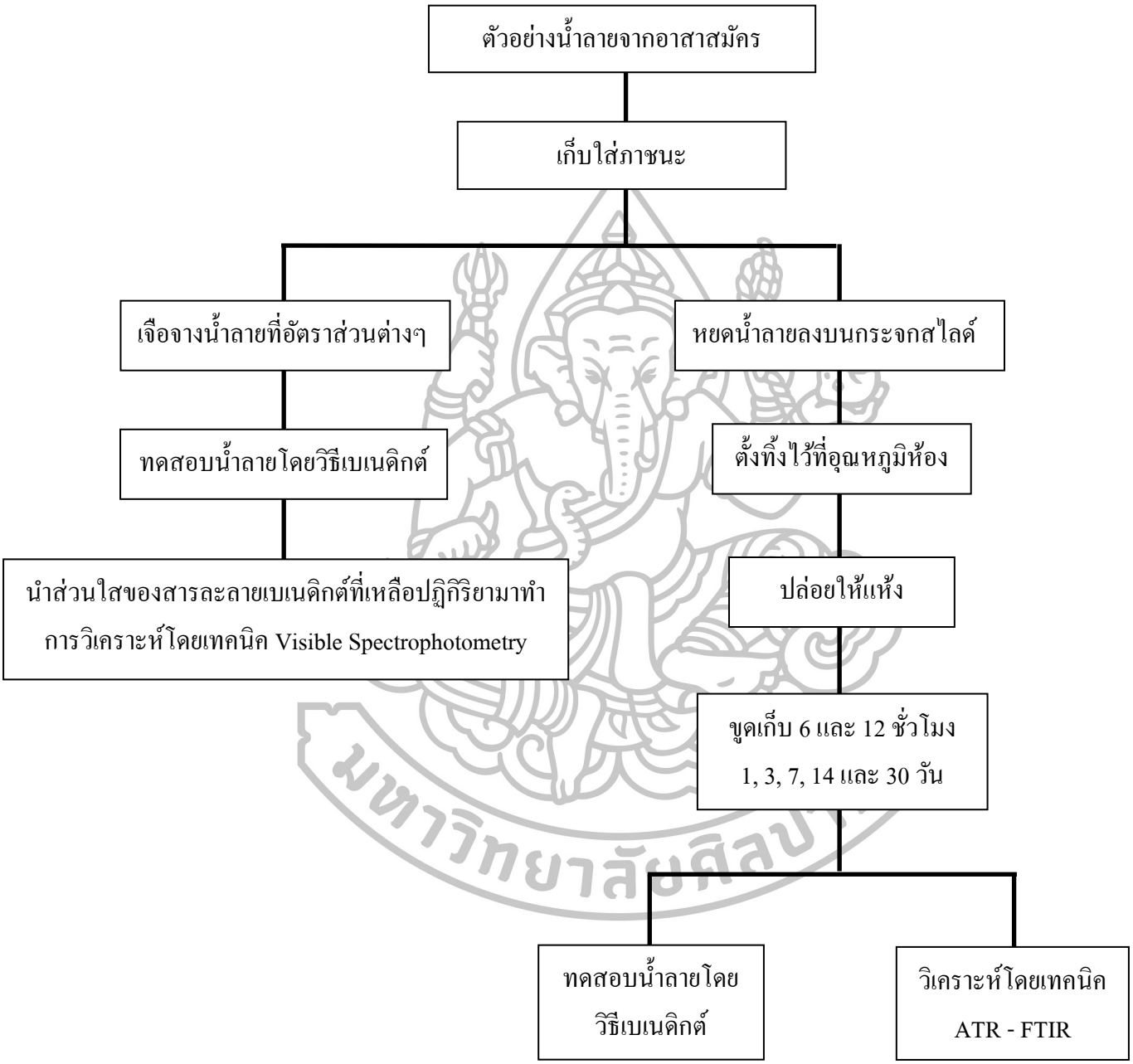
3.4.2 ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 6, 12 ชั่วโมง, 1, 3, 7, 14 และ 30 วัน

3.4.3 ขูดน้ำลายนำมาทดสอบโดยวิธีเบเนดิกต์ตามหัวข้อ 3.1.3 – 3.1.5 และวิเคราะห์โดยเทคนิค ATR-FTIR ตามหัวข้อ 3.3 เพื่อทำการตรวจหาน้ำลายในเวลาที่แตกต่างกัน



ภาพที่ 5 ตัวอย่างคราบน้ำลายตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 6ชั่วโมง

แผนผังการทดลอง



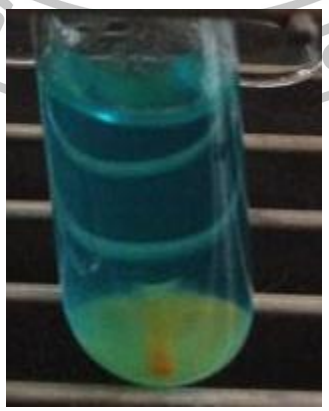
ภาพที่ 6 แผนผังวิธีการทดลองในงานวิจัย

บทที่ 4
ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

น้ำลายเป็นชีววัตถุ สิ่งที่พบได้ทั่วไปจากการถ่มน้ำลาย ซึ่งเป็นหลักฐานที่สามารถตรวจพบได้ในสถานที่เกิดเหตุ การตรวจคราบน้ำลายต้องสงสัยจากสถานที่เกิดเหตุ เพื่อเป็นการตรวจเบื้องต้นว่าเป็นน้ำลายจริงหรือไม่ ก่อนการนำไปตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอต่อไป เพราะในการตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอ มีราคาแพง ดังนั้นการตรวจสอบเบื้องต้นจะสามารถประหยัดค่าใช้จ่ายและประหยัดเวลาเป็นอย่างยิ่ง จากการทดลองเป็นการตรวจสอบเบื้องต้นโดยใช้การตรวจน้ำลายโดยวิธีเบเนดิกต์ ซึ่งนำน้ำลายมาย่อยน้ำแป้งให้เกิดเป็นน้ำตาลและใช้วิธีเบเนดิกต์ในการทดสอบน้ำตาลที่เกิดขึ้นร่วมกับเทคนิค Visible Spectrophotometry และวิเคราะห์คราบน้ำลายโดยเทคนิค ATR-FTIR เพื่อตรวจสอบว่าคราบนั้นเป็นคราบน้ำลายจริงเพื่อใช้ประโยชน์ในทางนิติวิทยาศาสตร์

4.1การทดสอบน้ำลายโดยวิธีเบเนดิกต์

การทดสอบน้ำลายโดยวิธีเบเนดิกต์นั้น ทำได้โดยนำน้ำลายมาเติมน้ำแป้งซึ่งเป็นสารตั้งต้นของการย่อยสลาย ซึ่งในน้ำลายมีเอนไซม์อะไมเลสซึ่งสามารถย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวและนำมาทดสอบโดยวิธีเบเนดิกต์ โดยน้ำตาลที่เกิดขึ้นจะทำปฏิกิริยากับสารละลายเบเนดิกต์ เมื่อนำไปต้มในน้ำเดือดจะเกิดตะกอนสีแดงอิฐของ Cu_2O ดังรูปภาพที่ 7 จากการทดสอบนี้เป็นการทดสอบเบื้องต้นว่าคราบที่เราพบในสถานที่เกิดเหตุเป็นน้ำลายจริงหรือไม่



ภาพที่ 7 การนำน้ำลายผสมกับน้ำแป้งและสารละลายเบเนดิกต์แล้วนำไปต้มในน้ำเดือดเกิดตะกอนสีแดงอิฐของ Cu_2O

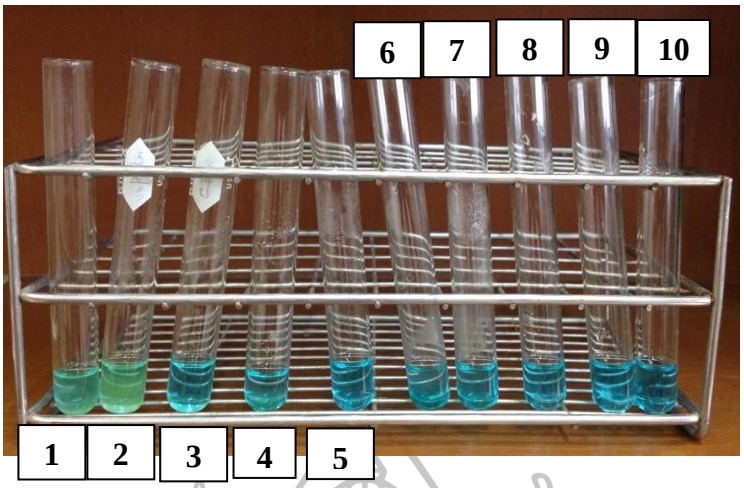
4.2 การทดสอบค่าความไวของวิธีการทดสอบน้ำลายโดยวิธีเบเนดิกต์

ทำการเจือจางน้ำลายด้วยน้ำกลั่นที่อัตราส่วนตั้งแต่ 1:10 จนถึงอัตราส่วน 1:100 จากนั้นนำน้ำลายที่เจือจางได้มาผสมกับน้ำแป้งและสารละลายเบเนดิกต์ จากนั้นนำไปต้มในน้ำเดือดได้ผลการทดลอง ดังตารางที่ 6

ตารางที่ 6 ผลการทดสอบน้ำลายที่เจือจางที่อัตราส่วนต่างๆ โดยวิธีเบเนดิกต์

น้ำลายที่เจือจางต่ออัตราส่วน (น้ำลาย 1 mL: น้ำกลั่น 1 mL)	**ผลการทดลอง**
1 : 0	เกิดตะกอนสีแดงอิฐของ Cu_2O
1 : 1	เกิดตะกอนสีแดงอิฐของ Cu_2O
1 : 10	เกิดตะกอนสีแดงอิฐของ Cu_2O
1 : 20	เกิดตะกอนสีแดงอิฐของ Cu_2O
1 : 30	ไม่เกิดตะกอน
1 : 40	ไม่เกิดตะกอน
1 : 50	ไม่เกิดตะกอน
1 : 60	ไม่เกิดตะกอน
1 : 70	ไม่เกิดตะกอน
1 : 80	ไม่เกิดตะกอน
1 : 90	ไม่เกิดตะกอน
1 : 100	ไม่เกิดตะกอน

