



การประเมินอายุคราบเลือดจากการวัดค่าสีด้วย Spectrophotometer และด้วยเทคนิค ATR-FTIR



โดย
นางสาวจันทิภา ปาพะภินันท์

โครงงานวิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชานิติวิทยาศาสตร์ แผน ก แบบ ก 2 ระดับปริญญาโท

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

ปีการศึกษา 2564

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยศิลปากร

การประเมินอายุคราบเลือดจากการวัดค่าสีด้วย Spectrophotometer และด้วยเทคนิค
ATR-FTIR



โดย
นางสาวจันทิภา ปาวะภินันท์

โครงงานวิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชานิติวิทยาศาสตร์ แผน ก แบบ ก 2 ระดับปริญญาโทมหาบัณฑิต
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร
ปีการศึกษา 2564
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยศิลปากร

THE AGE ESTIMATION OF THE BLOODSTAINS BY THE COLOR MEASUREMENT
ON SPECTROPHOTOMETER AND ATTENUATED TOTAL REFLECTANCE
FOURIER TRANSFORM INFRARED SPECTROSCOPY (ATR-FTIR) TECHNIQUE.



A Thesis Proposal Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for Master of Science (FORENSIC SCIENCE)
Graduate School, Silpakorn University
Academic Year 2021
Copyright of Silpakorn University

หัวข้อ	การประเมินอายุคราบเลือดจากการวัดค่าสีด้วย Spectrophotometer และด้วยเทคนิค ATR-FTIR
โดย	นางสาวจิณห์นิภา ปาวะภินันท์
สาขาวิชา	นิติวิทยาศาสตร์ แผนก ก แบบ ก 2 ระดับปริญญามหาบัณฑิต
อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก	อาจารย์ ดร. ศิริรัตน์ ชูสกุลเกรียง

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร ได้รับพิจารณาอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

----- คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร.จุไรรัตน์ นันทานิช)

พิจารณาเห็นชอบโดย ----- ประธานกรรมการ
(อาจารย์ ดร. ศุภชัย ศุภลักษณ์นารี)

----- อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
(อาจารย์ ดร. ศิริรัตน์ ชูสกุลเกรียง)

----- ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก
(รองศาสตราจารย์ ดร. ยูภาพร สมิน้อย)

----- ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก
(รองศาสตราจารย์ ดร. ปกรณ์ บวรสมบัติ)

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ.....	จ
สารบัญตาราง.....	ช
สารบัญรูปภาพ.....	ซ
บทที่ 1 บทนำ	10
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	10
วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	12
สมมติฐานของการวิจัย.....	12
ขอบเขตของการวิจัย.....	13
ข้อจำกัดของการวิจัย.....	13
นิยามศัพท์เฉพาะ.....	13
ประโยชน์ที่ได้รับ.....	14
บทที่ 2 วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง.....	15
เลือดและองค์ประกอบของเลือด.....	15
กลไกการเปลี่ยนแปลงของคราบเลือด.....	19
ทฤษฎีการมองเห็นของมนุษย์.....	21
การวิเคราะห์ด้วยเทคนิค ATR-FTIR	25
งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	25
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	29
เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง	29
วัสดุและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง.....	30
ตัวอย่างเลือดที่ใช้ในการทดลอง.....	31

วิธีดำเนินการวิจัย	31
บทที่ 4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล	33
บทที่ 5 สรุปล อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ	43
สรุปล อภิปรายผล	43
ข้อเสนอแนะ	43
รายการอ้างอิง	45
ประวัติผู้เขียน	48



สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 วัสดุและอุปกรณ์ในการทดลอง.....	30
ตารางที่ 2 ค่าเฉลี่ย L^* a^* และ b^* จากการวิเคราะห์หัตถสีด้วย Spectrophotometer	34
ตารางที่ 3 สมการความสัมพันธ์ระหว่างค่า L^* a^* และ b^* กับอายุของคราบเลือด.....	35
ตารางที่ 4 สมการความสัมพันธ์ระหว่างเปลี่ยนแปลงของค่า a^* เทียบกับอายุของคราบเลือด แบ่งเป็น ระยะเวลาช่วง 1-4 ชั่วโมง และระยะเวลาช่วง 5-720 ชั่วโมง ภายหลังจากการหยุดเลือด.....	37
ตารางที่ 5 อายุจริงของคราบเลือดเทียบกับอายุของคราบเลือดอาสาสมัครจำนวน 12 คน ที่ทำนายได้ จากสมการความสัมพันธ์ระหว่างค่า a^* กับอายุของคราบเลือด	39



สารบัญรูปภาพ

	หน้า
ภาพที่ 1 เลือดและองค์ประกอบของเลือด.....	15
ภาพที่ 2 ลักษณะ tetramer มีสายแอลฟา 2 สาย และสายบีต้า 2 สาย ในแต่ละสายมีฮีโมอยู่ภายใน	17
ภาพที่ 3 heme หรือ ferroprotoporphyrin IX type III.....	18
ภาพที่ 4 (a) Hemoglobin reaction kinetics ภายในและภายนอกร่างกาย (b) Oxyhemoglobin Deoxyhemoglobin และ Methemoglobin (c) สเปกตรัมการดูดกลืนแสง ของ Oxyhemoglobin Deoxyhemoglobin และ Methemoglobin เมื่อระยะเวลาผ่านไป	20
ภาพที่ 5 การบรรยายสีในระบบ CIE L*a*b* ซึ่งเป็นการวัดค่าสีโดยใช้ลักษณะของ color space..	24
ภาพที่ 6 เครื่อง Agilent Cary 60 UV-Vis Spectrophotometer บริษัท Agilent Technologies Thailand.....	29
ภาพที่ 7 เครื่อง Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) รุ่น Spectrum 100 บริษัท Perkin Elmer Thailand.....	30
ภาพที่ 8 หน้าต่างแสดงการตั้งสภาวะก่อนการทดลอง และการทำงานของโปรแกรมก่อนวิเคราะห์ค่าสี	32
ภาพที่ 9 หน้าต่างแสดงการตั้งสภาวะก่อนการทดลอง และการตั้งค่าตัวอย่างก่อนทำการวิเคราะห์ สเปกตรัม	32
ภาพที่ 10 (A) ตัวอย่างคราบเลือดที่หยุดเริ่มต้น (B) 1 ชั่วโมง (C) 4 ชั่วโมง (D) 12 ชั่วโมง (E) 24 ชั่วโมงหลังจากการหยุดเลือดโดยถ่ายภาพทันที	33
ภาพที่ 11 ความสัมพันธ์ระหว่างค่า L* (วงกลม) ค่า a* (สามเหลี่ยม) และค่า b* (สี่เหลี่ยม) ของคราบ เลือดกับอายุของคราบเลือด (Hours)	35
ภาพที่ 12 ค่า a* กับอายุของคราบเลือดตั้งแต่เวลา 1 ชั่วโมงถึง 4 ชั่วโมง	36
ภาพที่ 13 ค่า a* กับอายุของคราบเลือดตั้งแต่เวลา 5 ชั่วโมงถึง 720 ชั่วโมง.....	37

ภาพที่ 14 ความสัมพันธ์ระหว่างอายุของคราบเลือดที่ทำนายได้จากสมการกับอายุจริงของคราบเลือด (Hours)..... 41

ภาพที่ 15 สเปกตรัมของคราบเลือดในช่วงเลขคลื่น 4000-600 cm^{-1} 41



บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ในปัจจุบันงานด้านนิติวิทยาศาสตร์ได้นำหลักการทางวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีต่าง ๆ มาใช้กันมากขึ้นตรวจพิสูจน์หลักฐาน ในสถานที่เกิดเหตุอาชญากรรมมักพบพยานหลักฐานทางด้านกายภาพและชีวภาพที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับคดีอาชญากรรม เช่น อุปกรณ์ที่ใช้ในการก่อเหตุ รอยนิ้วมือ ก้นบูทรี เส้นผม และพยานหลักฐานที่พบมากที่สุดและมีความสำคัญอย่างมากในกระบวนการสืบสวน คือ คราบเลือด โดยคราบเลือดในสถานที่เกิดเหตุมักพบเป็นอยู่นอยู่ตามวัตถุต่าง ๆ ฝาผนัง อาวุธ และร่างกายของผู้เสียหายหรือผู้กระทำความผิด ซึ่งลักษณะของเลือดจะติดเป็นหยดหรือคราบแน่นกับวัตถุ ทำให้คราบเลือดเหล่านี้ไปใช้ประโยชน์ในการวิเคราะห์พยานหลักฐานหลายอย่าง เช่น การวิเคราะห์ DNA Profiling เพื่อยืนยันการกระทำผิดของตัวบุคคล การวิเคราะห์รูปแบบการกระจายตัว และระยะเวลาของคราบเลือดเพื่อใช้ในการลำดับเหตุการณ์ที่เกิดขึ้น เห็นได้ว่าประโยชน์ของการประเมินอายุของคราบเลือดร่วมกับพยานหลักฐานอื่น ๆ สามารถนำไปสู่การลำดับของเหตุการณ์ ทั้งนี้เลือดที่เกิดขึ้นจากกลไกการเปลี่ยนแปลงซึ่งมีปัจจัยด้านสภาวะแวดล้อมหลายอย่างที่ทำให้เปลี่ยนแปลงของคราบเลือดต่างกัน ไม่ว่าจะเป็นอุณหภูมิ ความชื้น แสงแดด และองค์ประกอบของเลือดแต่ละบุคคล

กลไกการเปลี่ยนแปลงของคราบเลือด หรือ Hemoglobin reaction kinetics เป็นการเปลี่ยนแปลงของ Hemoglobin ที่ประกอบด้วย ฮาตุเหล็ก และโปรตีน โดย Hemoglobin สามารถเปลี่ยนแปลงรูปแบบภายในร่างกายของมนุษย์ที่เรียกว่า Hemoglobin derivatives ได้ 2 รูปแบบ คือ แบบที่ไม่จับกับออกซิเจน (Deoxyhemoglobin ; Hb) และแบบที่จับกับออกซิเจน

(Oxyhemoglobin ; HbO_2) ซึ่งอยู่ในหลอดเลือดแดงมากถึงร้อยละ 90 และหลอดเลือดดำร้อยละ 70 และมีเพียงร้อยละ 1 ที่เกิด Autoxidized โดยเปลี่ยนไปอยู่ในรูปของ Methemoglobin (MetHb) ซึ่งสามารถถูก Reductase protein cytochrome b5 รีดิวซ์กลับไปเป็น Deoxyhemoglobin ในส่วนภายนอกร่างกายของมนุษย์ Hemoglobin จะเปลี่ยนแปลงเป็น Oxyhemoglobin ทันทีเมื่อสัมผัสกับออกซิเจน อย่างไรก็ตามหากความสามารถของ Cytochrome b5 ที่มีความจำเป็นต่อกระบวนการรีดักชันของ Methemoglobin ลดลง จึงไม่สามารถทำให้ Oxyhemoglobin เปลี่ยนกลับไปเป็น Methemoglobin ได้ และเมื่อเกิด Autoxidation จะทำให้ Hemoglobin เสื่อมสภาพกลายเป็น Hemichrome (HC) ซึ่งจะทำให้สีของคราบเลือดจากสีแดงเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเข้ม (Bergmann et al., 2017)

การวิเคราะห์คราบเลือดในงานด้านนิติวิทยาศาสตร์มีหลายวิธี เช่น การสังเกตด้วยตาเปล่า การส่องกล้องจุลทรรศน์ การตรวจทางเคมี ฟิสิกส์ และชีวเคมี ในการตรวจคราบเลือดมักพบปัญหาหลายด้าน เนื่องจากจำนวนเลือดไม่เพียงพอในการวิเคราะห์ และไม่สามารถแยกได้ว่าคราบเลือดที่พบเกิดก่อนหรือเกิดหลัง ซึ่งยังเป็นปัญหาสำคัญในการตรวจพิสูจน์ทางด้านนิติวิทยาศาสตร์เป็นเวลานาน จึงพยายามค้นหาวิธีการตรวจพิสูจน์คราบเลือดที่น่าเชื่อถือ ถูกต้อง และแม่นยำ โดยมีงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการประเมินอายุคราบเลือดที่ใช้เทคนิคในการวิเคราะห์ที่แตกต่างกันไป เช่น การใช้เทคนิค Reflectance Spectroscopy โดยศึกษา Hemoglobin reaction kinetics เพื่อหาองค์ประกอบของ Hemoglobin และประเมินอายุของคราบเลือด (Bremmer et al., 2011) งานวิจัยที่ศึกษาสเปกตรัมของ Hemoglobin derivatives และเปรียบเทียบกับ Hemoglobin อ้างอิง โดยวัดอายุคราบเลือดมากกว่า 200 วัน โดยมีค่าความคลาดเฉลี่ยร้อยละ 13.4 ของอายุจริง โดยใช้เทคนิค Hyperspectral imaging (Edelman, Van Leeuwen, et al., 2012)

