



การตรวจหาอายุคราบโลหิตด้วย Fourier Transform Infrared Spectroscopy

โดย

นายสรารุณ แหยมศิริ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชานิติวิทยาศาสตร์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

ปีการศึกษา 2554

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

การตรวจหาอายุคราบโลหิตด้วย Fourier Transform Infrared Spectroscopy

โดย

นายสรวิชญ์ แหยมศิริ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชานิติวิทยาศาสตร์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

ปีการศึกษา 2554

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

**DETERMINATION OF THE AGE OF BLOODSTAIN BY FOURIER TRANSFORM
INFRARED SPECTROSCOPY**

By

Mr. Sarawut Yeamsiri

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

Master of Science Program in FORENSIC SCIENCE

Program of Forensic Science

Graduate School, Silpakorn University

Academic Year 2011

Copyright of Graduate School, Silpakorn University

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร อนุมัติให้วิทยานิพนธ์เรื่อง “ การตรวจหาอายุคราบ
โลหิตด้วย Fourier Transform Infrared Spectroscopy ” เสนอโดย นายสรายุทธ แหยมศิริ เป็นส่วนหนึ่ง
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชานิติวิทยาศาสตร์

.....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปานใจ ธารทศนวงศ์)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่.....เดือน..... พ.ศ.....

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

อาจารย์ ดร.ศุภชัย ศุภลักษณ์นารี

คณะกรรมการตรวจสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ

(อาจารย์ ดร.ศิริรัตน์ ชูสกุลเกรียง)

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

..... กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.วิรัช พุทธวงศ์)

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

..... กรรมการ

(อาจารย์ ดร.ศุภชัย ศุภลักษณ์นารี)

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

52312339 : สาขาวิชานิติวิทยาศาสตร์

คำสำคัญ : อายุคราบโลหิต/ นิติวิทยาศาสตร์/ FTIR

สราวุธ แหยมศิริ : การตรวจหาอายุคราบโลหิตด้วย Fourier Transform Infrared Spectroscopy. อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ : อ.ดร.ศุภชัย ศุภลักษณ์นารี. 68 หน้า.

คราบโลหิตของมนุษย์เป็นหลักฐานทางนิติวิทยาศาสตร์ที่สำคัญ และมักจะพบในสถานที่เกิดเหตุ ในการศึกษานี้ใช้เทคนิค Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) ในการตรวจประมาณหาอายุของคราบโลหิต ทำการทดลองโดยนำโลหิตของมนุษย์มาหยดลงบนกระจกสไลด์ แล้วปล่อยให้แห้งที่อุณหภูมิห้องที่ระยะเวลาต่าง ๆ กันจากนั้นนำมาเตรียมตัวอย่างโดยใช้วิธี KBr disc และวิเคราะห์ด้วยเทคนิค FTIR

สเปกตรัม ของ IR ของคราบโลหิตแสดงองค์ประกอบของ N-H stretching ที่เลขคลื่น 3300 cm^{-1} ซึ่งพีกที่เกิดขึ้นมีลักษณะกว้าง เนื่องจากเกิดการซ้อนทับกันกับพีกของ O-H stretching ที่เลขคลื่นช่วงนี้ พบพีก Amide I และพีก Amide II ที่เลขคลื่น 1656 cm^{-1} และ 1538 cm^{-1} ตามลำดับ และพบพีกที่เลขคลื่น 1354 cm^{-1} และ 1195 cm^{-1} ที่เกิดจาก PO_4^{3-} stretching ของกรดนิวคลีอิก เมื่อนำพื้นที่ใต้พีกในช่วงเลขคลื่น $3700 - 3000\text{ cm}^{-1}$ (A_{3300}) มาใช้ในการคำนวณเป็นอัตราส่วนของพื้นที่ที่วัดได้นี้กับพื้นที่ของพีกที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงเมื่อเวลาผ่านไปในช่วงเลขคลื่น $770 - 730\text{ cm}^{-1}$ (A_{744}) เมื่อนำอัตราส่วนของพื้นที่พีก A_{3300}/A_{744} มาพล็อตกราฟเทียบกับอายุของคราบโลหิต มีการลดลงเป็นเส้นตรงอย่างมีนัยสำคัญตามกราฟสมการเส้นตรง $y = -2.613x + 667.2$ ($R^2 = 1$) เมื่อนำตัวอย่างคราบโลหิตจากแหล่งต่างๆ มาทำการวิเคราะห์หาอายุจากสมการ พบว่าสามารถประมาณอายุของคราบโลหิตได้ใกล้เคียงกับอายุจริงของโลหิต ดังนั้นการศึกษานี้มีความเหมาะสมสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในประมาณอายุของคราบโลหิตในที่เกิดเหตุได้

สาขาวิชานิติวิทยาศาสตร์

ลายมือชื่อนักศึกษา.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์.....