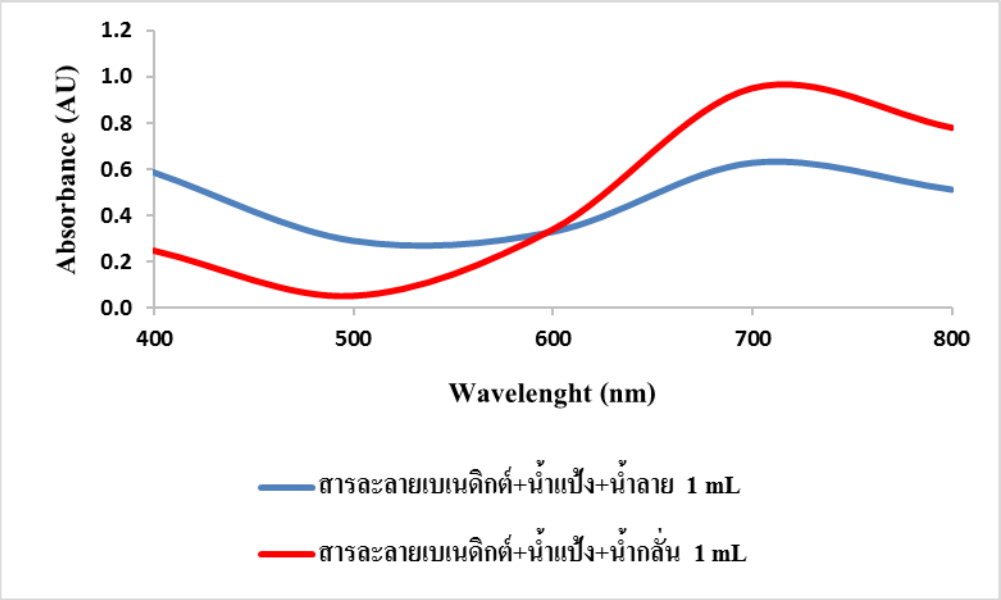
จากการนำน้ำลายมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นและภายหลังสามารถทดสอบน้ำตาลที่เกิดขึ้นด้วยสารละลายเบเนดิกต์ พบว่าสังเกตเห็นตะกอนสีแดงอิฐของ Cu_2O ในสารละลายเมื่อเจือจางน้ำลายลงในอัตราส่วน 1:20 เท่า (โดยปริมาตร) ดังแสดงในตารางที่ 6 และ รูปภาพที่ 8



ภาพที่ 8 การทดสอบน้ำลายโดยวิธีเบเนดิกต์พบตะกอนสีแดงอิฐของ Cu_2O ของสารละลายเบเนดิกต์น้ำลายที่เจือจางด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน1 คือ 1:10, 2 คือ 1:20, 3 คือ 1:30, 4 คือ 1:40, 5 คือ 1:50, 6 คือ 1:60, 7 คือ 1:70, 8 คือ 1:80, 9 คือ 1:90, 10 คือ 1:100 ตามลำดับ

4.3 การวิเคราะห์คราบน้ำลายโดยใช้วิธีเบเนดิกต์ร่วมกับเทคนิค Visible Spectrophotometry

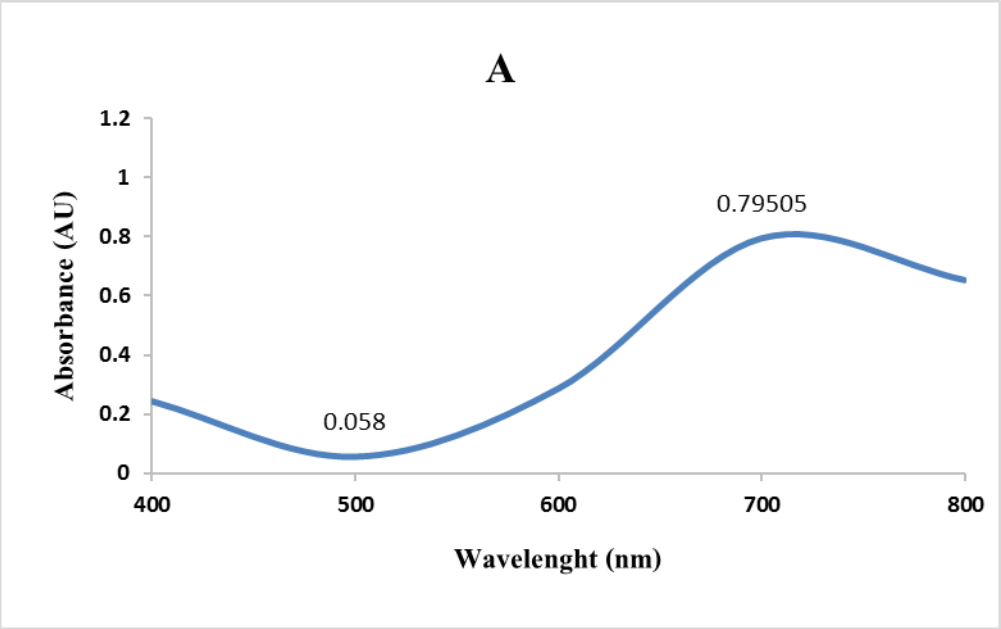
จากการทดลองในข้อ 4.1 เมื่อทำการทดสอบค่าความไวของวิธีการทดสอบน้ำลายโดยวิธีเบเนดิกต์แล้ว สารละลายส่วนใสถูกนำไปวิเคราะห์โดยเทคนิค Visible Spectrophotometry วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 400 - 800 nm. โดยใช้น้ำกลั่นเป็น blank จากการทดสอบพบว่าสเปกตรามีค่าดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 736 nm. ดังเส้นสีฟ้าในรูปภาพที่ 9



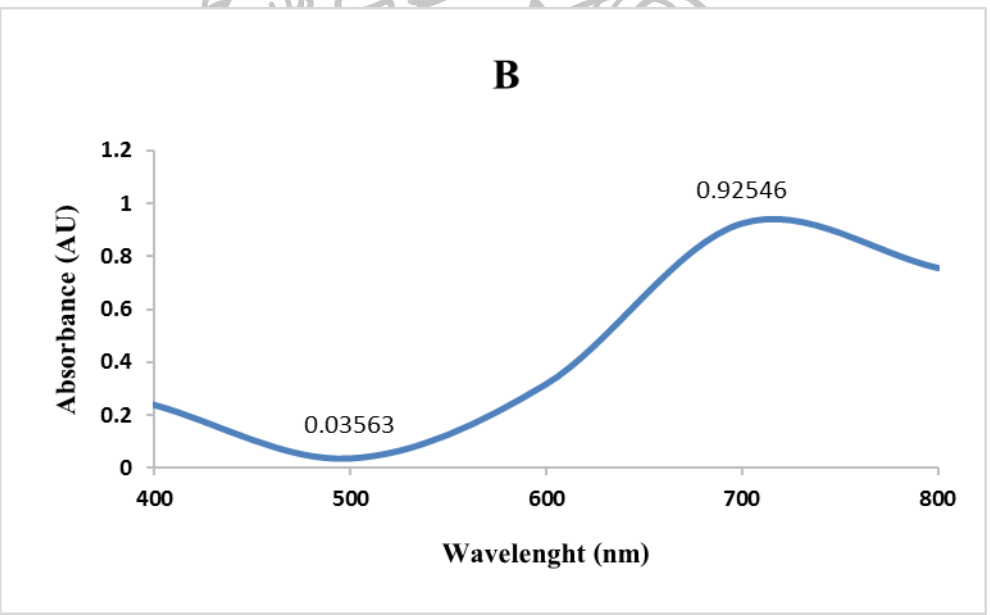
ภาพที่ 9 สเปกตราของสารละลายเบเนดิกต์ภายหลังจากการเกิดปฏิกิริยากับน้ำลายวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 400 –800 nm.

จากรูปภาพที่ 9 แสดงสเปกตราของสารละลายเบเนดิกต์ผสมน้ำแป้งและน้ำกลั่นในเส้นสีแดง และสเปกตรัมเส้นสีฟ้าซึ่งเป็นสเปกตรัมของสารละลายเบเนดิกต์ผสมน้ำแป้งและน้ำลาย จากภาพพบว่าเมื่อผสมน้ำลายลงไป ค่าการดูดกลืนแสงที่ 736 nm. ของสารละลายเบเนดิกต์จะลดลง แสดงว่าสารละลายเบเนดิกต์ถูกใช้ไปในการทดสอบกับน้ำตาลที่เกิดจากการย่อยแป้งของเอนไซม์อะไมเลสในน้ำลาย

จากการทดสอบพบว่าค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายเบเนดิกต์ เมื่อใช้น้ำลายที่เจือจางด้วยน้ำกลั่นจนถึงอัตราส่วน 1:50 mL (น้ำลายต่อน้ำกลั่นโดยปริมาตร) ดังตัวอย่างสเปกตรัมของน้ำลายที่เจือจางด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:10 (โดยปริมาตร) ซึ่งมีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 736 nm. เมื่อวัดความสูงของสเปกตรัมได้เท่ากับ 0.73705 Abs. ดังรูปภาพที่ 10 และสเปกตรัมของน้ำลายที่เจือจางด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:20 (โดยปริมาตร)ซึ่งมีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 736 nm. เท่ากับ 0.88983 Abs. ดังรูปภาพที่ 11 แสดงให้เห็นว่าเมื่อน้ำลายมีอัตราการเจือจางมากขึ้นหรือปริมาณน้ำลายน้อยลง ค่าการดูดกลืนแสงก็จะมากขึ้นด้วย แสดงดังรูปภาพที่ 11