จากงานวิจัยที่กล่าวมาข้างต้นพบว่ามีข้อจำกัดหลายประการ ผู้วิจัยได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับการประเมินอายุของคราบเลือดจากการวัดค่าสีด้วย Spectrophotometer และด้วยเทคนิค ATR-FTIR โดยการประมวลผลค่าสีเป็นตัวเลข ทำให้สามารถบอกความแตกต่างเพียงเล็กน้อยของค่าสีของคราบเลือด เพื่อลดข้อผิดพลาดในการคาดคะเนอายุของคราบเลือดในสถานที่เกิดเหตุอาชญากรรม และยังลดระยะเวลาในการประเมินอายุของคราบเลือด อีกทั้งการศึกษาในครั้งนี้ไม่ทำลายตัวอย่างคราบเลือดบนวัตถุต่าง ๆ ซึ่งสามารถประยุกต์ในงานด้านนิติวิทยาศาสตร์เพื่อให้เกิดประโยชน์และสามารถต่อยอดในงานวิจัยในส่วนอื่น ๆ

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาการใช้เทคนิค Attenuated Total Reflectance Fourier Transform Infrared Spectroscopy (ATR-FTIR) และการวัดสีด้วย Spectrophotometer เพื่อประเมินอายุของคราบเลือด

สมมติฐานของการวิจัย

ความสัมพันธ์ระหว่างค่าสีและองค์ประกอบของคราบเลือดที่วัดได้กับระยะเวลาที่หยดเลือดมีความแปรผันตรงกัน สามารถนำไปใช้ประเมินอายุของคราบเลือดได้

ขอบเขตของการวิจัย

1. ตัวอย่างเลือดที่ศึกษา มาจากธนาคารเลือดโรงพยาบาลนครปฐมที่หมดอายุ และจากอาสาสมัครจำนวน 12 คน เก็บที่อุณหภูมิต่ำ 4 องศาเซลเซียส
2. พื้นผิวที่หยดเป็นผ้าฝ้ายสีขาว
3. หยดเลือดจำนวน 5 หยด ปริมาณ 10 ไมโครลิตร ที่ความสูง 2 เซนติเมตร ต่อ 1 ตัวอย่าง

ข้อจำกัดของการวิจัย

1. ค่าสีของตัวอย่างแต่ละรอบมีค่าต่างกัน เนื่องจากระดับ ของ Hemoglobin ของแต่ละบุคคลแตกต่างกัน ปกติในเพศชายมีระดับของ Hemoglobin อยู่ที่ 14-18 g/dl และในเพศหญิงมีระดับของ Hemoglobin อยู่ที่ 12-16 g/dl ทั้งนี้มีปัจจัยอื่น เช่น เพศ อายุ ความแข็งแรง การสูบบุหรี่ เป็นต้น ซึ่งทำให้เกิดความคลาดเคลื่อนในการประเมินอายุของคราบเลือด
2. ลักษณะในการหยดเลือดและความสูงในการหยดเลือดอาจเกิดการคลาดเคลื่อนเล็กน้อย เนื่องจากการกระจายตัวของหยดเลือดในแต่ละตัวอย่างไม่สามารถกำหนดได้ ทำให้สีของคราบเลือดที่หยดลงบนผ้าฝ้ายไม่สม่ำเสมอ

นิยามศัพท์เฉพาะ

Blood stains หมายถึง คราบเลือดหรือร่องรอยของเลือดในสถานที่เกิดเหตุ ซึ่งมีลักษณะที่แตกต่างกันโดยคราบเลือดมีลักษณะเป็นของเหลวชั้น สีแดง แสดงว่ามีการหลั่งของเลือดได้ไม่นาน หากคราบเลือดมีลักษณะเป็นเกล็ด แข็ง แห้ง สีน้ำตาล แสดงว่ามีการหลั่งของเลือดเป็นระยะเวลาที่

นานมาแล้ว โดยส่วนใหญ่คราบเลือดเหล่านี้จะพบในสถานที่เกิดเหตุ หรือสิ่งของต่าง ๆ เช่น เสื้อผ้า วัตถุพยานต้องสงสัย คนร้าย เป็นต้น

Attenuated Total Reflectance Fourier Transform Infrared Spectroscopy (ATR-FTIR) หมายถึง เทคนิคการวิเคราะห์ตรวจสอบถึงหมู่ฟังก์ชันของโมเลกุลของสาร โดยอาศัยการดูดกลืนช่วงคลื่นอินฟราเรด ซึ่งทำให้พันธะโมเลกุลของเกิดการสั่น

Agilent Cary 60 UV-Vis Spectrophotometer หมายถึง เครื่องมือที่ใช้วิเคราะห์ โดยอาศัยหลักการการสะท้อนแสงของสารในช่วงรังสียูวีและแสงขาวที่ส่องผ่านได้

CIE D65 หมายถึง การวัดค่าสีโดยอาศัยแหล่งกำเนิดแสง เมื่อลำแสงเหล่านั้นส่งออกมา เครื่อง Spectroradiometer จะวัดค่าการกระจายของพลังงานแต่ละความยาวคลื่น

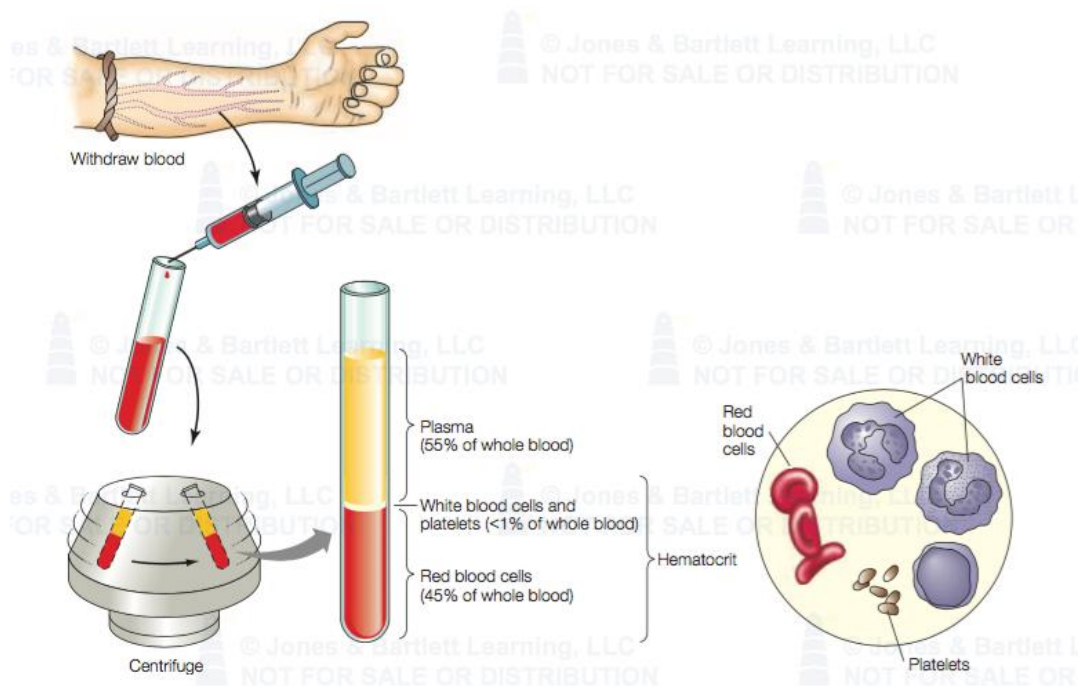
ประโยชน์ที่ได้รับ

1. สามารถวิเคราะห์ค่าสีของคราบเลือดแตกต่างกันเพียงเล็กน้อย ในระยะเวลาการหลังของเลือดที่ใกล้เคียงกัน และนำสมการความสัมพันธ์ที่ได้มาประเมินอายุของคราบเลือด
2. วิเคราะห์ค่าสีด้วย Spectrophotometer และด้วยเทคนิค ATR-FTIR เป็นวิธีการที่ง่าย และใช้ระยะเวลาสั้นจึงช่วยให้นักนิติวิทยาศาสตร์ลดระยะเวลาในการประเมินอายุของคราบเลือด และสามารถประยุกต์ใช้กับวัตถุพยานชนิดอื่น ๆ

บทที่ 2 วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

เลือดและองค์ประกอบของเลือด

เลือดถูกสร้างขึ้นจากเซลล์ ชิ้นส่วนของเซลล์และสารชีวเคมีประกอบด้วยสารอาหาร ออกซิเจน ฮอโรโมน โดยมีหน้าที่กระจายความร้อนไปทั่วร่างกายและรักษาความสมดุลของของเหลว เลือดเป็นเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่มีเซลล์แขวนลอยจึงมีลักษณะคล้ายเจล ซึ่งทำให้เลือดนั้นมีน้ำหนักและมีความข้นหนืดกว่าน้ำ ในร่างกายของมนุษย์มีเลือด 7-8% ของน้ำหนักร่างกาย หรือประมาณ 5-6 ลิตร



ภาพที่ 1 เลือดและองค์ประกอบของเลือด

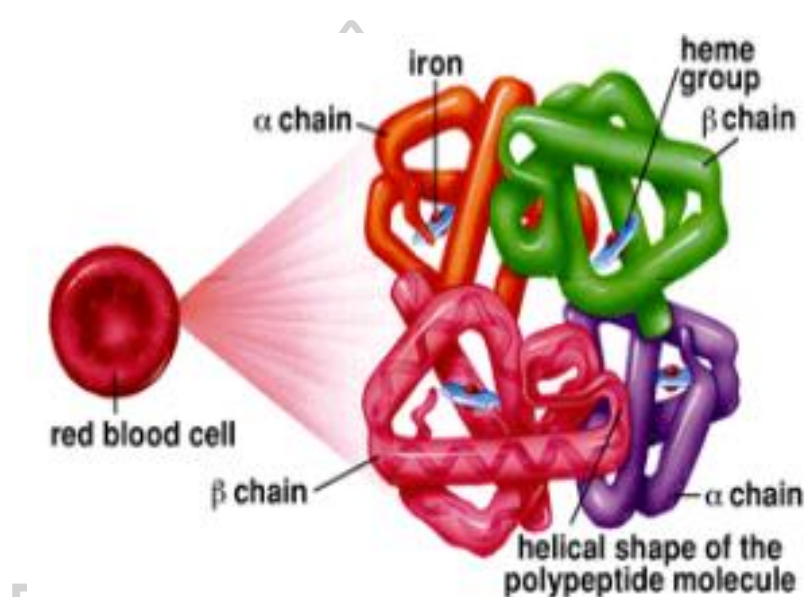
ที่มา Jones and Bartlett Publishers, Introduction Hematology. Hematology2018:53-66

โดยเลือดนั้นมียังประกอบส่วนแรกคือ พลาสมา (plasma) ประมาณ 55% ซึ่งประกอบไปด้วยส่วนที่เป็นน้ำ 93% และเป็นส่วนของ กรดอะมิโน คาร์โบไฮเดรต ลิพิด โปรตีน ฮอร์โมน อิเล็กโทรไลต์ วิตามินและของเสียจากเซลล์ ประมาณ 7% ของน้ำหนักตัวของคน โดยพลาสมามีลักษณะเป็นสีเหลืองใส และในส่วนที่ 2 ประกอบไปด้วยเม็ดเลือดแดง (red blood cells; RBCs) ประมาณ 45% มีลักษณะรูปร่างกลมและมีช่องเว้าตรงกลาง ไม่มีนิวเคลียส รูปร่างของเม็ดเลือดแดงยังช่วยให้เซลล์นั้นสัมผัสกับฮีโมโกลบิน โดยเม็ดเลือดแดงประกอบด้วย ฮีโมโกลบิน 33% จึงทำให้เม็ดสีแดงมีสีแดง เม็ดเลือดขาว (white blood cells; WBCs) ประมาณ 1% ลักษณะรูปร่างกลม เป็นเซลล์ที่มีนิวเคลียส โดยหน้าที่ของเม็ดเลือดขาวนั้นป้องกันร่างกายจากเชื้อโรค เซลล์เม็ดเลือดขาวจะถูกส่งไปยังบริเวณที่มีการติดเชื้อหรือบริเวณที่มีเลือดไหล โดยปกติจะมี WBCs อยู่ 5 ชนิด คือ Neutrophils Eosinophils Basophils Monocytes และ Lymphocytes เกล็ดเลือดหรือ เซลล์พลาสมาของ cytoplasm โดยหน้าที่ของเกล็ดเลือดคือการลดการสูญเสียเลือดจากร่างกายกรณีมีบาดแผล หรือเนื้อเยื่อมีการฉีกขาดพร้อมกับหลอดเลือด โดยปกติแล้วเลือดจะมีการแข็งตัวได้เอง ซึ่งเรียกว่า การแข็งตัวของเลือด (Blood clotting) ซึ่งเป็นการทำงานโดยอัตโนมัติเมื่อเกิดบาดแผล (Jones & Bartlett, 2018)