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

ปีการศึกษา 2554

52312339 : MAJOR : FORENSIC SCIENCE

KEY WORD : AGE OF BLOODSTAIN / FORENSIC / FTIR

SARAWUT YEAMSIRI : DETERMINATION OF THE AGE OF BLOODSTAIN BY
FOURIER TRANSFORM INFRARED SPECTROSCOPY. THESIS ADVISORS: SUPACHAI
SUPALAKNARI, Ph.D. 68 pp.

The human bloodstains are important forensic evidence often found in the event s concerned with crime. In this study, the technique of Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) was used to estimate the age of bloodstains. The sample was prepared by placing the bloodstain on microscope slide and kept at ambient temperature for various periods of time. The KBr disc technique was used to prepare the sample for the FTIR measurement.

The IR spectra of the blood sample displayed a broad band of the N-H stretching at around 3300 cm^{-1} . The band was usually found overlapping with the O-H stretching in the region. The amide I and amide II bands were found at the wavenumbers of 1656 cm^{-1} and 1538 cm^{-1} respectively. The band between 1354 cm^{-1} and 1195 cm^{-1} can be ascribed to the stretching of phosphate group in nucleic acid. The integrated area of the bands between 3700 cm^{-1} - 3000 cm^{-1} (A_{3300}) was used to calculate the ratio of the area to the area of the peak in the range of 770 cm^{-1} - 730 cm^{-1} (A_{744}). The A_{744} peak was chosen because the peak area was found to be invariable in all samples. The graph plotting A_{3300}/A_{744} versus the age of sample displayed a decreasing trend with a linear regression equation , $y = -2.613x + 667.2$ ($R^2 = 1$). The equation was then used to estimate the age of samples from different source. A good agreement between the estimated age of samples and the known values can be obtained. The results thus showed the potential of the technique for the estimation of the age of bloodstains.

Program of Forensic Science

Student's signature

Thesis Advisors' signature

Graduate School, Silpakorn University

Academic Year 2011

กิตติกรรมประกาศ

การตรวจหาอายุคราบโลหิตด้วย Fourier Transform Infrared Spectroscopy สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ อาจารย์ ดร. ศิริรัตน์ ชูสกุลเกรียง อาจารย์ ดร. สุภชัย ศุภลักษณ์นรี ที่ได้กรุณาเป็นที่ปรึกษา ให้คำแนะนำ ข้อคิดเห็นที่มีคุณค่าและเป็นประโยชน์ต่องานวิจัยเป็นอย่างยิ่งและให้ความช่วยเหลือในทุกด้าน และขอขอบพระคุณอาจารย์ทุกท่านที่ได้ประสิทธิ์ประสาทวิชาให้ความรู้ต่างๆ และขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูงมา ณ โอกาสนี้

นอกจากนี้ผู้วิจัยขอขอบพระคุณนางสาวธนวรรณ วัฒนพร และนายพินนตรี บัวชื่น และอาสาสมัคร และผู้เข้าร่วมการวิจัยทุกท่าน ตลอดจนบุคคลากรคณะวิทยาศาสตร์ที่ให้ความช่วยเหลือตลอดเวลาในการช่วยทำการวิจัย และให้คำแนะนำให้รายงานการวิจัยมีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น และขอขอบคุณเพื่อน ๆ และพี่ ๆ ทีมหาวิทยาลัยศิลปากรทุกคนที่คอยให้ความช่วยเหลือให้คำแนะนำช่วยให้การดำเนินงานเป็นไปอย่างราบรื่นมากยิ่งขึ้น

สุดท้ายผู้วิจัยขอขอบพระคุณมารดา และครอบครัวที่ให้การสนับสนุนช่วยเหลือและเป็นกำลังใจมาโดยตลอด และขอขอบพระคุณผู้ที่มิได้เอ่ยนามมา ณ โอกาสนี้ ซึ่งมีส่วนช่วยเหลือจนการวิจัยนี้ประสบผลสำเร็จไปได้ด้วยดี