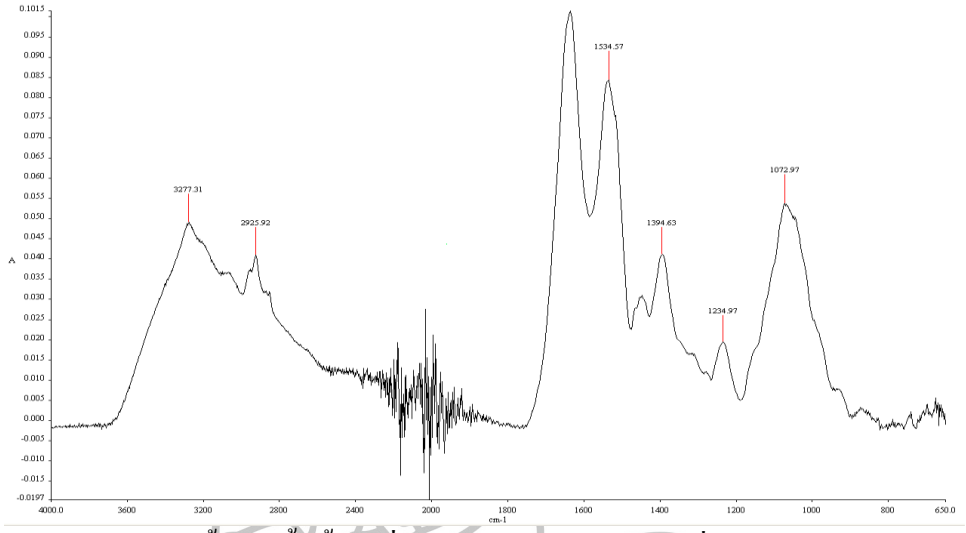
ภาพที่ 10 สเปกตรัมของสารละลายเบเนดิกต์ภายหลังจากการเกิดปฏิกิริยากับน้ำลายที่เจือจางด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:10 (โดยปริมาตร) วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 400 –800 nm.



ภาพที่ 11 สเปกตรัมของสารละลายเบเนดิกต์ภายหลังจากการเกิดปฏิกิริยากับน้ำลายที่เจือจางด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:20 (โดยปริมาตร) วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 400 –800 nm.

4.4การวิเคราะห์คราบน้ำลายโดยเทคนิคATR-FTIR

จากการขูดคราบน้ำลายที่หยดลงบนกระจกสไลด์และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 6 ชั่วโมง มาทำการวิเคราะห์โดยเทคนิค ATR-FTIR ทำการวิเคราะห์ที่ช่วงเลขคลื่น 4000-660 cm^{-1} สแกนจำนวน 16 ครั้ง ตั้งค่า Resolution ที่ 2 cm^{-1}ดังรูปภาพที่ 12



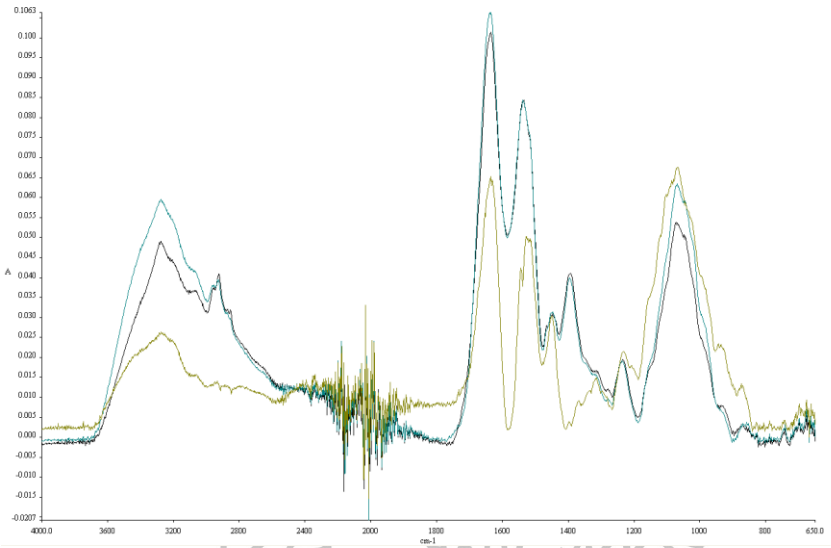
ภาพที่ 12 สเปกตรัมของน้ำลายตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 6 ชั่วโมง นำมาขูดแล้วทำการวิเคราะห์โดยเทคนิค ATR-FTIR ที่ช่วงเลขคลื่น 4000-660 cm^{-1}

เมื่อนำตัวอย่างน้ำลายมาวิเคราะห์โดยเทคนิค ATR-FTIR จากสเปกตรัมของคราบน้ำลายดังรูปภาพที่ 12 ปรากฏพีคที่เด่นชัดที่เป็นองค์ประกอบของโปรตีนคือ Amind I ในช่วงเลขคลื่น 1690-1650 cm^{-1} และAmide II ในช่วงเลขคลื่น 1590-1480 cm^{-1} ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Charlotte-Maria Orphanou ในปี 2015 ที่ทำการทดสอบน้ำลายโดยเทคนิค ATR-FTIR พบว่ามีพีค 1690 cm^{-1} ของ Amide I พีค 1543 cm^{-1} ของ Amind II และพีค 1075 cm^{-1} ของ sugar moieties ที่เป็นพีคที่บ่งบอกถึงน้ำลาย และงานวิจัยของคุณกัญญารัตน์ ติบกรณ์ ในปี 2013 ทำการทดสอบสารคัดหลั่งต่างๆ และน้ำลาย ด้วยเทคนิค ATR-IR ปรากฏพีคที่เป็นองค์ประกอบโปรตีนคือ Amide I ในช่วง 1690-1650 cm^{-1} และ Amide II ในช่วง 1590-1480 cm^{-1}

4.5 การวิเคราะห์คราบน้ำลายที่หยดทิ้งไว้ที่ระยะเวลาต่างๆ

นำตัวอย่างน้ำลายมาหยดลงบนกระจกสไสด์ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง ดังรูปภาพที่ 5 จากนั้นทำการขูดคราบน้ำลายนำมาทดสอบโดยวิธีเบเนดิกต์โดยการสังเกตตะกอนสีแดงอิฐของ Cu_2O และ

ทดสอบโดยเทคนิค ATR-FTIR ดังรูปภาพที่ 13 โดยเก็บหลังจากทิ้งคราบน้ำลายไว้เป็นเวลา 6 ชั่วโมง 12 ชั่วโมง 1, 3, 7, 14 และ 30 วัน ตามลำดับ ผลการทดสอบแสดงดังตารางที่ 7



ภาพที่ 13 สเปกตรัมของน้ำลายตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นำมาขูดแล้วทดสอบโดยเทคนิค ATR-FTIR โดยใช้เลขคลื่น 4000-660 cm^{-1} ระยะเวลาต่างๆโดย เส้นสีดำ คือ 6 ชั่วโมง, สีเหลือง คือ 3 วัน และสีฟ้า คือ 14 วัน

ตารางที่ 7 ผลการทดสอบน้ำลายโดยวิธีเบเนดิกต์และเทคนิค ATR-FTIR

หยดน้ำลายตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง	**วิธีการตรวจวิเคราะห์**	
	เบเนดิกต์	**ATR-FTIR**
6 ชั่วโมง	✓	✓
12 ชั่วโมง	✓	✓
1วัน	✓	✓
3วัน	✓	✓
7วัน	✓	✓
14วัน	✓	✓
30 วัน	✓	✓

✓ คือ สามารถตรวจพบว่าเป็นน้ำลาย

จากตารางพบว่า ผลการทดสอบสามารถใช้วิธีเบเนดิกต์และเทคนิค ATR-FTIR ในการตรวจสอบว่าเป็นคราบน้ำลายได้นานถึง 30 วัน และจากการสังเกตสเปกตรัมของน้ำลายจากเทคนิค ATR-FTIR พบว่าสามารถตรวจพบได้นานถึง 30 วัน และเทคนิค ATR-FTIR สามารถนำไปวิเคราะห์ดีเอ็นเอได้โดยที่ไม่ทำลายตัวอย่างอย่างไรก็ตามงานวิจัยของ Charlotte Orphanou และคณะ ทดสอบน้ำลาย เลือด น้ำอสุจิและสารคัดหลั่งในช่องคลอด พบว่าสเปกตรัมที่คล้ายกัน ดังนั้นถ้าใช้วิธีเบเนดิกต์ร่วมกับเทคนิค ATR-FTIR สามารถยืนยันได้ว่าคราบน้ำลายที่พบในสถานที่เกิดเหตุเป็นคราบน้ำลายจริง

บทที่ 5

สรุปและอภิปรายผลการทดลอง

5.1 สรุปและอภิปรายผลการทดลอง

วัตถุประสงค์ของการทดลองนี้เพื่อทดสอบเบื้องต้นว่าคราบน้ำลายที่พบในสถานที่เกิดเหตุเป็นคราบน้ำลายจริงหรือไม่ เพราะการตรวจดีเอ็นเอด้วยชีววัตถุแต่ละตัวอย่างมีราคาแพง และใช้เวลาในการวิเคราะห์ ถ้ามีวิธีที่ใช้ในการทดสอบเบื้องต้นก็สามารถช่วยให้ประหยัดเวลาได้ โดยในการศึกษาครั้งนี้จะทดสอบคราบน้ำลายโดยวิธีเบเนดิกต์ร่วมกับเทคนิค Visible Spectrophotometry และเทคนิค ATR-FTIR โดยผลการทดลองพบว่า ในการทดสอบน้ำตาลที่เกิดขึ้นจากการย่อยแป้งที่ใส่ไปเป็นสารตั้งต้นจากนั้นใช้สารละลายเบเนดิกต์เพื่อตรวจสอบการเกิดตะกอนสีแดงอิฐของ Cu_2O พบว่าสามารถทำได้ดี โดยเมื่อทดสอบความไวของวิธีนี้พบว่า สามารถตรวจสอบน้ำลายที่ทำการเจือจางด้วยน้ำกลั่นได้สูง20 เท่า โดยสังเกตุจากตะกอนที่เกิดขึ้นเมื่อนำสารละลายส่วนใสที่เหลือจากการทดสอบน้ำลายโดยวิธีเบเนดิกต์ นำไปวิเคราะห์โดยเทคนิค Visible Spectrophotometry พบว่า สเปกตรัมมีค่าดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 736 nm. โดยสเปกตรัมได้มีค่าการดูดกลืนแสงลดลง เมื่อเปรียบเทียบกับสเปกตรัมของสารละลายเบเนดิกต์เพียงอย่างเดียวซึ่งแสดงให้เห็นว่าสารละลายเบเนดิกต์ถูกใช้ไปจริงในปฏิกิริยาการทดสอบน้ำลายโดยวิธีเบเนดิกต์ จากวิธีนี้สามารถตรวจสอบความไวของวิธีโดยตรวจสอบได้ถึง 50 เท่า