ฮีโมโกลบิน

ฮีโมโกลบิน (Hemoglobin หรือ Hb) เป็นส่วนประกอบของโปรตีนในเม็ดเลือดแดง 98 % ซึ่งมีหน้าที่สำคัญในการขนส่งออกซิเจน คาร์บอนไดออกไซด์ และควบคุมพีเอชของเลือด Hb เป็นโปรตีนที่ทำให้เลือดมีสีแดง มีรูปร่างลักษณะเป็น tetramer ที่ประกอบด้วย Polypeptide 4 สาย ยึดติดกันด้วย salt bridge โดยในแต่ละสายจะมีฮีโมอยู่ภายใน ซึ่งมีหน้าที่สำคัญในการจับ O₂ ในคนปกติ

Polypeptide 2 คู่แรกจะเป็นชนิดแอลฟาเสมอ ส่วนคู่ที่สองจะเป็นชนิดบีต้าหรือแกมมา หรือเดลต้าก็ได้ เมื่อรวมกันครบ 4 สายแล้ว จะพบชนิดของ Hb ในผู้ใหญ่ปกติได้ 3 แบบ คือ HbA ($\alpha_2\beta_2$) 97%, HbA₂ ($\alpha_2\delta_2$) ไม่เกิน 2.5% และ HbF ($\alpha_2\gamma_2$) น้อยกว่า 1% (วรพรรณ ศิริวัฒนอักษร et al., 2562)

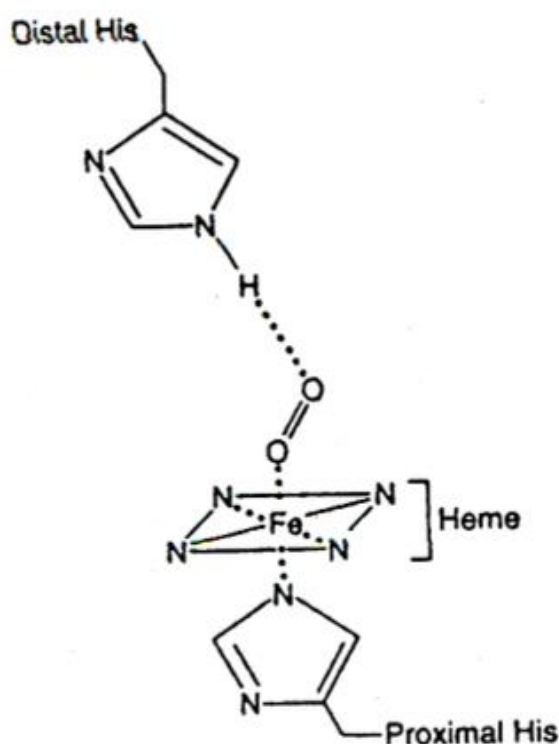


ภาพที่ 2 ลักษณะ tetramer มีสายแอลฟา 2 สาย และสายบีต้า 2 สาย ในแต่ละสายมีฮีมอยู่ภายใน ที่มา วรพรรณ ศิริวัฒนอักษร, ชัชวาล ศรีสวัสดิ์, นิโบล เนื่องตัน, ภัทรบุตร มาครันต, สมทรง เลขะกุล. ชีวเคมีของเลือด. เล่ม 4. กรุงเทพฯ: ภาควิชาเคมี คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล; 2562.

ฮีม (heme)

ฮีม เป็นสารสีแดงที่อยู่ในรูปของ Hb มีหน้าที่จับกับออกซิเจน โดยฮีมมีชื่อเรียกทางเคมีว่า ferroprotoporphyrin IX เพราะมีเหล็กรวมอยู่กับ protoporphyrin ซึ่ง Fe^{2+} ในฮีม จะมี coordinate bonds อยู่ 6 แขน โดยที่ 4 แขนแรกจะแยกไปจับกับไนโตรเจนของ pyrrole rings ทั้ง 4 แขนที่ 5 จะจับกับไนโตรเจนของ imidazole ring ของ histidine ในสายฮีโมโกลบิน ส่วนแขนที่ 6

จะจับกับ O_2 ถ้าหากวาเลนซีของเหล็กเปลี่ยนไปเป็น Fe^{3+} จะจับ O_2 ไม่ได้ ซึ่งอาจจะไปจับกับหมู่ OH^- ได้เป็น hematin หรือจับกับ Cl^- ได้เป็น hemin เฮโมโกลบินที่เหล็กเปลี่ยนเป็น Fe^{3+} มีชื่อเรียกว่า methemoglobin ในภาวะปกติพบได้บ้างจำนวนน้อยไม่เกิน 1.5% ของฮีโมโกลบินทั้งหมด (วรพรรณ ศิริวัฒนอักษร et al., 2562)



ภาพที่ 3 heme หรือ ferroprotoporphyrin IX type III

ที่มา วรพรรณ ศิริวัฒนอักษร, ชัชวาล ศรีสวัสดิ์, นิโบล เนื่องตัน, ภัทรบุตร มาศรันต, สมทรง เลขะกุล. ชีวเคมีของเลือด. เล่ม 4. กรุงเทพฯ: ภาควิชาเคมี คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล; 2562.

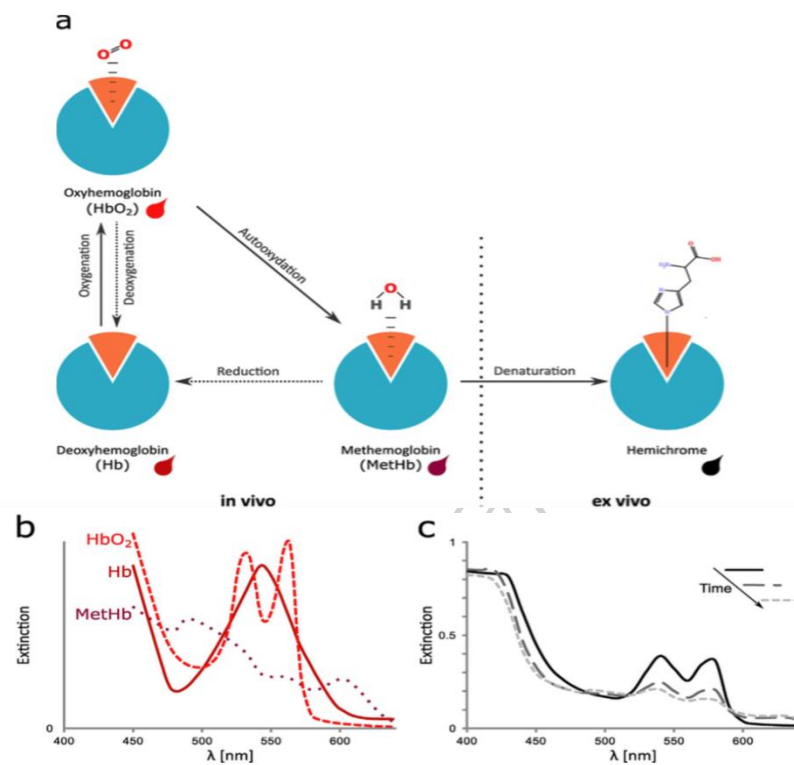
กลไกการเปลี่ยนแปลงของคราบเลือด

คราบเลือดที่พบได้ในที่เกิดเหตุมีความสำคัญอย่างมากในงานด้านนิติวิทยาศาสตร์ ซึ่ง Hemoglobin จะมีการเปลี่ยนแปลงบริเวณองค์ประกอบโปรตีน และธาตุเหล็ก โดย Hemoglobin สามารถเปลี่ยนแปลงรูปแบบหรือที่เรียกว่า Hemoglobin derivatives ได้ 2 แบบ คือ

1. Deoxyhemoglobin (Hb) คือ ไม่จับกับออกซิเจน

2. Oxyhemoglobin (HbO₂) คือ จับกับออกซิเจน

ซึ่งร้อยละ 90 เกิดภายในหลอดเลือดแดง ร้อยละ 70 เกิดในหลอดเลือดดำ และร้อยละ 1 ที่เกิด Autoxidized อยู่ในรูป Methemoglobin (MetHb) ซึ่งถูก Reductase protein cytochrome b5 รีดิวซ์กลับไปอยู่ในรูป Deoxyhemoglobin ภายนอกร่างกายของมนุษย์ Hemoglobin จะเปลี่ยนแปลงเป็น Oxyhemoglobin ทันทีเมื่อสัมผัสกับออกซิเจน อย่างไรก็ตามหากความสามารถของ Cytochrome b5 ที่มีความจำเป็นต่อกระบวนการรีดักชันของ Methemoglobin ลดลง จึงไม่สามารถทำให้ Oxyhemoglobin เปลี่ยนกลับไปเป็น Methemoglobin ได้ และเมื่อเกิด Autoxidation จะทำให้ Hemoglobin เสื่อมสภาพกลายเป็น Hemichrome (HC) (Bergmann et al., 2017) โดยจะเกิดการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างโปรตีน ดังนั้นสีของคราบเลือดจากสีแดงจึงเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเข้ม ซึ่งอัตราการเปลี่ยนแปลงสีของคราบเลือดนั้นขึ้นอยู่กับปัจจัยภายนอก เช่น ความชื้น อุณหภูมิและ พื้นผิว ดังภาพที่ 3



ภาพที่ 4 (a) Hemoglobin reaction kinetics ภายในและภายนอกร่างกาย (b) Oxyhemoglobin Deoxyhemoglobin และ Methemoglobin (c) สเปกตรัมการดูดกลืนแสง ของ Oxyhemoglobin Deoxyhemoglobin และ Methemoglobin เมื่อระยะเวลาผ่านไป

ที่ ม ๑ Bergmann T, Heinke F, Labudde D. Towards substrate-independent age estimation of blood stains based on dimensionality reduction and k-nearest neighbor classification of absorbance spectroscopic data. Forensic Science International 2017;278:1-8.

จากภาพที่ 4 การเปลี่ยนแปลงสเปกตรัมการดูดกลืนแสงของ Oxyhemoglobin Methemoglobin และ Hemichrome มีความสัมพันธ์ระหว่างการดูดกลืนแสงกับระยะเวลาที่ผ่านไป ทำให้สามารถนำสีเลือดมาใช้ในการประเมินอายุคราบเลือด

ทฤษฎีการมองเห็นของมนุษย์

การมองเห็นสีของมนุษย์เกิดจากแสงที่สะท้อนไปยังวัตถุนั้น ๆ มากระทบที่ตาเราและส่งไปสมองเพื่อแปลผลออกมาเป็นสีที่เห็น ดังนั้นในการมองเห็นมีปัจจัยอยู่ 3 อย่างคือ แหล่งกำเนิดแสง วัตถุมีสีและสายตาของมนุษย์ โดยสายตาจะไวต่อแม่สีแสง 3 สีคือ สีแดง สีเขียวและสีน้ำเงิน โดยการมองเห็นด้วยตาสามารถบอกลักษณะของวัตถุได้ 3 ลักษณะคือ

1. สีที่ปรากฏในการมองเห็น เช่น สีแดง สีเขียวหรือสีน้ำเงิน เรียกว่า Hue
2. ความสว่างของสีที่เป็นการสะท้อนของแสงที่มีค่าต่างกันเรียกว่า Lightness
3. ความสดใส ความเข้มและความบริสุทธิ์ของสีเรียกว่า Chroma

สีเป็นสมบัติของแสงที่ใช้อธิบายลักษณะของวัตถุ โดยวัตถุทั่วไปจะมีสีและลักษณะจำเพาะทำให้สีมีบทบาทสำคัญในการแยกแยะความแตกต่างและควบคุมคุณภาพให้ได้มาตรฐานในอุตสาหกรรมด้านสี ด้านอาหารและเครื่องสำอางที่กล่าวข้างต้นการมองเห็นสีจึงมีปัจจัยที่สำคัญ 3 ประการ (ภคินัย ทองทิพย์พร, 2550) ได้แก่