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ณ
สารบัญภาพ.....	ญ
บทที่	
1 บทนำ.....	1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
ความมุ่งหมายและวัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	3
สมมติฐานของการวิจัย.....	3
ขอบเขตของการวิจัย.....	3
ข้อจำกัดของการวิจัย.....	3
คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย.....	4
กรอบแนวคิดการวิจัย.....	4
ประโยชน์ที่จะได้รับ.....	4
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	5
ความรู้เกี่ยวกับโลหะ.....	5
องค์ประกอบของโลหะ.....	7
การเก็บวัตถุดิบ.....	14
การตรวจคราบโลหะ.....	16
ความรู้เกี่ยวกับอินฟราเรดสเปกโทรสโกปี.....	18
แสงอินฟราเรด.....	18
การดูดกลืนแสงอินฟราเรด.....	18
ลักษณะการสั่นของพันธะ.....	19
อินฟราเรดสเปกตรัม.....	19
ส่วนประกอบของเครื่องอินฟราเรดสเปกโทรโฟโตมิเตอร์.....	20
ชนิดของเครื่องอินฟราเรดสเปกโทรโฟโตมิเตอร์.....	20
Fourier Transform Infrared Spectrophotometer (FTIR).....	21

บทที่	หน้า
Diffuse Reflection Infrared Fourier Transform (DRIFT).....	22
เทคนิคการเตรียมตัวอย่าง.....	23
การวิเคราะห์หาปริมาณ.....	23
การแปลผลสเปกตรัมของ FTIR.....	26
ข้อดีของสเปกโทรโฟลูอิดเรย์แทรนซ์ฟอร์ม.....	27
งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	28
3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	31
วัสดุอุปกรณ์.....	31
สารเคมี.....	32
วิธีการทดลอง.....	32
การวิเคราะห์ตัวอย่างจริงจากอาสาสมัคร.....	34
4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล.....	35
การวิเคราะห์ตัวอย่างโลหิตด้วยเทคนิค Diffuse Reflectance Infrared Fourier Transform Spectroscopy	35
การวิเคราะห์ตัวอย่างโลหิตด้วยเทคนิค Transmission Infrared Fourier Transform Spectroscopy	37
5 สรุป อภิปราย และ ข้อเสนอแนะ.....	44
สรุปและอภิปรายผล ผลการวิจัย.....	44
ข้อเสนอแนะ.....	45
บรรณานุกรม.....	46
ภาคผนวก.....	48
ภาคผนวก ก สเปกตรัมที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิค Diffuse Reflectance Infrared Fourier Transform Spectroscopy (DRIFT FTIR).....	49
ภาคผนวก ข สเปกตรัมที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิค Transmission Infrared Fourier Transform Spectroscopy (TIFT FTIR).....	52
ประวัติผู้วิจัย.....	68

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1 ชนิดและปริมาณโปรตีนในพลาสมา.....	9
2 ตารางการดูดกลืนแสงอินฟราเรดในช่วงเลขคลื่นต่างๆ.....	26
3 วัสดุอุปกรณ์.....	31
4 สารเคมี.....	32
5 ช่วงเลขคลื่นที่พบในสเปกตรัมได้จากการวิเคราะห์ของโลหิต.....	39
6 อัตราส่วนระหว่างพื้นที่ใต้พีคในช่วงเลขคลื่น $3700 - 3000\text{ cm}^{-1}(A_{3300})$ กับพื้นที่ใต้พีค ของพีคที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลง เมื่อระยะเวลาผ่านไปในช่วงเลขคลื่น $770 - 730\text{ cm}^{-1}(A_{744})$	40
7 อัตราส่วนระหว่างพื้นที่ใต้พีคในช่วงเลขคลื่น $3700 - 3000\text{ cm}^{-1}(A_{3300})$ กับพื้นที่ใต้พีค ของพีคที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลง เมื่อระยะเวลาผ่านไปในช่วงเลขคลื่น $770 - 730\text{ cm}^{-1}(A_{744})$ ของตัวอย่างคราบโลหิตจำนวน 13 ตัวอย่าง.....	42