จากการนำคราบน้ำลายมาวิเคราะห์โดยเทคนิค ATR-FTIR ที่ช่วงเลขคลื่น 4000-660 cm^{-1} พบพีคที่เด่นชัดของโปรตีน Amide I ที่ช่วงเลขคลื่น 1690 – 1650 cm^{-1} และพีค Amide II ที่ช่วงเลขคลื่น 1590 – 1480 cm^{-1} ตามลำดับ ซึ่งรูปแบบของสเปกตรัมของน้ำลายสอดคล้องกับงานวิจัยของ Charlotte-Maria Orphanou ในปี 2015 มีการทดสอบโดยเทคนิค ATR-FTIR สามารถตรวจสอบและแยกความแตกต่างระหว่างของเหลวในร่างกาย คือ เลือด น้ำลาย น้ำอสุจิ และสารคัดหลั่งในช่องคลอด โดยปรากฏสเปกตรัมที่เป็นพีคของโปรตีนในโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับของเหลวในร่างกาย สามารถใช้ยืนยันว่าเป็นน้ำลายจริงจากการวิเคราะห์คราบน้ำลายที่หยดบนกระจกสไลด์ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องขูดมาเพื่อทำการทดสอบน้ำลายโดยใช้วิธีเบเนดิกต์สามารถตรวจพบน้ำลายในระยะเวลาที่นานถึง 30 วันซึ่งสัมพันธ์และเป็นไปตามงานวิจัยของ Johannes Hedman ในปี 2010 โดยพบว่าการตรวจคราบน้ำลายที่แห้งก็ยังสามารถตรวจพบอะไมเลสที่เป็นเอนไซม์ในน้ำลายได้ และตรวจโดยเทคนิค ATR-FTIR ก็สามารถตรวจพบน้ำลายในระยะเวลาที่นานถึง 30 วัน เช่นกัน

จากการวิจัยจะเห็นได้ว่าวิธีการตรวจหาน้ำลายเบื้องต้นโดยการตรวจน้ำลายโดยใช้วิธีเบเนดิกต์ซึ่งเป็นวิธีที่ง่ายและเป็นวิธีที่สามารถทำได้ในห้องปฏิบัติการทั่วไป และนำมาประยุกต์ใช้กับการวิเคราะห์โดยเทคนิค Visible Spectrophotrometry ที่เป็นเทคนิคที่สะดวกและรวดเร็วในการวิเคราะห์ และเทคนิค ATR-FTIR ยังสามารถตรวจวิเคราะห์ได้โดยใช้สารตัวอย่างปริมาณน้อย มีขั้นตอนที่ไม่สลับซับซ้อนและไม่ต้องใช้สารเคมีใดๆ จึงไม่ทำลายวัตถุพยานที่ได้มาสามารถนำวัตถุพยานไปตรวจวิเคราะห์อย่างอื่นได้อีกต่อไป เพื่อเป็นหลักฐานยืนยันการกระทำผิดของบุคคลต้องสงสัยได้จึงสามารถนำมาใช้ประโยชน์ในทางนิติวิทยาศาสตร์ต่อไป

5.2 ข้อเสนอแนะ

1.การศึกษาครั้งต่อไป ควรมีการศึกษาโดยการหยดน้ำลายบนวัสดุอื่น เช่น กระดาษ ผ้าแผ่นไม้ เป็นต้น

2. ควรเพิ่มระยะเวลาในการหยดน้ำลายบนวัสดุแล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง

3. ควรศึกษาเพิ่มเติมตัวอย่างที่เป็นชีววัตถุอย่างอื่น เช่น เลือด อสุจิ เป็นต้น

4. ประยุกต์ใช้สารละลายเบเนดิกต์ที่มีการเตรียมสภาวะที่แตกต่างกันในการทดสอบ

มหาวิทยาลัยศิลปากร

รายการอ้างอิง

ดาวัลย์ ฉิมภู่. (2541). **หลักการและเทคนิคการใช้เครื่องมือพื้นฐานทางชีวเคมี (UV-Visible spectrophotometer)**. พิษณุโลก : มหาวิทยาลัยนเรศวร.

พักตร์ประไพ ประจำเมือง และ วิเชียร ลีลาวัชรมาศ. (2546). “เอนไซม์ที่เกี่ยวกับการย่อยแป้ง.” **วารสารศูนย์บริการวิชาการ.** 11(เมษายน) : 252.

พัชรา นวลเพชร. (2555). “การตรวจวิเคราะห์ผลย้อมสีทางนิติวิทยาศาสตร์โดยเทคนิค UV-Visible Spectrophotometry และเทคนิค Attenuated Total Refection Fourier Trabsform InFrared Spectroscopy (ATR-FTIR).” วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิต สาขานิติวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ บัณฑิตวิทยาลัย, มหาวิทยาลัยศิลปากร.

แม้น อมรสิทธิ์และอมร เพชรสม. (2552) **หลักการและเทคนิคการวิเคราะห์เชิงเครื่องมือ**. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพมหานคร: ชวนพิมพ์.

วิชัย ริ้วตระกูล และคณะ. (2526). **การประยุกต์สเปคโทรสโคปีในเคมีอินทรีย์**. กรุงเทพมหานคร: โรงพิมพ์นำอักษรการพิมพ์.

สมศักดิ์ วรคามิน. (2550). **เอนไซม์ กุญแจแห่งชีวิต.**พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ: สามเจริญพานิชย์.

B.J. Clark, T.Frost and M.A. Russell. (1993). **UV Spectroscopy Techniques, instrumentation, data handling.** London :Chapmam& Hall.

C-M. Orphanou. (2015). “The detection and discrimination of human body fluids using ATR FT-IR spectroscopy.” **Forensic SciInt252 : e10-e16.**

J. Hedman, E. Dalin a, B. Rasmusson a, R. Ansell. (2010). “Evaluation of amylase testing as a tool for saliva screening of crime scene trace swabs.” **Forensic SciInt Genetics 5 : 194-198.**

การอ้างอิงจากฐานข้อมูลออนไลน์

ชัยวัฒน์ วามวรรัตน์. (2558). **สเปกโทรโฟโตเมตรี.** สืบค้นเมื่อวันที่ 25 มกราคม. เข้าถึงได้จาก http://biochem.flas.kps.ku.ac.th/01402312/01402312lab02spectro156.pdf.

ธีรยุทธ วิไลวัลย์. (2558). **อินฟราเรด สเปกโทรสโคปี**. สืบค้นเมื่อวันที่ 25 มกราคม. เข้าถึงได้จาก http://www.chemistry.sc.chula.ac.th/course_info/2302275/ir-265.pdf.

พรรณทิพย์ ตั้งปรียารักษ์. (2551). **เทคนิคปฏิบัติการใช้เครื่อง UV-Vis spectrophotometer ในการวิเคราะห์ทางเคมี**. สืบค้นเมื่อวันที่ 5 พฤศจิกายน. เข้าถึงได้จาก http://www.mwit.ac.th/~sarawoot/chem40235.htm.

พัชรา สินลอยมา. (2553). **ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับนิติเวชศาสตร์**. สืบค้นเมื่อวันที่ 8 กรกฎาคม. เข้าถึงได้จาก http://www.ajarnpat.com/data_Silpakorn.../Forensic_laboratory2553-01.doc

นพคุณ กีรติการกุล. (2555). **นิติวิทยาศาสตร์กับกระบวนการยุติธรรม**. สืบค้นเมื่อวันที่ 22 กรกฎาคม. เข้าถึงได้จาก http://www.sedc5.forensic.police.go.th/article1.htm.

สารานุกรมไทยสำหรับเยาวชน. (2558). **กายวิภาคศาสตร์และสรีรวิทยา.** เล่มที่ 8 : 57 สืบค้นเมื่อวันที่ 30 เมษายน. เข้าถึงได้จาก http://www.saranukromthai.or.th/.

E-book.ram. (2014). **Spectrophotometer**. สืบค้นเมื่อวันที่ 16 พฤศจิกายน. เข้าถึงได้จาก http://e-book.ram.edu/e-book/f/FY473(51)/FY473-8.pdf.

Phadebas. (2006). **ทดสอบอะไมเลส**. สืบค้นเมื่อวันที่ 8 พฤศจิกายน. เข้าถึงได้จาก http://www.phadebas.com/products/forensic_saliva_test_products.

Ratchaparg to chem. (2015). **คาร์โบไฮเดรต**. สืบค้นเมื่อวันที่ 10 กุมภาพันธ์. เข้าถึงได้จาก https://ratchapark.wordpress.com/คาร์โบไฮเดรต-carbohydrate/.

Wikipedia. (2015). **น้ำลาย**. สืบค้นเมื่อวันที่ 17 มกราคม. เข้าถึงได้จาก http://en.wikipedia.org/wiki/น้ำลาย.