1. แหล่งกำเนิดแสง มาจาก 2 แหล่ง คือ แหล่งกำเนิดแสงจากธรรมชาติ เช่น แสงอาทิตย์ และแหล่งกำเนิดแสงที่ประดิษฐ์ สำหรับแหล่งกำเนิดแสงจากธรรมชาติ ได้แก่ แสงจากดวงอาทิตย์ที่ส่องลงมาพื้นผิวโลก พบว่ามีปัจจัยหลายอย่างที่ทำให้มองเห็นสีที่แตกต่างกัน เช่น การกระจายพลังงาน (Spectral Energy Distribution; SED) แตกต่างกันในแต่ละภูมิภาค สภาพอากาศ และช่วงเวลา แหล่งกำเนิดแสงที่ประดิษฐ์หลายแบบ ได้แก่ หลอดไฟฟลูออโรเรสเซนต์ หลอดไฟทังสเตน หลอดไฟซินอนอาร์ค โดยหลอดไฟซินอนอาร์คมีการกระจายพลังงานอยู่ในช่วงรังสียูวีและอินฟราเรด

2. วัตถุที่มีสี เมื่อแสงจากแหล่งกำเนิดแสงกระทบกับวัตถุที่มีสี จะเกิดการสะท้อนของแสงที่พื้นผิวของวัตถุที่มีความเงามัน เรียกว่า Specular reflection โดยในวัตถุที่มีพื้นผิวไม่เรียบ เรียกว่า Diffuse reflection เนื่องจากแสงที่ตกกระทบเกิดการกระเจิงทำในอนุภาคสีบางช่วงถูกดูดกลืนไว้บางส่วน คลื่นที่สะท้อนออกมาทำให้เกิดสีแตกต่างกัน นอกจากนี้ยังมีการส่องผ่านบนวัตถุโปร่งแสง เรียกว่า Diffuse transmission และการส่องผลบนวัตถุโปร่งใส เรียกว่า Regular transmission

3. ผู้สังเกตการณ์ เป็นสิ่งสุดท้ายที่คลื่นจะสะท้อนเข้าตาผู้สังเกตการณ์ โดยแสงจะเดินทางเข้าสู่เรตินา และถูกแยกจากเซลล์ที่มีความไวต่อแสง 2 ชนิดคือ เซลล์รูปแท่ง (rods cell) ที่บ่งบอกถึงความสว่างและความมืด และเซลล์รูปกรวย (cones cell) เป็นส่วนที่บ่งบอกความแตกต่างของสีคือ สีแดง สีเขียว และสีน้ำเงิน

การวิเคราะห์ด้วยเทคนิค CIE L*a*b* Color Spectrophotometer

เมื่อแสงกระทบวัตถุทำให้เกิดการดูดกลืนแสง การกระจาย หรือการสะท้อนกลับ โดยแสงสามารถนำมาตรวจสอบเกี่ยวกับนิวเคลียส อะตอม ไอออน โมเลกุล ซึ่งพลังงานที่เปลี่ยนไป เกิดอิมิสชัน (Emission) การดูดกลืน (Absorption) การกระเจิง (Scattering) ของแสง ในธรรมชาติสสารจะดูดกลืนแสงรังสีหรือแสงได้ แตกต่างกันทำให้ (นันทภัทร์ ทิมอรรถ, 2559) วัตถุเหล่านี้มีสีต่างกันไปด้วย นักวิทยาศาสตร์จึงนำสมบัติเหล่านี้มาใช้ในการวิเคราะห์ โดยการกำหนดมาตรฐานค่าของสีให้เป็นสากล คือ Commission International de l'Eclairage (CIE) หรือในชื่อภาษาอังกฤษคือ International Commission on Illumination (เจริญชัย เหลืองอ่อน, 2553) เพื่อสะดวกในการเปรียบเทียบ และอ้างอิง ซึ่งวิธีนี้เป็นที่ยอมรับอย่างกว้างขวางของนักวิชาการและนักวิจัย โดยระบบ CIE เป็นการพัฒนาระบบของการวัดสีในรูปของ Objective โดยไม่พึ่งประสบการณ์ ความคิดของบุคคลใด ๆ ทั้งสิ้น

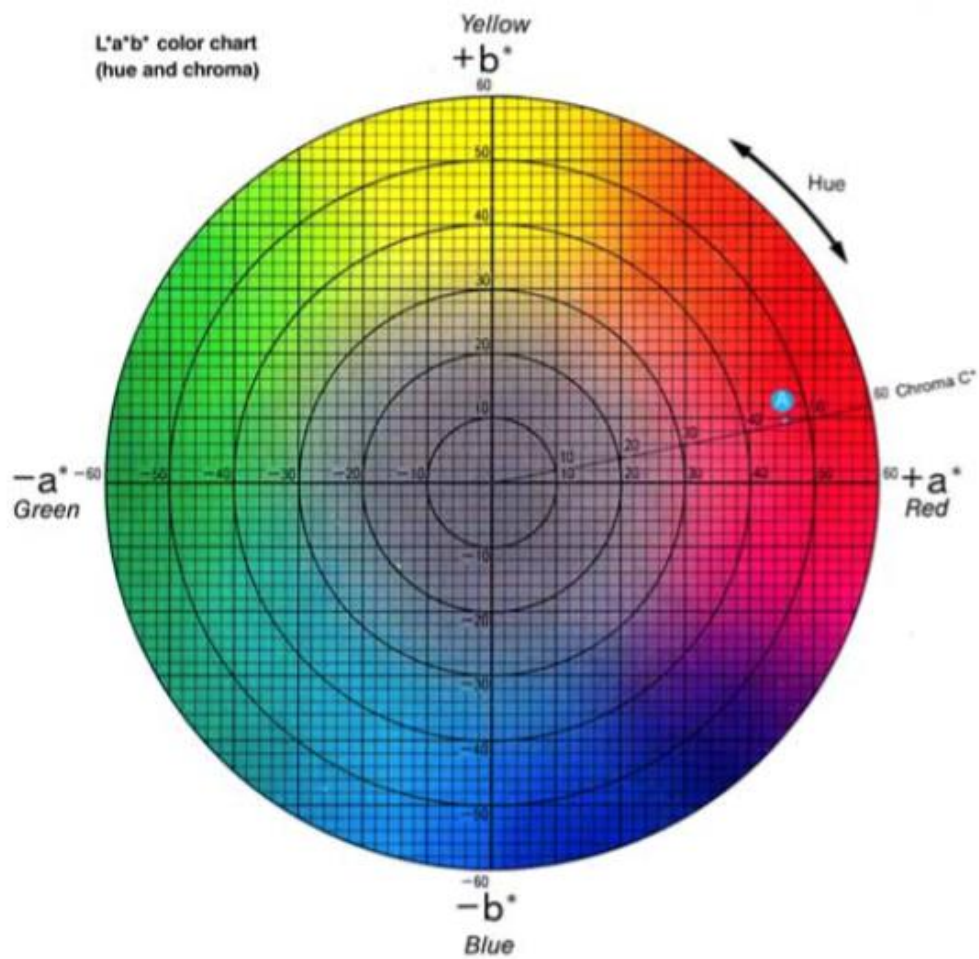
แหล่งกำเนิดแสง

การมองเห็นสีของวัตถุที่เกิดจากแหล่งกำเนิดแสงวัตถุที่มีสีและสายตามนุษย์ถ้าเราสามารถวัดออกมาเป็นตัวเลขได้ก็สามารถวัดค่าสีออกมาเป็นตัวเลขได้ ดังนั้นการวัดค่าสีจะต้องอาศัยแหล่งกำเนิดแสง ที่ส่งออกมาเครื่อง Spectrophotometer และวัดค่าการกระจายของพลังงานแต่ละความยาวคลื่นจึงทำให้มองเห็นสีที่ต่างกัน โดยกำหนดแหล่งกำเนิดแสงขึ้น 4 แหล่ง (ภักคณัย ทองทิพย์พร, 2550) คือ

1. แหล่งแสงประดิษฐ์ A เป็นแหล่งกำเนิดแสงที่ให้พลังงานใกล้เคียงกับหลอดไฟทั้งสแตนด์
2. แหล่งแสงประดิษฐ์ B เป็นแหล่งกำเนิดแสงที่ได้จาก แหล่งแสงประดิษฐ์ A ที่ผ่านตัวกรองแสง ซึ่งมีความละเอียดอุณหภูมิสีประมาณ 4900
3. แหล่งแสงประดิษฐ์ C เป็นแหล่งกำเนิดแสงที่ได้จาก แหล่งแสงประดิษฐ์ A ที่ผ่านตัวกรองแสง ซึ่งมีความละเอียดอุณหภูมิสีประมาณ 6700 K
4. แหล่งแสงประดิษฐ์ D เป็นแหล่งกำเนิดแสงที่ใช้แทนแสงแดด มีความละเอียดอุณหภูมิสีที่ต่างกัน โดยในงานวิจัยส่วนใหญ่ใช้แหล่งกำเนิดแสง D_{65} ในการวัด มีความละเอียดอุณหภูมิสีประมาณ 6500 K

วัตถุที่มีสี

โดยเครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์ คือเครื่อง Spectrophotometer ซึ่งวัดค่าสีและวิเคราะห์เป็นตัวเลข โดยวัดจากปริมาณลำแสงที่สะท้อนไปยังวัตถุเทียบกับมาตรฐานอ้างอิงที่เป็น reflectance curve โดยสามารถบอกความแตกต่างของสีในวัตถุแต่ละชนิด ซึ่ง CIE จึงพัฒนาเทคนิคให้เป็นที่ยอมรับกันอย่างแพร่หลาย คือ ระบบ CIE Lab scale หรือ $L^*a^*b^*$ ซึ่งเป็นการวัดค่าสีโดยใช้ลักษณะของ color space



ภาพที่ 5 การบรรยายสีในระบบ CIE $L^*a^*b^*$ ซึ่งเป็นการวัดค่าสีโดยใช้ลักษณะของ color space ที่มา ภัคณัย ทองท้อพิมพ์. การมองเห็นและการวัดสี. กรมวิทยาศาสตร์บริการ, 2550.

ซึ่งระบบ CIE $L^*a^*b^*$ จะบรรยายสีแบบ 3 มิติ โดยกำหนดค่าในแต่ละแกนดังนี้

L^* จะบ่งบอกความสว่าง (lightness) ถึงสีดำ มีค่าอยู่ในช่วง 0-100

a^* จะบ่งบอกความเป็นสีเขียว $-a^*$ และความเป็นสีแดง $+a^*$

b^* จะบ่งบอกความเป็นสีน้ำเงิน $-b^*$ จนถึงความเป็นสีเหลือง $+b^*$

การวิเคราะห์ด้วยเทคนิค ATR-FTIR

Infrared Spectroscopy เป็นเทคนิคที่มีความรวดเร็วและมีประสิทธิภาพ โดยใช้ความยาวคลื่นช่วง Infrared ในสเปกตรัมของรังสีแม่เหล็กไฟฟ้า $4000-650\text{ cm}^{-1}$ เทคนิคนี้จึงเป็นการวิเคราะห์ตรวจสอบถึงหมู่ฟังก์ชันของโมเลกุลของสารที่ต้องการศึกษา ซึ่งทำให้พันธะโมเลกุลของเกิดการสั่น จากนั้นเกิดการหักเหขึ้นภายในระหว่างตัวอย่าง กับ crystal ถ้ามุมของแสงตกกระทบมีค่าน้อยกว่า 90 องศา แสงจะเดินทางทะลุเข้าผิวตัวอย่างไม่กี่ไมโครเมตรและแสงส่วนที่เหลือจากการถูกดูดกลืน จะเกิดการสะท้อนเข้าสู่ที่ตรวจวัด และเกิดที่เลขคลื่นแบบสุ่ม ทำให้สัญญาณของพีคแท้ถูกย่ำหลาย ๆ ครั้ง แต่สัญญาณของคลื่นรบกวนถูกหักล้างออกไป ดังนั้น ทำให้ได้ IR สเปกตรัมที่ชัดเจนและใช้สารตัวอย่างเพียงเล็กน้อย และได้สเปกตรัมที่มีคุณภาพดีพอกับใช้สารตัวอย่างประมาณ 10 มิลลิกรัม (นันทภัทร์ ทิมอรรถ, 2559) โดยโมเลกุลต่างชนิดจะดูดกลืนรังสีอินฟราเรดที่ช่วงคลื่นต่างกัน ทำให้สเปกตรัมที่ได้ต่างกัน ดังนั้นอินฟราเรดสเปกตรัมจึงสามารถบอกได้ว่าโมเลกุลของสารที่ทดสอบ นั้นมีหมู่ฟังก์ชันที่สำคัญอะไรบ้าง