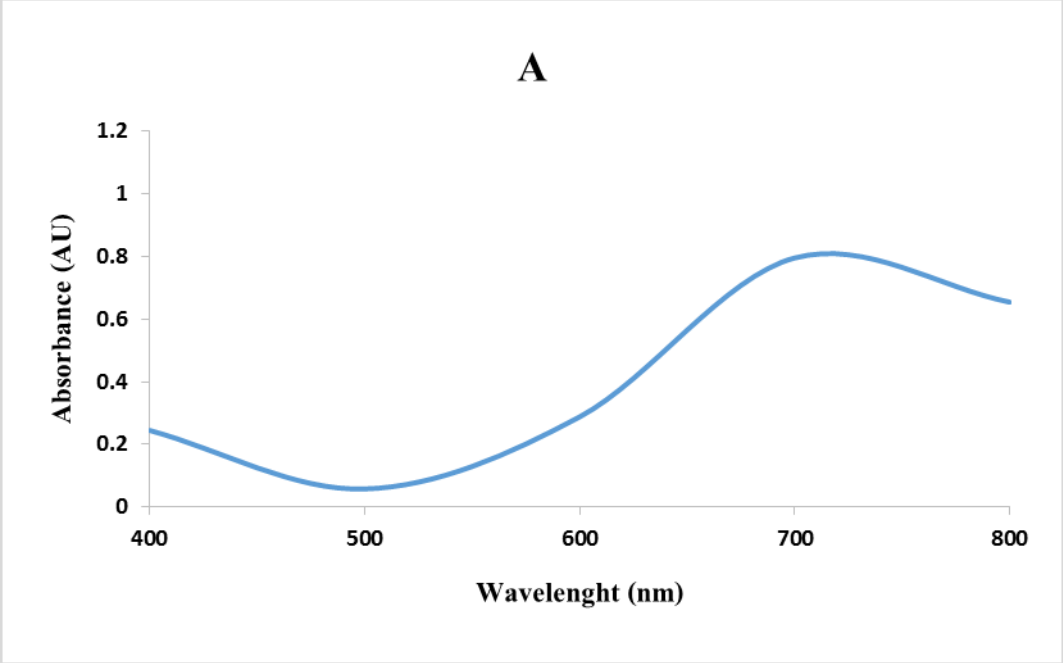
Wikipedia. (2014). **การชันสูตรพลิกศพ**. นิติเวชศาสตร์. สืบค้นเมื่อวันที่ 13 พฤศจิกายน. เข้าถึงได้จากhttp://th.wikipedia.org/wiki/การชันสูตรพลิกศพ.

ภาคผนวก

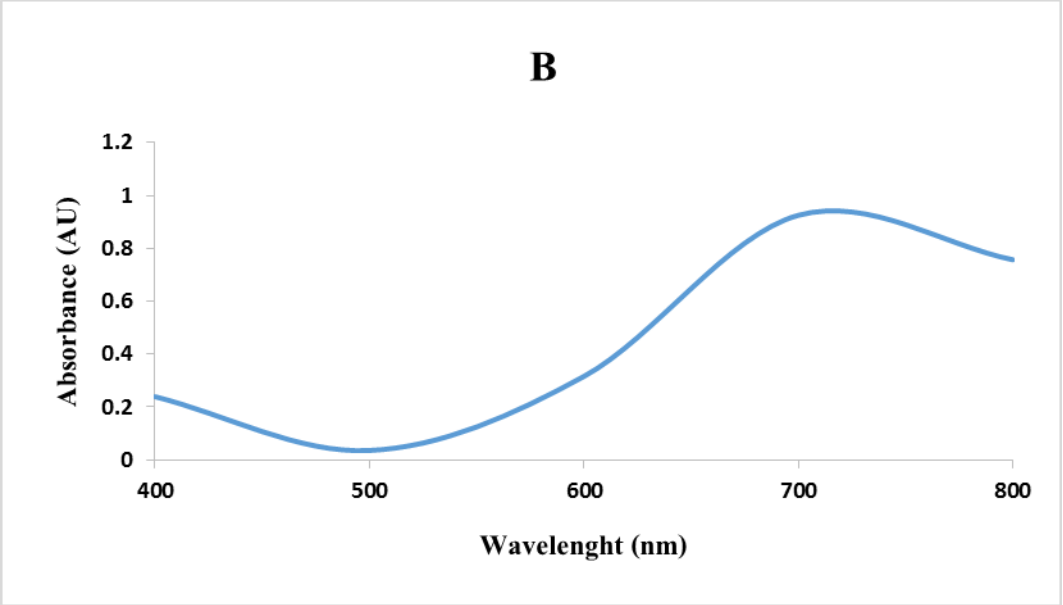
ภาคผนวก ก

สเปกตรัมของตัวอย่างสารละลายเบเนดิกต์ภายหลังจากการเกิดปฏิกิริยากับน้ำลาย

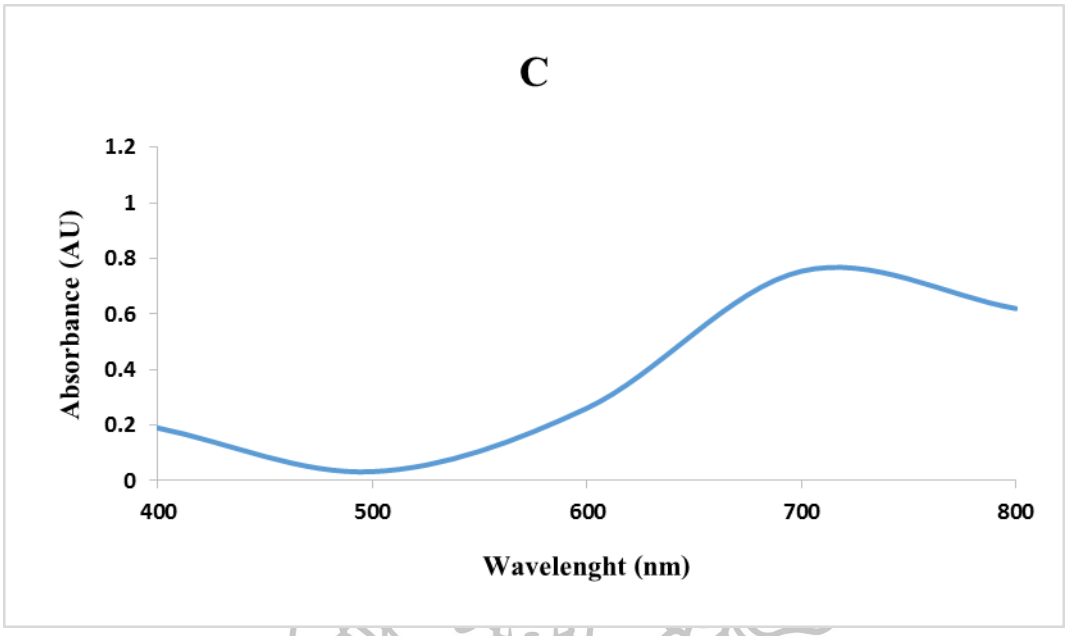
วิเคราะห์โดยเทคนิค Visible Spectrophotomey



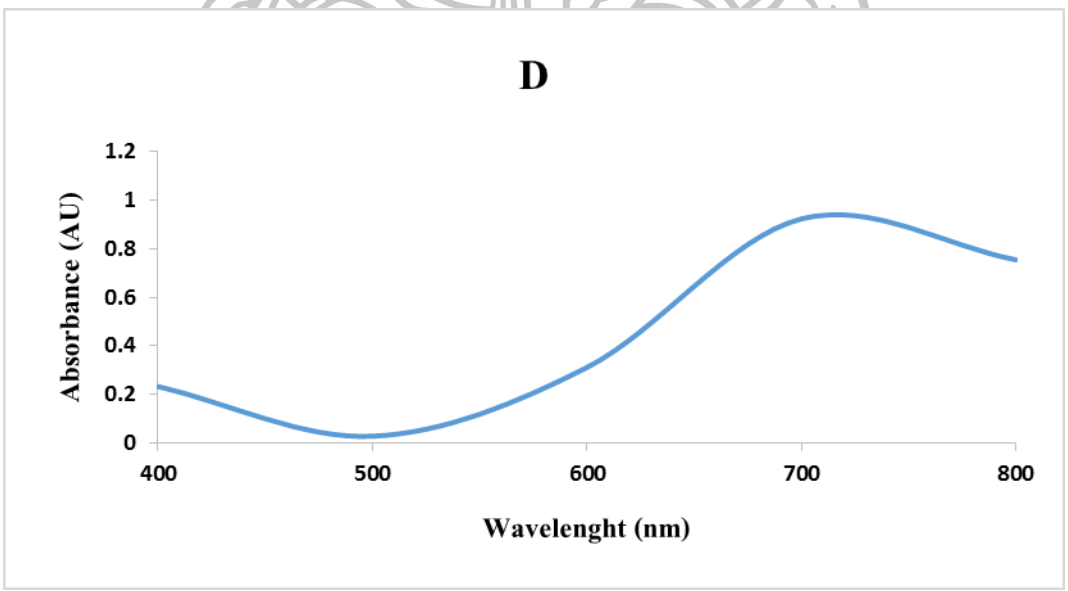
ภาพที่ 1 สเปกตรัมของสารละลายเบเนดิกต์ภายหลังจากการเกิดปฏิกิริยากับน้ำลายที่เจือจางด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:10 (โดยปริมาตร) วัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 400 –800 nm.



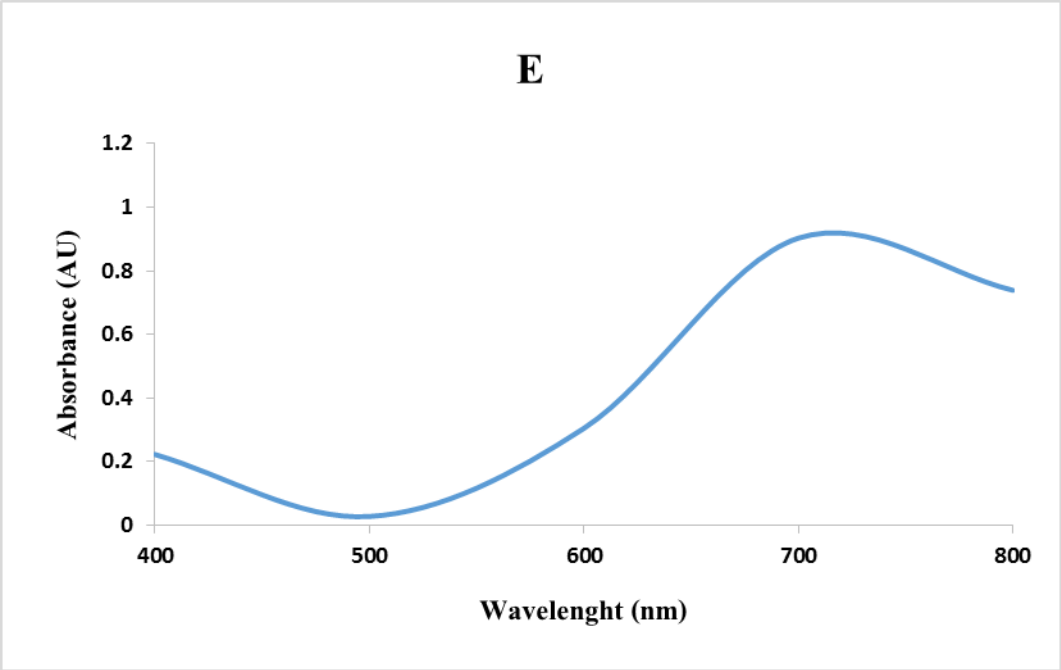
ภาพที่ 2 สเปกตรัมของสารละลายเบเนดิกต์ภายหลังจากการเกิดปฏิกิริยากับน้ำลายที่เจือจางด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:20 (โดยปริมาตร) วัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 400 –800 nm.



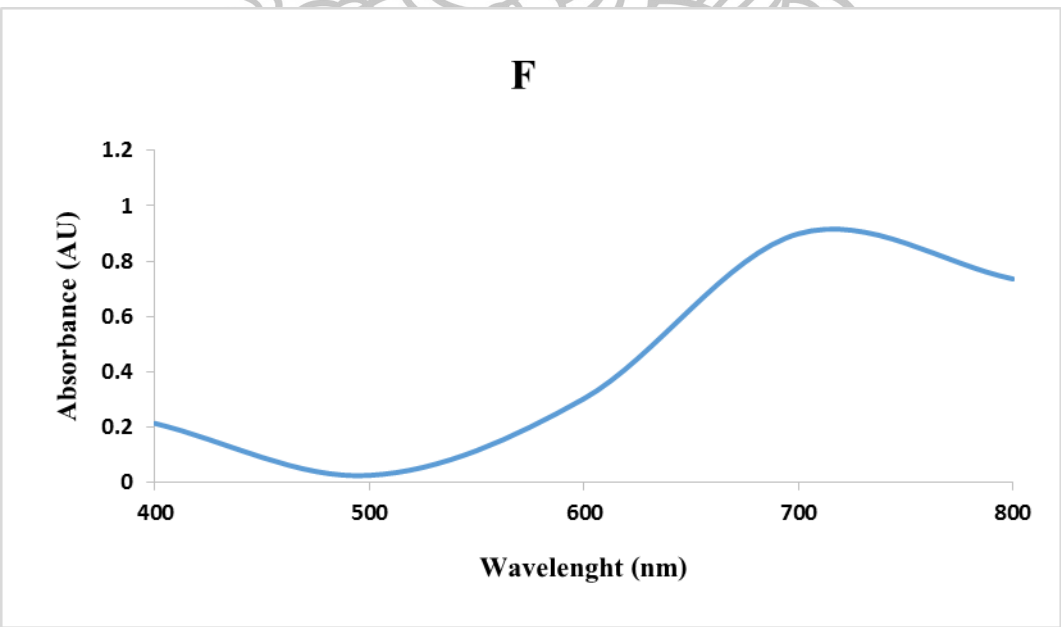
ภาพที่ 3 สเปกตรัมของสารละลายเบเนดิกต์ภายหลังจากการเกิดปฏิกิริยากับน้ำลายที่เจือจางด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:30 (โดยปริมาตร) วัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 400 –800 nm.



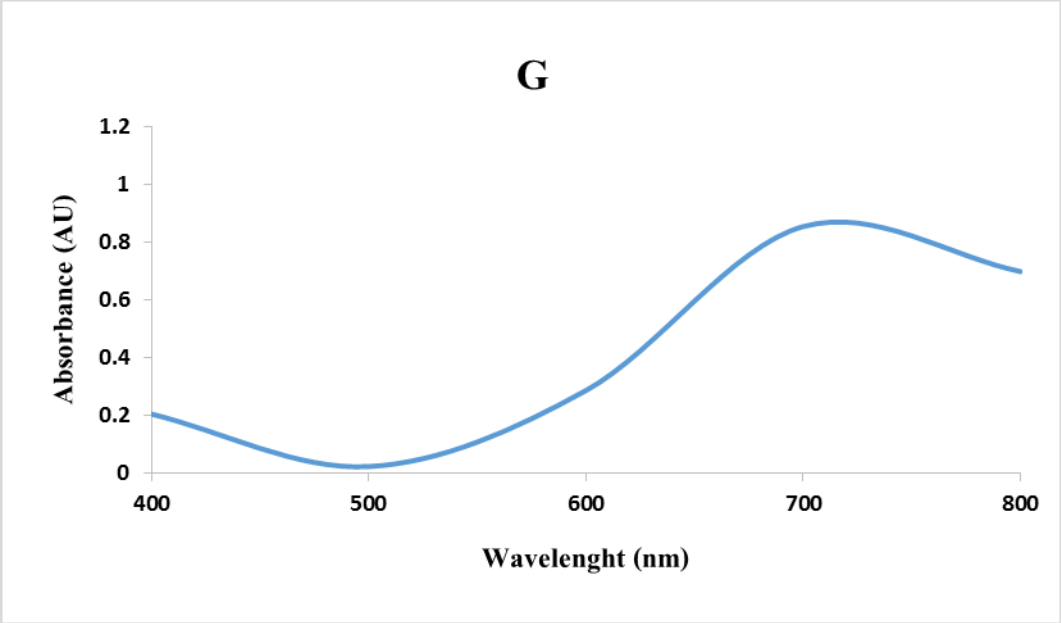
ภาพที่ 4 สเปกตรัมของสารละลายเบเนดิกต์ภายหลังจากการเกิดปฏิกิริยากับน้ำลายที่เจือจางด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:40 (โดยปริมาตร) วัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 400 –800 nm.



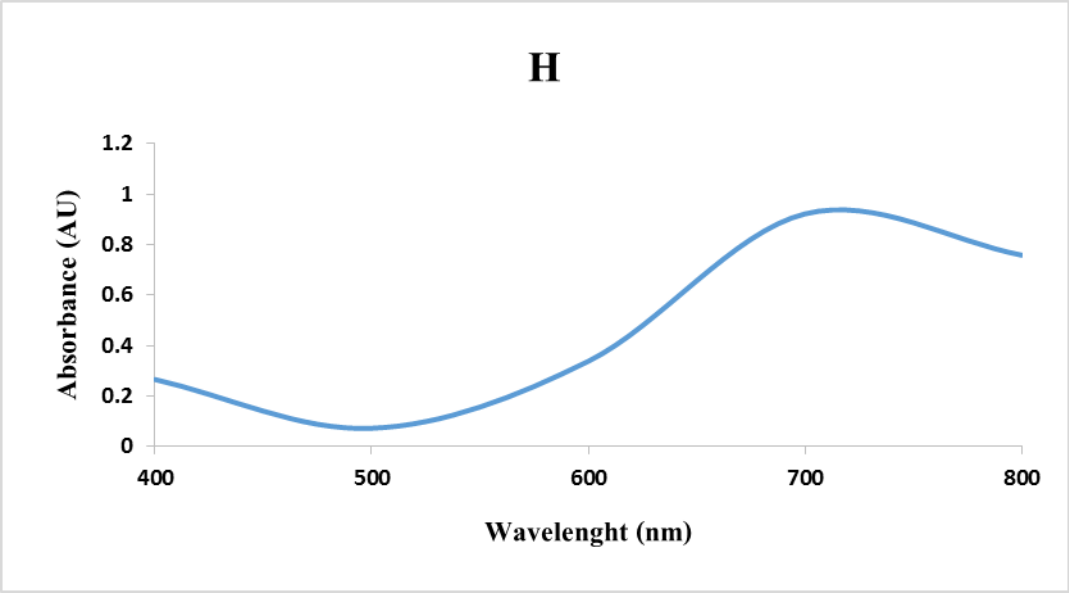
ภาพที่ 5 สเปกตรัมของสารละลายเบเนดิกต์ภายหลังจากการเกิดปฏิกิริยากับน้ำลายที่เจือจางด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:50 (โดยปริมาตร) วัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 400 –800 nm.



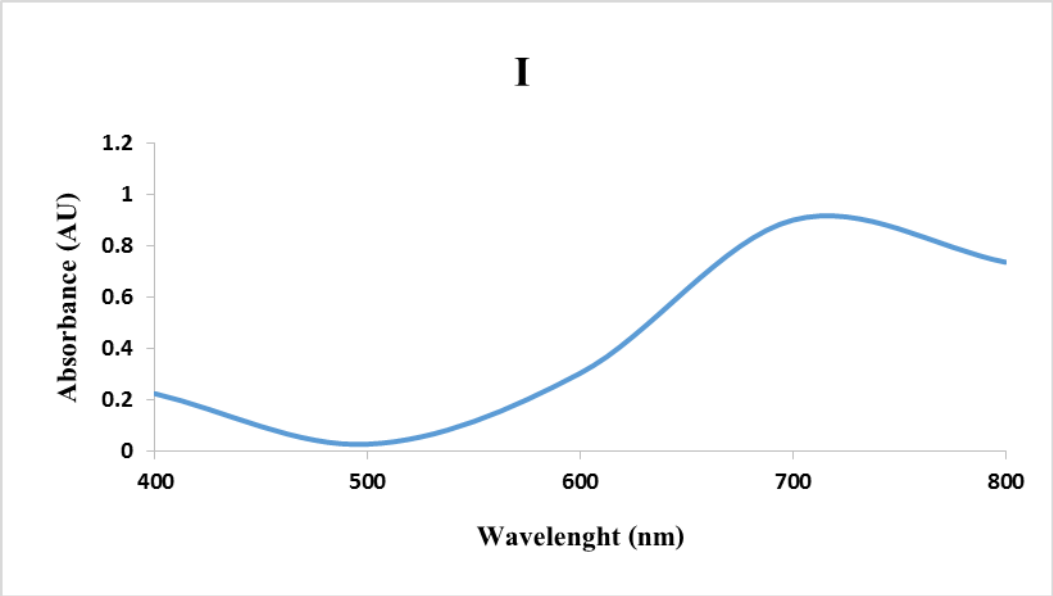
ภาพที่ 6 สเปกตรัมของสารละลายเบเนดิกต์ภายหลังจากการเกิดปฏิกิริยากับน้ำลายที่เจือจางด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:60 (โดยปริมาตร) วัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 400 –800 nm.