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Tommy Bergmann และคณะ ได้ศึกษาวิธีการประเมินอายุคราบเลือดโดยใช้เทคนิค Spectroscopy ช่วงความยาวคลื่น $600-460\text{ nm}$ โดยศึกษาสเปกตรัมของคราบเลือดสุกรที่มีอายุแตกต่างกัน 72 ตัว บนพื้นผิวพื้นผิวที่แตกต่างกันคือ ผ้าฝ้าย โพลีเอสเตอร์ และแก้ว ผลการศึกษาชี้ให้เห็นว่าข้อมูลที่ได้จากใช้เทคนิค Spectroscopy เพื่อประเมินอายุได้จากพื้นผิวที่แห้ง ข้อมูลในการศึกษานี้ได้มาภายใต้สภาวะห้องปฏิบัติการ โดยการศึกษาในอนาคตจึงต้องพิจารณาสภาพแวดล้อมเพื่อประเมินความสามารถในการใช้กับสถานที่เกิดเหตุอาชญากรรม (Bergmann et al., 2017)

Rolf H. Bremmer และคณะ ใช้เทคนิค Reflectance spectroscopy เพื่อศึกษาประมาณ Hemoglobin derivative บนผ้าฝ้ายสีขาวย โดยศึกษาสเปกตรัมของ Oxyhemoglobin Methemoglobin และ Hemichrome ในคราบเลือดในระยะเวลาที่ผ่านไป พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงของ Hemoglobin derivative เมื่อนำ Hemoglobin fraction ทั้ง 3 ชนิดมาเปรียบเทียบกับระยะเวลา พบว่า Oxyhemoglobin ลดลง และในส่วนของ Methemoglobin และ Hemichrome เพิ่มขึ้น และนำมาประเมินอายุของคราบเลือดสามารถทำได้อายุได้ใกล้เคียงกับระยะเวลาจริง ซึ่งเมื่อระยะเวลามากขึ้นทำความผิดพลาดในการประเมินอายุของคราบเลือดเพิ่มขึ้น (Bremmer et al., 2011)

Gerda Edelman และคณะ ใช้เทคนิค Reflectance spectroscopy เพื่อศึกษา Visible reflectance spectrum ของคราบเลือดที่เรียกว่า Hypercube พบว่า Hypercube จากเลือดที่หยดใหม่กับคราบเลือดเก่า มีค่า Reflectance ที่แตกต่างกัน นอกจากนี้ทำการศึกษา Hemoglobin reaction kinetics ระยะเวลา 200 วัน พบว่า Oxyhemoglobin ลดลงเมื่อระยะเวลาผ่านไป ในส่วนของ Methemoglobin เพิ่มขึ้นในช่วง 3 สัปดาห์แรกจากนั้นจะค่อย ๆ ลดลง ขณะที่ Hemichrome เพิ่มขึ้น ซึ่งจากการเทียบกับข้อมูลอ้างอิง การทดลองแสดงให้เห็นว่าความคลาดเคลื่อนในการประเมินอายุของคราบเลือดอยู่ที่ 13.4% ของระยะเวลาที่แท้จริง (Edelman, Van Leeuwen, et al., 2012)

Gerda Edelman และคณะ ใช้เทคนิค Near infrared (NIR) spectroscopy เพื่อพิสูจน์เอกลักษณ์และประเมินอายุของคราบรอยเลือด นอกจากนี้ได้ศึกษาความจำเพาะและความเร็วในการแยกแยะระหว่างตัวอย่างคราบเลือดจริงที่เป็นเลือดจริงกับตัวอย่างที่ไม่ใช่คราบเลือด สำหรับการทดลองเมื่อนำผ้าฝ้ายสีต่าง ๆ มาวิเคราะห์การดูดกลืนแสงพบว่าผ้าฝ้ายสีขาวยไม่ดูดกลืนแสงในช่วงที่ ในส่วนผ้าฝ้ายสีอื่นมีการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นต่างกัน และเมื่อทำการประเมินอายุคราบเลือด พบว่า

เมื่อระยะเวลาผ่านไปมากขึ้นค่าความคลาดเคลื่อนจะมากขึ้นตามไปด้วย (Edelman, Manti, et al., 2012)

Bo Li และคณะ ใช้เทคนิค Visible wavelength hyperspectral image ใช้ในการประเมินอายุคราบเลือดระยะเวลา 30 ได้นำการถ่ายภาพมาประยุกต์ใช้กับความยาวคลื่นที่ตามองเห็น พบว่าอายุคราบเลือดระยะเวลา 7 วันแรก มีค่าความคลาดเคลื่อนเฉลี่ย ± 0.27 วัน และอายุคราบเลือดระยะเวลา 30 วัน มีค่าความคลาดเคลื่อนเฉลี่ย ± 1.17 นอกจากนี้ยังทำการศึกษาอายุคราบเลือดที่น้อยกว่าหนึ่งวัน มีค่าความคลาดเคลื่อนเฉลี่ย ± 0.09 ชั่วโมง ซึ่งการใช้เทคนิคมีประสิทธิภาพอย่างมากในระยะเวลา 7 วันแรก (Li et al., 2013)

ภัทรธิป เลหาบุตร และคณะ ใช้เทคนิคการวิเคราะห์ภาพเพื่อประเมินอายุของคราบเลือดบนผ้าฝ้ายสีขาว สำหรับวิธีการทดลองทำได้โดยนำค่าสีที่ได้การเทคนิคการวิเคราะห์ภาพ และวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม MATLAB จากเลือดจำนวน 3 ตัวอย่าง จากนั้นได้สร้างสมการที่จะถูกนำมาใช้ในการทำนายอายุของคราบเลือด ซึ่งมีการทดสอบสมการโดยนำเอาเลือดจำนวน 15 ตัวอย่าง มาทดสอบกราฟมาตรฐาน และสมการเส้นตรงที่ได้จากกราฟมาตรฐาน ผลการทดลองพบว่านำอายุที่ทำนายของคราบเลือดกับอายุของคราบเลือดที่แท้จริงมาหาความสัมพันธ์ ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ที่ได้ คือ 0.9659 ผลการศึกษาเทคนิคการวิเคราะห์ภาพ แสดงให้เห็นว่าอาจใช้ในการประมาณอายุของคราบเลือดที่หยดลงบนผ้าฝ้ายสีขาวได้และ เป็นวิธีการที่เหมาะสมกับอายุของตัวอย่างเลือดในช่วง 1 ถึง 48 ชั่วโมง (ภัทรธิป เลหาบุตร, 2559)

อาภา อิมสิน และคณะ ใช้เทคนิค ATR-FTIR Spectroscopy เพื่อตรวจวิเคราะห์คราบอสุจิบนพื้นผิว 3 ชนิด คือ กระจกเบี่ยงผิวขรุขระ สาลีพันก้าน และผ้าชนิดต่าง ๆ จากสเปกตรัมของคราบอสุจิที่ได้มาจากกระจกเบี่ยงที่ทำการวิเคราะห์แสดงพีคที่มีความเด่นชัดของ amide I และ amide II

อย่างไรก็ตามสเปกตรัมของคราบอสุจินก้านพันสำลีและผ้าฝ้ายชนิดต่าง ๆ แสดงให้เห็นแค่กลุ่มของพีค amide เท่านั้น บริเวณตำแหน่งที่ 1700 cm^{-1} และ 1480 cm^{-1} และพีคของหมู่ฟอสเฟตช่วง $1245\text{--}1080\text{ cm}^{-1}$ ในขณะที่พีคของหมู่ฟอสเฟตถูกพีคของ C-O ซึ่งมาจากสาลิพันก้านและผ้าดบัง แต่เมื่อใช้สามารถในวิธีการดำเนินการของเครื่องมือในการลบสเปกตรัมที่บังของผ้าเพื่อที่จะให้สามารถเห็นพีคของ amide ของคราบอสุจินผ้าได้ จากการศึกษาพบว่าเทคนิค ATR-FTIR สามารถใช้ตรวจวิเคราะห์พีค amide ของคราบอสุจิที่เก็บไว้บนตัวอย่างได้ระยะเวลา 30 วัน (อาภา อิมสิน, 2559)



บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาการใช้เทคนิค Attenuated Total Reflectance Fourier Transform Infrared Spectroscopy (ATR-FTIR) และการวัดสีด้วย Spectrophotometer เพื่อประเมินอายุของคราบเลือดในการทดลองเตรียมตัวอย่างโดยการหยดเลือดลงบนผ้าฝ้ายสีขาวโดยเก็บช่วงระยะเวลาต่างกัน จากนั้นตรวจสอบคราบเลือดจาก mid-infrared spectra นอกจากนี้ได้ทำการวิเคราะห์สีของคราบเลือด เพื่อนำข้อมูลมาสร้างกราฟมาตรฐานค่าสีของคราบเลือดกับอายุคราบเลือด และนำเสนอการความสัมพันธ์มาใช้ในการประมาณอายุของคราบเลือด

เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

1. เครื่อง Agilent Cary 60 UV-Vis Spectrophotometer บริษัท Agilent Technologies Thailand



ภาพที่ 6 เครื่อง Agilent Cary 60 UV-Vis Spectrophotometer บริษัท Agilent Technologies Thailand

2. เครื่อง Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) รุ่น Spectrum 100
บริษัท Perkin Elmer Thailand



ภาพที่ 7 เครื่อง Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) รุ่น Spectrum 100 บริษัท Perkin Elmer Thailand

วัสดุและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

ตารางที่ 1 วัสดุและอุปกรณ์ในการทดลอง

วัสดุและอุปกรณ์	แหล่งผลิต
ขวด Vial ขนาด 10 มิลลิลิตร	ยี่ห้อ Berlin/Germany
Micropipette ขนาด 100 ไมโครลิตร	Pipette BLUE
Tip sterile	Pipette BLUE
ผ้าฝ้ายสีขาว	ร้านขายผ้า จังหวัดกรุงเทพมหานคร
ตะแกรงพลาสติก	ร้าน 20 บาท จังหวัดกรุงเทพมหานคร
คลิปหนีบกระดาษขนาดกลาง	ร้าน 20 บาท จังหวัดกรุงเทพมหานคร

ตัวอย่างเลือดที่ใช้ในการทดลอง

ตัวอย่างเลือดจากธนาคารเลือดโรงพยาบาลนครปฐมที่หมดอายุ และจากอาสาสมัครจำนวน 12 คน เก็บที่อุณหภูมิต่ำ 4 องศาเซลเซียส

วิธีดำเนินการวิจัย

1. จัดเก็บตัวอย่างเลือด

ตัวอย่างเลือดมาจากธนาคารเลือดโรงพยาบาลนครปฐมที่หมดอายุและตัวอย่างจากอาสาสมัครจำนวน 12 คน ใส่ลงในขวด Vial ขนาด 10 มิลลิลิตร เก็บที่รักษาที่อุณหภูมิต่ำ 4 องศาเซลเซียส

2. การเตรียมตัวอย่างเลือด

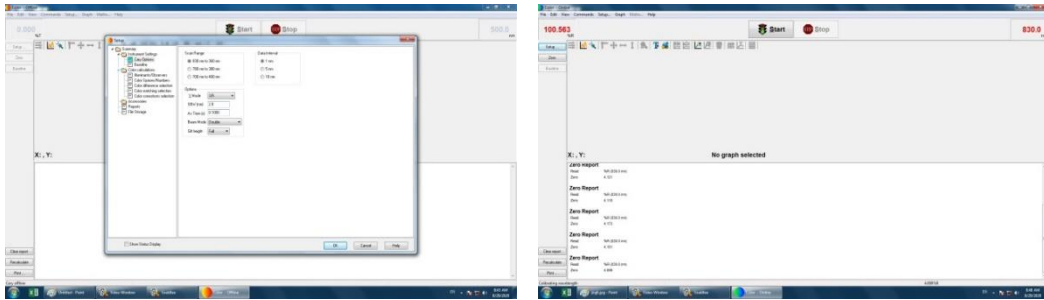
2.1 นำผ้าฝ้ายสีขาวซึ่งกับตะกร้าพลาสติก จากนั้นนำคลิปหนีบกระดาษยึดผ้าฝ้ายสีขาว

2.2 นำตัวอย่างเลือดหยดลงบนผ้าฝ้ายสีขาว ปริมาณ 10 ไมโครลิตร ความสูง 2 เซนติเมตร วิเคราะห์ค่าสีที่ช่วงเวลาต่าง ๆ รวมระยะเวลา 720 ชั่วโมง โดยเก็บตัวอย่างเลือด ระยะเวลา 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 12, 18, 24, 30, 36, 42, 48, 72, 96, 120, 144, 366, 504, 672 และ 720 ชั่วโมง ภายหลังการหยด

3. การวิเคราะห์ตัวอย่างเลือด

3.1 การวิเคราะห์ค่าสีด้วย Spectrophotometer

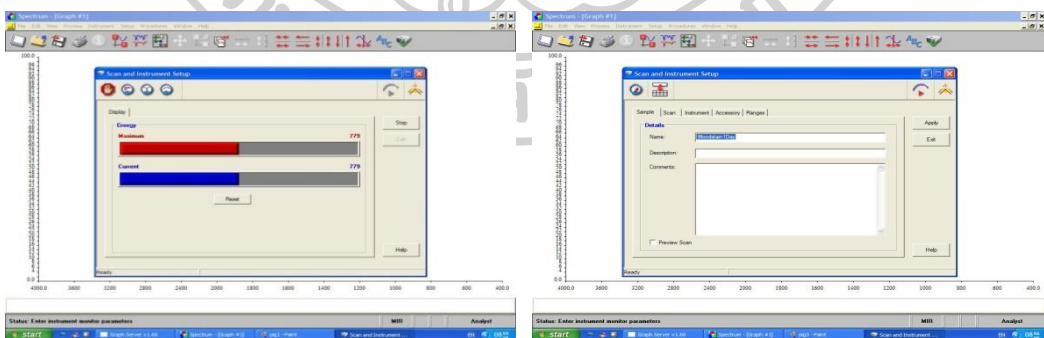
3.1.1 ทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Agilent Cary 60 UV-Vis Spectrophotometer จากบริษัท Agilent Technologies Thailand โดยตั้งสภาวะการทดลองดังนี้ scan range ช่วง 830-360 นาโนเมตร Illuminants เป็น CIE D65 และ Color Spaces เป็น CIE L*a*b* นำค่าสีที่ได้สร้างกราฟมาตรฐาน และนำสมการความสัมพันธ์ระหว่างค่า a* กับอายุของคราบเลือด มาทำนายอายุของตัวอย่างคราบเลือดอาสาสมัคร 12 คน



ภาพที่ 8 หน้าต่างแสดงการตั้งสภาวะก่อนการทดลอง และการทำงานของโปรแกรมก่อนวิเคราะห์ค่า

3.2 การวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Attenuated Total Reflectance Fourier Transform Infrared Spectroscopy (ATR-FTIR)

3.2.1 ทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Attenuated Total Reflection Fourier Transform Infrared Spectroscopy (ATR-FTIR) จากบริษัท Perkin Elmer รุ่น Spectrum 100 FTIR system Universal โดยตั้งสภาวะการทดลองดังนี้ scan range ในช่วง $4000-650\text{ cm}^{-1}$ จำนวนสแกน 16 ครั้ง มี Resolution เท่ากับ 4 cm^{-1} นำสเปกตรัมที่ได้วิเคราะห์หองค์ประกอบ

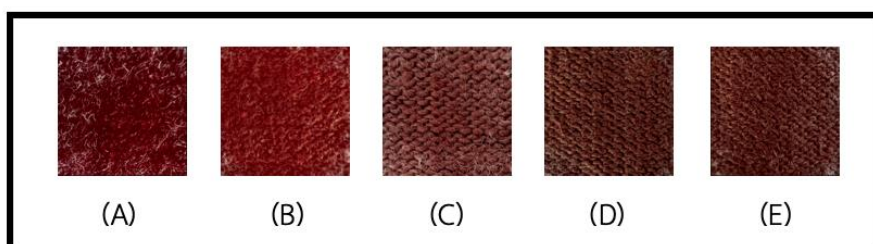


ภาพที่ 9 หน้าต่างแสดงการตั้งสภาวะก่อนการทดลอง และ การตั้งค่าตัวอย่างก่อนทำการวิเคราะห์สเปกตรัม

บทที่ 4

ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

งานวิจัยนี้เป็นศึกษาการวัดสีด้วย Spectrophotometer เพื่อประเมินอายุของคราบเลือดในการทดลองเตรียมตัวอย่างโดยการหยดเลือดลงบนผ้าฝ้ายสีขาวและเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องช่วงเวลาต่างกัน จากนั้นนำข้อมูลมาสร้างกราฟมาตรฐานค่าสีของคราบเลือดกับอายุคราบเลือด นำสมการทั้งสองสมการที่ได้จากกราฟมาตรฐานมาใช้ประเมินอายุของคราบเลือดจากตัวอย่างเลือด 12 ตัวอย่างจากการทดลองภาพที่ 10 เป็นตัวอย่างคราบเลือดที่ทำการหยดลงบนผ้าฝ้ายสีขาวที่ช่วงเวลาต่างกัน พบว่าคราบเลือดที่หยดลงบนผ้าฝ้ายสีขาวมีการเปลี่ยนแปลงของลักษณะของสีและคราบเลือดเมื่อระยะเวลาผ่านไป



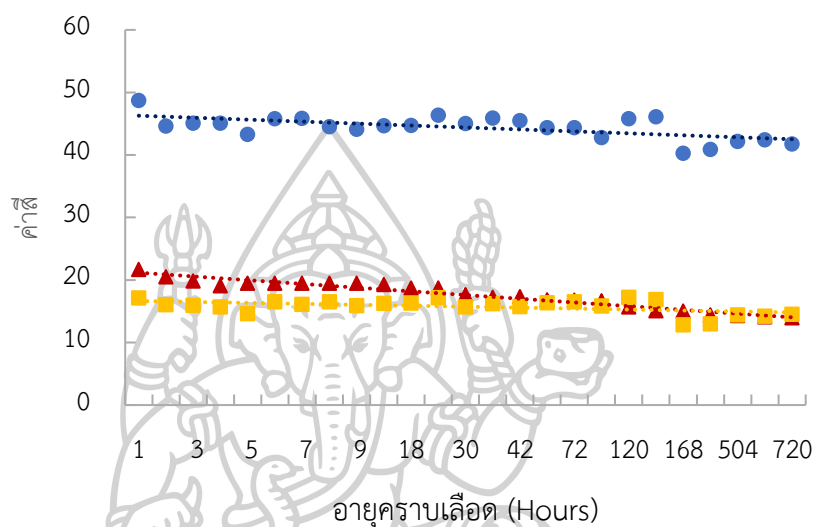
ภาพที่ 10 (A) ตัวอย่างคราบเลือดที่หยดเริ่มต้น (B) 1 ชั่วโมง (C) 4 ชั่วโมง (D) 12 ชั่วโมง (E) 24 ชั่วโมงหลังจากการหยดเลือดโดยถ่ายภาพทันที

จากภาพที่ 10 ซึ่งภายหลังจากหยดเลือดไป 4 ชั่วโมง ไม่สามารถสังเกตการเปลี่ยนแปลงของสีได้ด้วยตาเปล่า จึงนำคราบเลือดในช่วงระยะเวลาต่าง ๆ ที่หยดบนผ้าฝ้ายสีขาวไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Agilent Cary 60 UV-Vis Spectrophotometer โดยการวัดค่า L^* a^* และ b^* เพื่อนำมาสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า L^* a^* และค่า b^* ของคราบเลือดกับอายุของคราบเลือด (ภาพที่

ตารางที่ 2 ค่าเฉลี่ย L^* , a^* และ b^* จากการวิเคราะห์หัตถสีด้วย Spectrophotometer

อายุคราบ เลือด	ค่า L^* เฉลี่ย	ค่า S.D. (L^*)	ค่า a^* เฉลี่ย	ค่า S.D. (a^*)	ค่า b^* เฉลี่ย	ค่า S.D. (b^*)
ชั่วโมงที่ 1	48.6950	0.5311	21.6917	1.0149	17.1297	1.0088
ชั่วโมงที่ 2	44.5822	0.1446	20.5197	0.0638	16.0307	0.1614
ชั่วโมงที่ 3	45.0522	1.7101	19.8399	0.2650	15.9613	0.0300
ชั่วโมงที่ 4	45.0421	0.8612	19.3797	0.4081	15.6792	0.5844
ชั่วโมงที่ 5	43.2937	0.5190	19.4708	1.0845	14.6007	0.7693
ชั่วโมงที่ 6	45.7799	0.3374	19.4494	0.3069	16.5237	0.7348
ชั่วโมงที่ 7	45.8304	1.1783	19.4510	0.6020	16.0748	0.4413
ชั่วโมงที่ 8	44.6161	2.2345	19.3376	0.0609	16.5252	0.9151
ชั่วโมงที่ 9	44.1136	1.4093	19.4532	0.8503	16.1587	1.1493
ชั่วโมงที่ 12	44.2474	0.7558	19.0816	1.5258	15.8743	0.6962
ชั่วโมงที่ 18	45.1788	0.2813	18.9320	0.5861	16.5883	0.6705
ชั่วโมงที่ 24	46.3281	0.4434	18.7025	0.8352	17.1462	0.4482
ชั่วโมงที่ 30	45.0269	0.6248	17.6303	0.1164	15.6887	0.0482
ชั่วโมงที่ 36	45.9031	1.1662	17.1972	1.2143	16.1744	1.1263
ชั่วโมงที่ 42	45.4839	2.0469	17.2985	0.4379	15.7624	0.4680
ชั่วโมงที่ 48	44.3563	0.3837	16.8361	0.5074	16.3639	0.3376
ชั่วโมงที่ 72	44.3499	2.2532	16.7366	0.1718	16.4851	0.9777
ชั่วโมงที่ 96	42.7798	0.1230	16.6530	0.2348	15.8595	0.0682
ชั่วโมงที่ 120	45.7935	0.4693	15.7056	0.2138	17.2064	0.3052
ชั่วโมงที่ 144	46.0651	0.7007	15.0516	0.1180	16.8519	0.0601
ชั่วโมงที่ 168	40.2589	0.3559	14.9982	0.6590	12.8199	0.4375
ชั่วโมงที่ 336	40.8780	0.3198	14.3861	1.0866	12.9634	0.6598

ชั่วโมงที่ 504	42.1605	0.8651	14.2880	0.0165	14.4099	0.4039
ชั่วโมงที่ 672	42.3789	1.8402	14.1194	0.4979	14.1963	0.7219
ชั่วโมงที่ 720	41.7486	1.3398	13.9475	1.6127	14.5098	1.5197



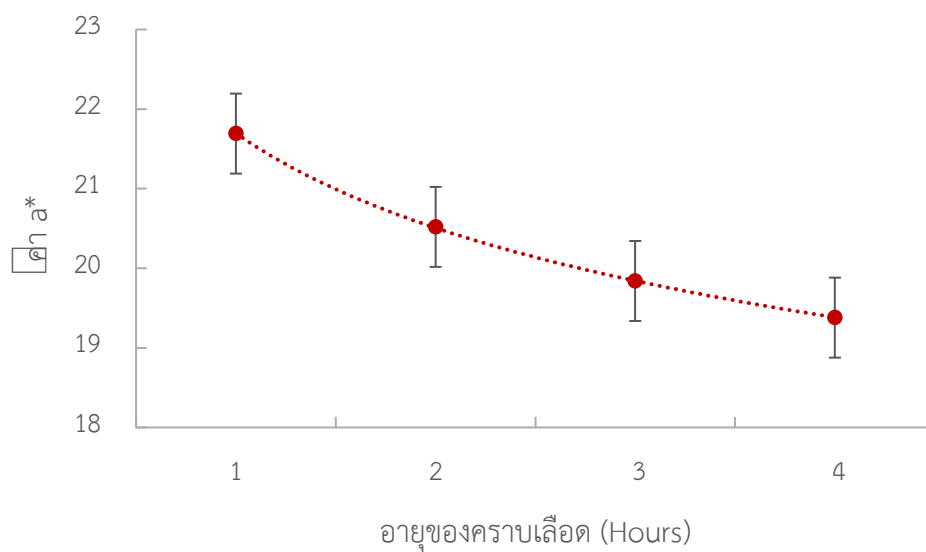
ภาพที่ 11 ความสัมพันธ์ระหว่างค่า L^* (วงกลม) ค่า a^* (สามเหลี่ยม) และค่า b^* (สี่เหลี่ยม) ของคราบเลือดกับอายุของคราบเลือด (Hours)

จากภาพที่ 11 พบว่ากราฟทั้ง 3 เส้น มีแนวโน้มที่ค่า L^* a^* และ b^* ลดลงเมื่อเวลาผ่านไป ในช่วง 1- 720 ชั่วโมง จึงหาสมการความสัมพันธ์ระหว่างค่า L^* a^* และ b^* กับอายุของคราบเลือด