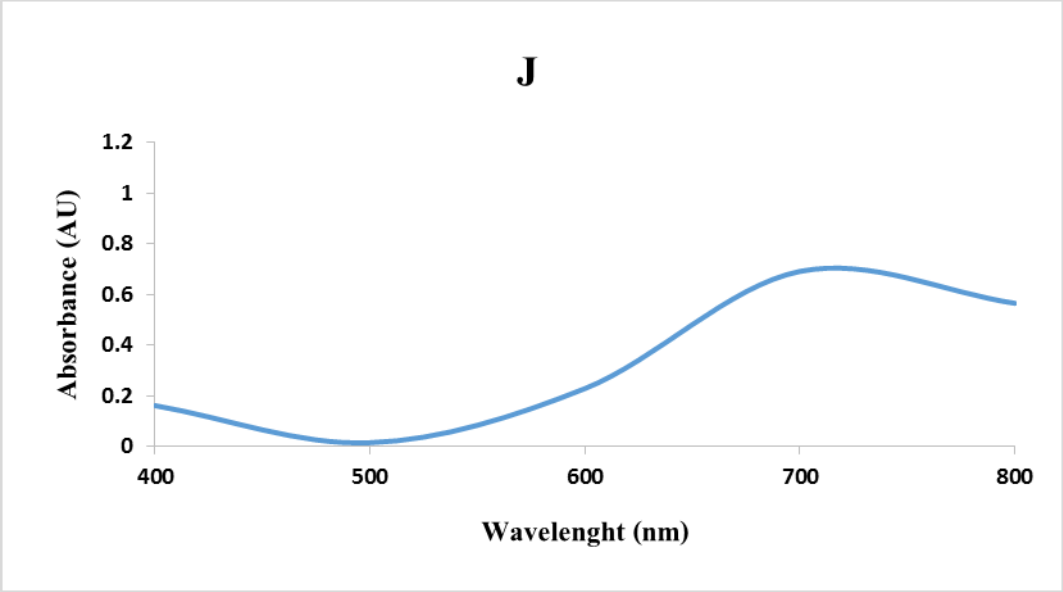
ภาพที่ 7 สเปกตรัมของสารละลายเบเนดิกต์ภายหลังจากการเกิดปฏิกิริยากับน้ำลายที่เจือจางด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:70 (โดยปริมาตร) วัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 400 –800 nm.



ภาพที่ 8 สเปกตรัมของสารละลายเบเนดิกต์ภายหลังจากการเกิดปฏิกิริยากับน้ำลายที่เจือจางด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:80 (โดยปริมาตร) วัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 400 –800 nm.



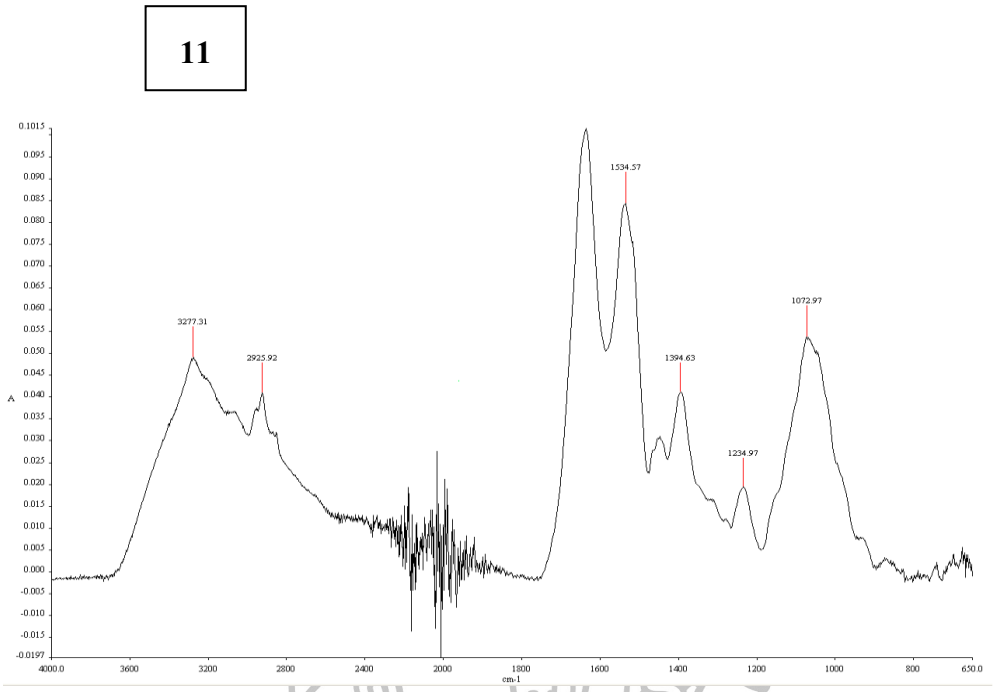
ภาพที่ 9 สเปกตรัมของสารละลายเบเนดิกต์ภายหลังจากการเกิดปฏิกิริยากับน้ำลายที่เจือจางด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:90 (โดยปริมาตร) วัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 400 –800 nm.



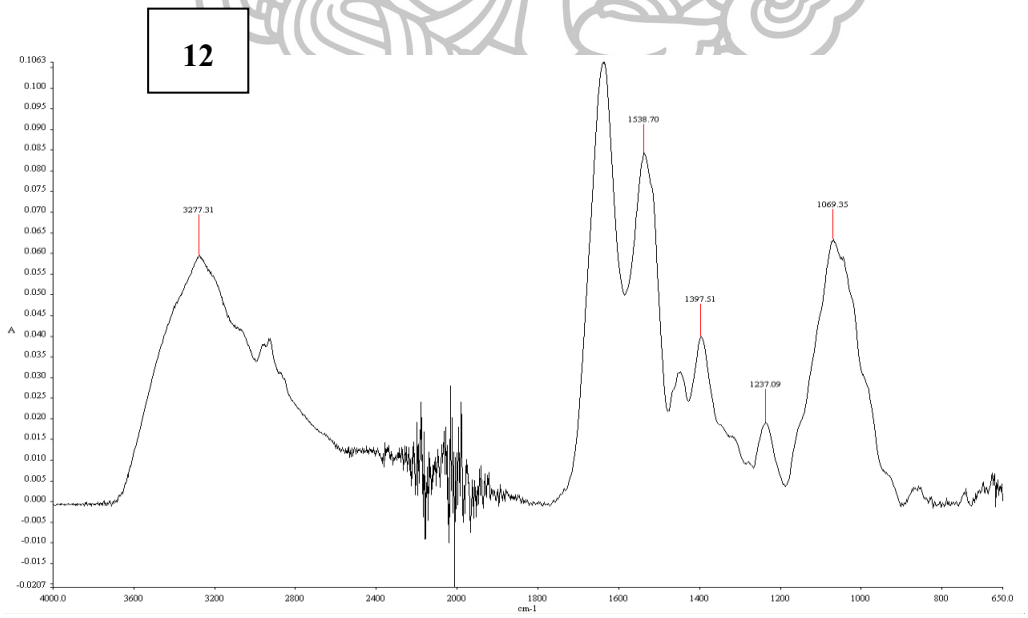
ภาพที่ 10 สเปกตรัมของสารละลายเบเนดิกต์ภายหลังจากการเกิดปฏิกิริยากับน้ำลายที่เจือจางด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:100 (โดยปริมาตร) วัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 400 –800 nm.

ภาคผนวก ข

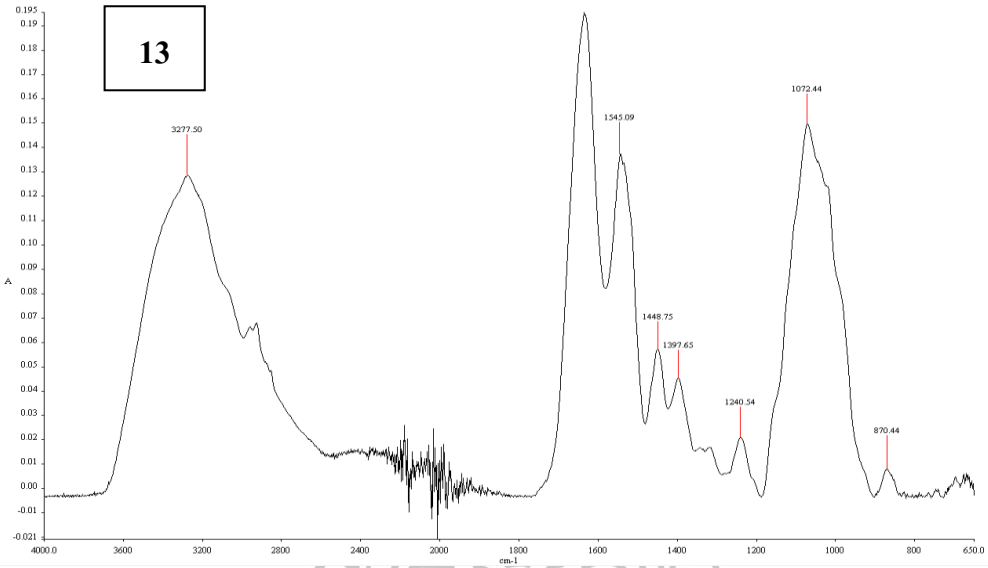
สเปตรัมตัวอย่างน้ำลายวิเคราะห์โดยเทคนิค ATR-FTIR