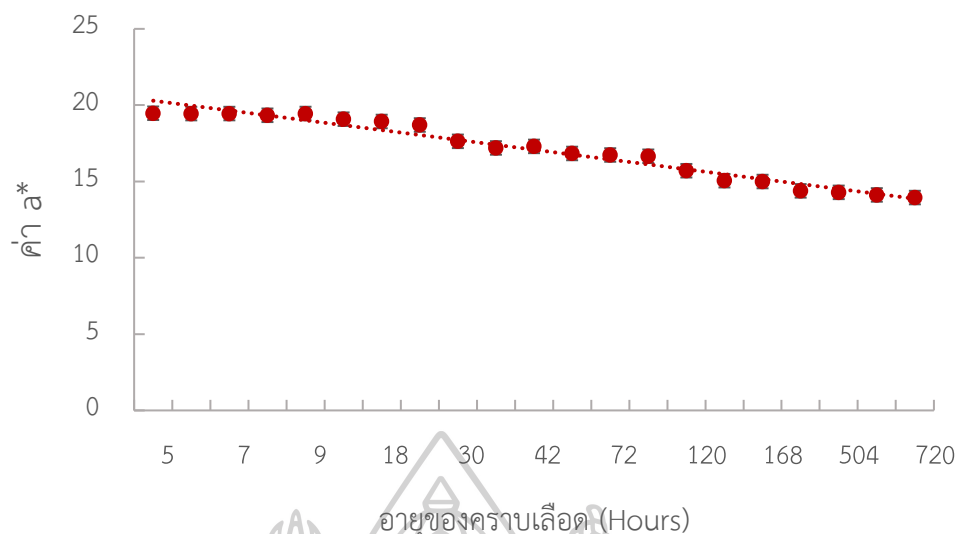
ตารางที่ 3 สมการความสัมพันธ์ระหว่างค่า L^* a^* และ b^* กับอายุของคราบเลือด

ค่าสี	สมการ	ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (R)
L^*	$y = -0.1568x + 46.43$	0.3748
a^*	$y = -0.2974x + 21.464$	0.9493
b^*	$y = -0.0762x + 16.723$	0.2245

จากตารางที่ 3 พบว่าค่า a^* มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เท่ากับ 0.9743 ซึ่งมีค่าใกล้กับความ เป็นเส้นตรงสูง จึงนำกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า a^* กับอายุของคราบเลือด โดยเป็น 2 ช่วง ช่วงแรกเป็นระหว่างค่า a^* ของคราบเลือดกับระยะเวลาที่ 1 - 4 ชั่วโมง และช่วงที่สองระหว่างค่า a^* ของคราบเลือดกับระยะเวลาที่ 5 - 720 ชั่วโมง



ภาพที่ 12 ค่า a^* กับอายุของคราบเลือดตั้งแต่เวลา 1 ชั่วโมงถึง 4 ชั่วโมง



ภาพที่ 13 ค่า a^* กับอายุของคราบเลือดตั้งแต่เวลา 5 ชั่วโมงถึง 720 ชั่วโมง

จากภาพที่ 12 และ 13 พบว่าช่วงแรกที่ระยะเวลา 1 - 4 ชั่วโมง และช่วงที่สองระยะเวลาที่ 5 - 720 ชั่วโมง มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เท่ากับ 0.9814 และ 0.9813 ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยที่ได้นำเทคนิค ATR-FTIR และ CIE L*a*b* Color Spectrophotometer มาใช้ในการวิเคราะห์เศษสีของรถยนต์ พบว่าการวิเคราะห์สีด้วยเทคนิค CIE L*a*b* Color Spectrophotometer สามารถบอกความแตกต่างเพียงเล็กน้อยของสีรถยนต์ได้แม้ว่าเป็นสีเดียวกัน (นันทภัทร์ ทิมอรรถ, 2559)

ตารางที่ 4 สมการความสัมพันธ์ระหว่างเปลี่ยนแปลงของค่า a^* เทียบกับอายุของคราบเลือด แบ่งเป็นระยะเวลาช่วง 1-4 ชั่วโมง และระยะเวลาช่วง 5-720 ชั่วโมง ภายหลังจากการหยดเลือด

ระยะเวลา (Hours)	สมการ	ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (R)
1-4	$y = 22.321e^{-0.037x}$	0.9814
5-720	$y = -0.3211x + 20.614$	0.9813

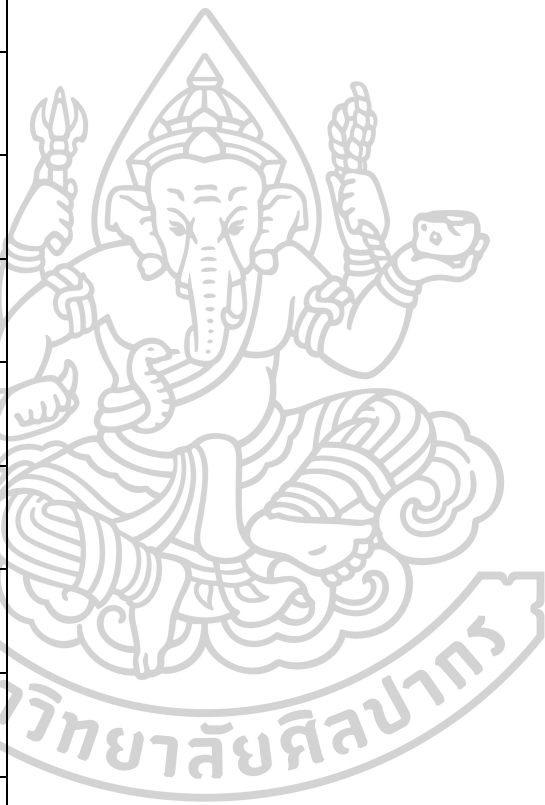
จากตารางที่ 4 แสดงให้เห็นว่าสมการของระยะเวลาช่วง 1-4 ชั่วโมง มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เท่ากับ 0.95697 และระยะเวลาช่วง 5-720 ชั่วโมง มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ เท่ากับ 0.96327 ซึ่งเป็นตัวชี้วัดว่า หากนำสมการดังกล่าวมาใช้ในการทำนายอายุของคราบเลือดจะทำให้การทำนายมีประสิทธิภาพและมีความใกล้เคียงกับอายุจริงของคราบเลือดมากที่สุด

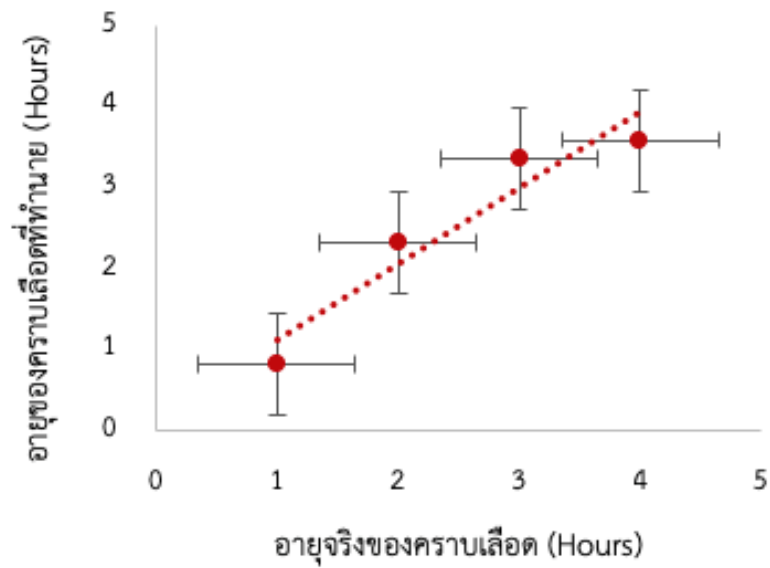
จากนั้นนำสมการความสัมพันธ์ระหว่างค่า a^* กับอายุของคราบเลือดทั้งสองช่วง มาทำนายอายุของคราบเลือดตัวอย่างจากอาสาสมัครทั้งหมด 12 คน (ตารางที่ 5) พบว่า สามารถทำนายอายุของคราบเลือดบนผ้าฝ้ายสีขาวได้ประมาณ 1 ชั่วโมง จนถึง 4 ชั่วโมงแรก โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ เท่ากับ 0.9565 และช่วงความคลาดเคลื่อนประมาณ 10 - 16 % ซึ่งความคลาดเคลื่อนจะเพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาผ่านไป ภาพที่ 15 ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยที่ศึกษาเกี่ยวกับการนำตัวอย่างเลือดหยดลงบนผ้าขาวจากการถ่ายภาพและการอ่านค่าสี RGB โดยใช้โปรแกรม MATLAB โดยนำสมการความสัมพันธ์ของค่าสีแดงกับอายุที่แท้จริงคราบเลือดเปรียบเทียบกับสมการความสัมพันธ์ของอัตราการเปลี่ยนแปลงค่าสีแดงกับอายุที่แท้จริงคราบเลือด พบว่าความสัมพันธ์ระหว่างค่าสีแดงกับอายุที่แท้จริงคราบเลือดมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เท่ากับ 0.9663 ซึ่งสามารถทำนายอายุของตัวอย่างคราบเลือดได้ประมาณ 2 ชั่วโมงแรกเท่านั้น (ภัทราริปี เลหาบุตร, 2559)

ตารางที่ 5 อายุจริงของคราบเลือดเทียบกับอายุของคราบเลือดอาสาสมัครจำนวน 12 คน ที่ทำนายได้จากสมการความสัมพันธ์ระหว่างค่า d^* กับอายุของคราบเลือด

ระยะเวลา (ชั่วโมง)	อายุของตัวอย่างคราบเลือดอาสาสมัครจำนวน 12 คน												อายุเฉลี่ย ตัวอย่าง คราบ เลือด	ค่า ความคลาด เคลื่อน (%)	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12			
1	0.7836		2.0624	0.7729						0.0107				0.8302	16.97725
2	2.3599	2.2708	2.1919	2.2741	2.6088	2.7576		2.9989	1.4129	2.4409	2.2268	2.0232		2.3242	16.20842
3	3.0720	3.5918	2.8952	3.1847	3.6150	3.6419		4.0350	3.0341	3.3990	3.2610	3.2310	3.3601	3.3601	12.00217
4	4.2674	3.1851	4.0163	3.8190	4.0900	3.6156	2.8715	3.5211	3.4821	3.9542	2.8544	3.4265	3.5919	3.5919	10.20188
5	4.4410		6.4102	3.5603		1.5185	2.0093	2.4347	2.0361	3.6682		2.0441	3.3255	3.3255	33.49048
6	3.1261	3.0258	4.7291	3.6270	4.2295	5.3339		5.2728		3.9283	2.5132	2.6995	3.4987	3.4987	41.68908
7	5.7680	2.3030	2.7948	3.6219		5.7982	6.4840	6.3514	0.8345	5.1970	1.4682	2.4999	3.9201	3.9201	43.99892
8	4.0863	4.0828	3.7562	3.9751	7.3656	9.5142	6.6873	7.8557	1.3771	5.6704	4.1034	3.7169	5.1826	5.1826	35.21777
9	1.0916	3.3809	6.3725	3.6150	6.6512	10.6883	12.3360	9.8918	2.3909	5.1331	5.7811	4.4350	5.9806	5.9806	33.54883
12		6.9249	8.0670	4.7724		10.2420	10.7885	10.6279	3.3337	7.8129	4.1043	5.0836	6.5234	6.5234	45.63836
18	5.4239	3.3270	6.9636	5.2381	15.0726		15.7275	15.5600	3.6972	10.1554	7.3026	7.0517	8.6836	8.6836	51.75786
24	6.9405	3.0115	7.9069	5.9530	17.8595	16.9872	16.5746	17.1405	3.5753	11.9063	9.9994	8.4937	10.5290	10.5290	56.12906
30	9.5014	9.5014	8.8736	9.2921	19.6733		19.6017	19.8154	6.6286	14.4827	13.1392	11.4168	12.9024	12.9024	56.99203
36	14.0881	6.5961	11.2386	10.6409	19.9483	19.5603		19.9764	6.9442	15.2946	11.6697	11.3028	13.3873	13.3873	62.81311
42	11.3557	10.8415	8.7789	10.3253		18.8813	19.2404	19.2461	6.0856	14.9710	11.9640	11.0069	12.9724	12.9724	69.11326
48	12.0944	10.0467	13.1554	11.7655	23.4481	21.2800	21.4239	22.0507	8.9089	17.6068	13.0126	13.1761	15.6641	15.6641	67.36649
72	11.6185	12.6640	11.9433	12.0753	26.5905	24.1623	23.8979	24.8835	8.5524	12.7264	16.0428	12.4405	16.4664	16.4664	77.12994
96	13.0607	11.5986	12.3482	12.3358	24.9128	26.9025	25.6120	25.8091	9.7632	18.6243	16.5269	14.9715	17.7055	17.7055	81.55681