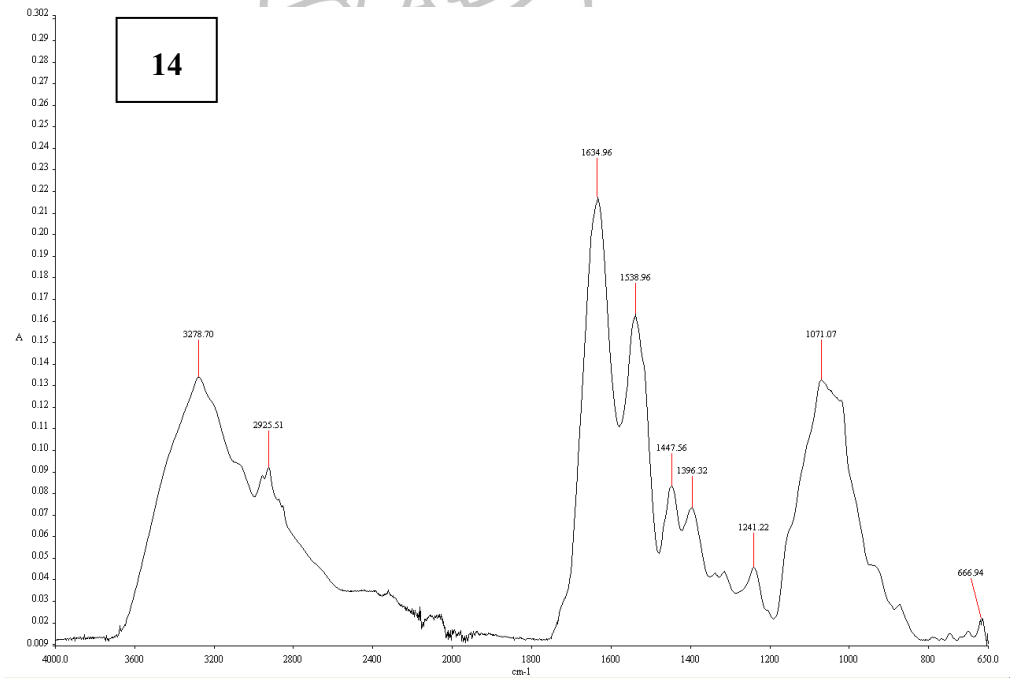
ภาพที่ 11 สเปกตรัมของน้ำลายหยดลงบนกระจกสไลด์ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 6 ชั่วโมง



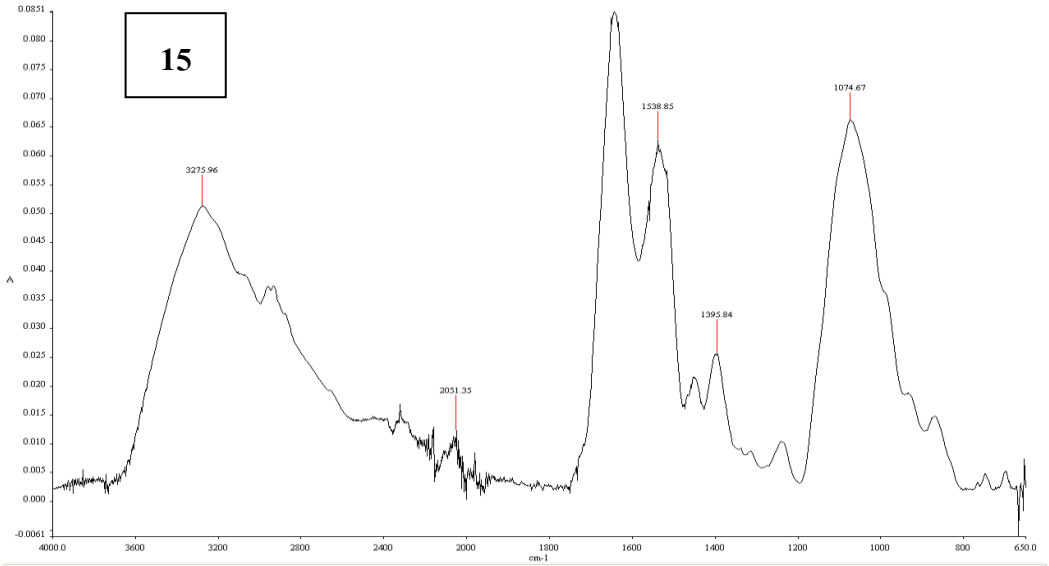
ภาพที่ 12 สเปกตรัมของน้ำลายหยดลงบนกระจกสไลด์ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 12 ชั่วโมง



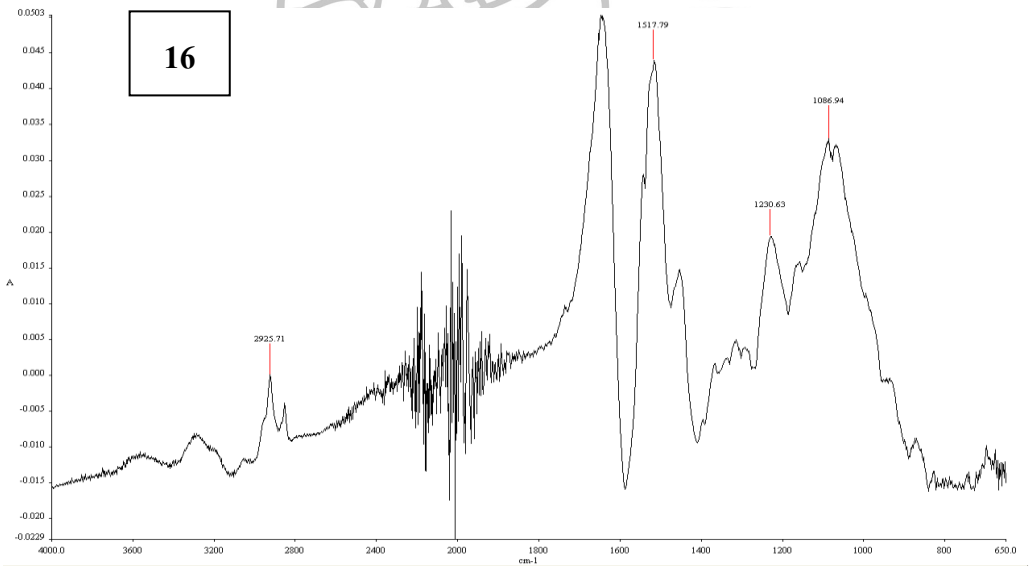
ภาพที่ 13 สเปกตรัมของน้ำลายหยดลงบนกระจกสไลด์ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 วัน



ภาพที่ 14 สเปกตรัมของน้ำลายหยดลงบนกระจกสไลด์ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วัน



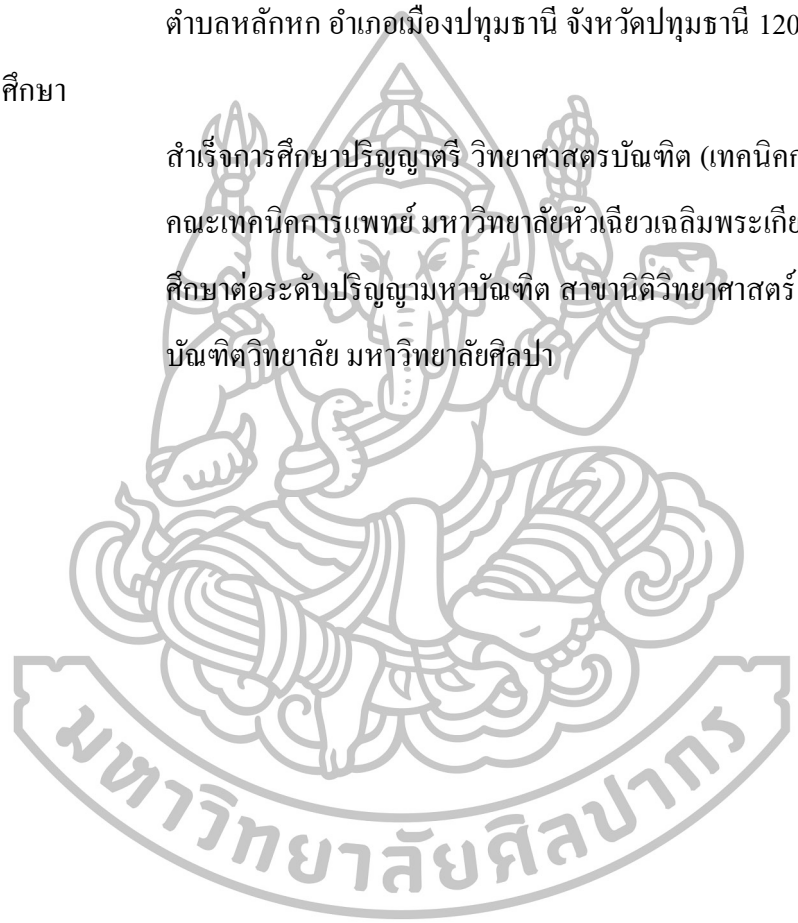
ภาพที่ 15 สเปกตรัมของน้ำลายหยดลงบนกระจกสไลด์ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน



ภาพที่ 16 สเปกตรัมของน้ำลายหยดลงบนกระจกสไลด์ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 14 วัน

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ-ชื่อสกุล	นางสาว กชพร อักษรนำ
ที่อยู่	บ้านเลขที่ 198/103 หมู่บ้านพฤกษาวิลล์ 40 ถนนโลคัลโรด-ดอนเมือง ตำบลหลักหก อำเภอเมืองปทุมธานี จังหวัดปทุมธานี 12000
ประวัติการศึกษา	
พ.ศ. 2552	สำเร็จการศึกษาปริญญาตรี วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคนิคการแพทย์) คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ
พ.ศ. 2555	ศึกษาต่อระดับปริญญามหาบัณฑิต สาขานิติวิทยาศาสตร์ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปา



มหาวิทยาลัยศิลปากร