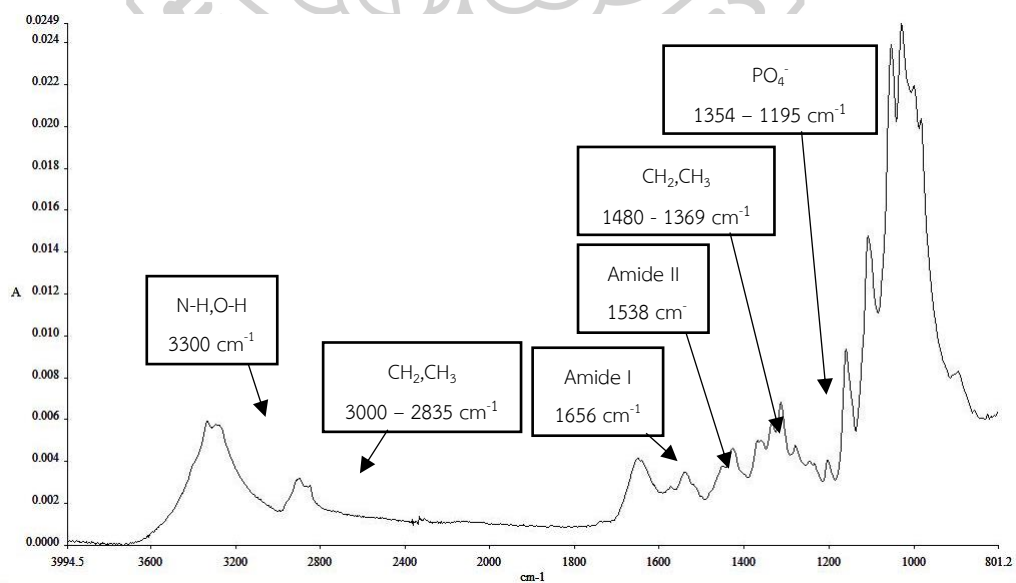
120	14.5519	15.4553	15.8511	15.2861	28.2149		28.2828	28.2913	10.5474	21.7505	17.1693	16.4891	19.2627	83.94776
144	17.4600	16.9066	17.6020	17.3228	22.7132		22.9633	24.2949	14.5854	20.0180	19.1244	17.9093	19.8423	86.22059
168	19.4980	17.5740	15.3961	17.4894	23.0660		19.0744	21.2817	13.4012	20.2777	16.7224	16.8004	18.5238	88.97391
366	20.8078	15.5341	21.8449	19.3956	24.3778	23.9206		24.3379	17.6573	21.8867	18.5188	19.3543	20.6942	93.84102
504	19.7527	19.7001	19.6503	19.7010		24.0941	24.1775	24.3872	17.0806	22.2955	19.0480	19.4747	20.8511	95.86288
672	18.5297	21.5709	20.5777	20.2261	25.6254		24.2002	25.4860	18.6828	22.9257	21.8142	21.1409	21.8891	96.74270
720	17.7555	17.9692	26.5596	20.7614	25.8200	25.7537		25.8712	21.7003	23.2907	21.2923	22.0944	22.6244	96.85772





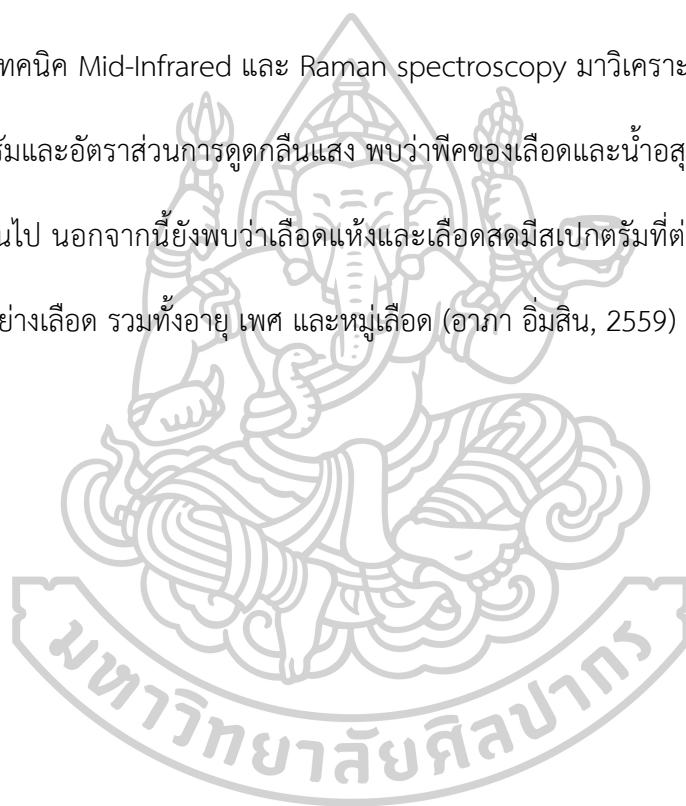
ภาพที่ 14 ความสัมพันธ์ระหว่างอายุของคราบเลือดที่ทำนายได้จากสมการกับอายุจริงของคราบเลือด (Hours)

จากการวิเคราะห์คราบเลือดบนผ้าฝ้ายสีขาวด้วยเทคนิค Attenuated Total Reflectance Fourier Transform Infrared Spectroscopy (ATR-FTIR) ในช่วงคลื่น $4000-600\text{ cm}^{-1}$ ที่ช่วงเวลาต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 720 ชั่วโมง พบสเปกตรัมของคราบเลือด ดังภาพที่ 15



ภาพที่ 15 สเปกตรัมของคราบเลือดในช่วงเลขคลื่น $4000-600\text{ cm}^{-1}$

ภาพที่ 15 จากการวิเคราะห์องค์ประกอบของคราบเลือดบนผ้าฝ้ายสีขาวด้วยเทคนิค ATR-FTIR ในช่วงคลื่น $4000-600\text{ cm}^{-1}$ ที่ช่วงเวลาต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 720 ชั่วโมง พบสเปกตรัมองค์ประกอบของคราบเลือดมีแบนที่เด่นชัดของพีค Amide I ที่เกิดจาก C=O stretching ในช่วง $1700-1600\text{ cm}^{-1}$ และ Amide II เกิดจาก N-H bending ในช่วง $1590-1480\text{ cm}^{-1}$ ซึ่ง Intensity ที่ Amide I และ Amide II ลดลงเมื่อเวลาผ่านไปจนครบระยะเวลา 720 ชั่วโมง ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยที่นำเทคนิค Mid-Infrared และ Raman spectroscopy มาวิเคราะห์เลือดและน้ำอสุจิ โดยศึกษาสเปกตรัมและอัตราส่วนการดูดกลืนแสง พบว่าพีคของเลือดและน้ำอสุจิมีการเปลี่ยนแปลงเมื่อระยะเวลาผ่านไป นอกจากนี้ยังพบว่าเลือดแห้งและเลือดสดมีสเปกตรัมที่ต่างกัน เนื่องจากโมเลกุลของน้ำในตัวอย่างเลือด รวมทั้งอายุ เพศ และหมู่เลือด (อาภา อิมสิน, 2559)



บทที่ 5

สรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

สรุปผล อภิปรายผล

งานวิจัยนี้เป็นศึกษาการวัดสีด้วย Spectrophotometer เพื่อประเมินอายุของคราบเลือดในการทดลองเตรียมตัวอย่างโดยการหยดเลือดลงบนผ้าฝ้ายสีขาวและเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องช่วงเวลาต่างกัน จากการวิเคราะห์ค่าสี โดยสร้างกราฟมาตรฐานค่า a^* กับอายุคราบเลือด และนำเสนอความสัมพันธ์ทั้ง 2 ช่วง ใช้ประเมินอายุของคราบเลือดจากตัวอย่างเลือด 12 ตัวอย่าง ซึ่งอายุโดยประมาณกับอายุที่แท้จริงของกลุ่มตัวอย่างมีความสัมพันธ์กันมาก โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เท่ากับ 0.9565 และศึกษาการใช้เทคนิค ATR-FTIR เพื่อวิเคราะห์องค์ประกอบของคราบเลือดบนผ้าฝ้ายสีขาวในช่วงคลื่น $4000-600\text{ cm}^{-1}$ ที่ช่วงเวลาต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 720 ชั่วโมง พบสเปกตรัมองค์ประกอบของคราบเลือดมีแบนที่เด่นชัดของพีค Amide I ที่เกิดจาก C=O stretching ในช่วง $1700-1600\text{ cm}^{-1}$ และ Amide II เกิดจาก N-H bending ในช่วง $1590-1480\text{ cm}^{-1}$ ซึ่ง Intensity ที่ Amide I และ Amide II ลดลงเมื่อเวลาผ่านไปจนครบระยะเวลา 720 ชั่วโมง

ข้อเสนอแนะ

การทดลองในครั้งต่อไป ควรเพิ่มชนิดของผ้า สีและพื้นผิวอื่น ๆ ให้มีความหลากหลายมากยิ่งขึ้น และจากการวิเคราะห์คราบเลือดในแต่ละตัวอย่างค่าสีมีความแตกต่างกัน อาจเป็นผลมาจากกิจกรรมในการใช้ชีวิตของแต่ละบุคคล เพศ อายุ โรคประจำตัว และสภาพแวดล้อม



รายการอ้างอิง

- Bergmann, T., Heinke, F., & Labudde, D. (2017). Towards substrate-independent age estimation of blood stains based on dimensionality reduction and k-nearest neighbor classification of absorbance spectroscopic data. *Forensic science international*, 278, 1-8.
- Bremmer, R. H., Nadort, A., Van Leeuwen, T. G., Van Gemert, M. J., & Aalders, M. C. (2011). Age estimation of blood stains by hemoglobin derivative determination using reflectance spectroscopy. *Forensic science international*, 206(1-3), 166-171.
- Edelman, G., Manti, V., van Ruth, S. M., van Leeuwen, T., & Aalders, M. (2012). Identification and age estimation of blood stains on colored backgrounds by near infrared spectroscopy. *Forensic science international*, 220(1-3), 239-244.
- Edelman, G., Van Leeuwen, T. G., & Aalders, M. C. (2012). Hyperspectral imaging for the age estimation of blood stains at the crime scene. *Forensic science international*, 223(1-3), 72-77.
- Jones, & Bartlett. (2018). *Hematology*. Jones and Bartlett Publishers.
- Li, B., Beveridge, P., O'hare, W. T., & Islam, M. (2013). The age estimation of blood stains up to 30 days old using visible wavelength hyperspectral image analysis and linear discriminant analysis. *Science & Justice*, 53(3), 270-277.
- เจริญชัย เหลืองอ่อน. (2553). การวัดสีด้วยเทคนิค UV-VIS-NIR SPECTROPHOTOMETRY
- นันทน์ภัทร์ ทิมอรรถ. (2559). การตรวจพิสูจน์เศษสีของรถยนต์โดยการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค *Attenuated Total Reflectance Fourier Transform Infrared Spectroscopy (ATR-FTIR)* และการวัดสี มหาวิทยาลัยศิลปากร].
- ภักคนัย ทองท้อมพร. (2550). การมองเห็นและการวัดสี
- ภัทราริณี เลหาบุตร. (2559). การประเมินอายุคราบเลือดบนผ้าโดยวิธีการวิเคราะห์ภาพ มหาวิทยาลัยศิลปากร].
- วรพรรณ ศิริวัฒน์อักษร, ชัชวาลย์ ศรีสวัสดิ์, นิโกลบ เนื่องตัน, ภัทรบุตร มาศรีตัน, & สมทรง เลขะกุล. (2562). ชีวิตเคมีของเลือด.
- อาภา อิมสิน. (2559). การตรวจหาคราบอสุจิบนกระเบื้องและผ้าชนิดต่าง ๆ โดยใช้เทคนิค *Attenuated Reflection Fourier Transform Infrared Spectroscopy (ATR-FTIR)* มหาวิทยาลัยศิลปากร]. มหาวิทยาลัยศิลปากร.





ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	นางสาว จิณห์นิภา ปาวะภินันท์
วัน เดือน ปี เกิด	30 ธันวาคม พ.ศ.2537
สถานที่เกิด	โรงพยาบาลยาสูบ
วุฒิการศึกษา	2555 - มัธยมศึกษา โรงเรียนสตรีวัดระฆัง วิทย์-คณิต 2559 - ปริญญาตรี สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิศวกรรมศาสตร์และ เทคโนโลยีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยศิลปากร 2565 - ปริญญาโท สาขานิติวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัย ศิลปากร
ที่อยู่ปัจจุบัน	80/5 ซอยวัดใหม่พิเรนทร์ ถนนอิสรภาพ แขวงวัดท่าพระ เขตบางกอกใหญ่ จังหวัด กรุงเทพมหานคร 10600