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1 องค์ประกอบของโลหิต.....	8
2 Fourier Transform Infrared Spectrophotometer.....	21
3 ทิศทางการเคลื่อนที่ของแสงด้วยเทคนิค Diffuse Reflection Infrared Fourier Transform (DRIFT).....	22
4 สเปกตรัมของกราบโลหิตที่ระยะเวลาต่างๆ กันในช่วงเลขคลื่น $7800-4000\text{ cm}^{-1}$ ด้วยเทคนิค DRIFT FTIR.....	35
5 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ใต้พีค(K-M) ของ Methemoglobin ที่ช่วงเลขคลื่น $7123 - 5394\text{ cm}^{-1}$ ของตัวอย่างกราบโลหิตกับอายุของกราบโลหิต.....	36
6 สเปกตรัมของกราบโลหิตในช่วงเลขคลื่น $4000 - 400\text{ cm}^{-1}$	37
7 สเปกตรัมของกราบโลหิตตัวอย่างชั่วคราวที่ 2, 24, 48.....	37
8 ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนพื้นที่ใต้พีคที่เลขคลื่น $3700-3000\text{ cm}^{-1}$ กับพีคที่ไม่ เปลี่ยนแปลง (A_{3300}/A_{744}) ของตัวอย่างกับอายุของกราบโลหิตโดยใช้ KBr disc... 41	
9 ความสัมพันธ์ระหว่างอายุจริงของกราบโลหิตกับอายุของกราบโลหิต ที่คำนวณได้จากสมการ.....	43
10 สเปกตรัมของกราบโลหิตที่ระยะเวลาต่างๆ กันในช่วงเลขคลื่น $4000 - 400\text{ cm}^{-1}$	50
11 สเปกตรัมของกราบโลหิตที่ระยะเวลาต่างๆ กันในช่วงเลขคลื่น $7800-4000\text{ cm}^{-1}$	51
12 สเปกตรัมของกราบโลหิตในช่วงเลขคลื่น $7800 - 400\text{ cm}^{-1}$	53
13 สเปกตรัมของกราบโลหิตแสดงการลดลงของพื้นที่ใต้พีคในช่วงระยะเวลา 4 วัน ของ วิธีการเตรียมตัวอย่างโดย การใช้ KBr disc ทำการวิเคราะห์ซ้ำในระยะเวลาต่างกัน	54
14 สเปกตรัมของกราบโลหิตตัวอย่างอาสาสมัครคนที่ 1.....	55
15 สเปกตรัมของกราบโลหิตตัวอย่างอาสาสมัครคนที่ 2.....	56
16 สเปกตรัมของกราบโลหิตตัวอย่างอาสาสมัครคนที่ 3.....	57
17 สเปกตรัมของกราบโลหิตตัวอย่างอาสาสมัครคนที่ 4.....	58
18 สเปกตรัมของกราบโลหิตตัวอย่างอาสาสมัครคนที่ 5.....	59
19 สเปกตรัมของกราบโลหิตตัวอย่างอาสาสมัครคนที่ 6.....	60
20 สเปกตรัมของกราบโลหิตตัวอย่างอาสาสมัครคนที่ 7.....	61
21 สเปกตรัมของกราบโลหิตตัวอย่างอาสาสมัครคนที่ 8.....	62

ภาพที่	หน้า
22 สเปกตรัมของคราบโลหิตตัวอย่างอาสาสมัครคนที่ 9.....	63
23 สเปกตรัมของคราบโลหิตตัวอย่างอาสาสมัครคนที่ 10.....	64
24 สเปกตรัมของคราบโลหิตตัวอย่างอาสาสมัครคนที่ 11.....	65
25 สเปกตรัมของคราบโลหิตตัวอย่างอาสาสมัครคนที่ 12.....	66
26 สเปกตรัมของคราบโลหิตตัวอย่างอาสาสมัครคนที่ 13.....	67

บทที่ 1

บทนำ

1. ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

คดีอาชญากรรมคดีต่างๆไม่ว่าจะเป็นข่มขืน ฆาตกรรม ปล้นทรัพย์ ชิงทรัพย์ ทำร้ายร่างกาย มักจะพบวัตถุพยานทางชีวภาพเช่น คราบน้ำลาย คราบน้ำอสุจิ คราบโลหิต เส้นผม เส้นขนปนเปื้อน หรือตกหล่นในสถานที่เกิดเหตุเสมอ โดยเฉพาะคราบโลหิตหรือหยดโลหิตนั้นเป็นวัตถุพยานที่มักพบได้บ่อยและมีความสำคัญและสามารถนำไปใช้ในการสืบสวนได้เช่น ทราบวิธีการกระทำผิดของ คนร้าย ทางเส้นทางหนีของคนร้าย ใช้ตรวจยืนยันตัวบุคคลหรือพิสูจน์เอกลักษณ์บุคคลได้และช่วย ในการประมาณระยะเวลาการเกิดเหตุได้ อีกทั้งคราบโลหิตที่พบช่วยบ่งบอกพฤติกรรมของคนร้าย ได้ ลักษณะคราบโลหิตที่ใช้ร่วมในการพิจารณา คือ ตำแหน่งของคราบโลหิต การกระจายตัวของ คราบโลหิต ปริมาณคราบโลหิต รูปร่างขนาดของคราบโลหิตและอาศัพยานหลักฐานในที่ที่เกิดร่วม จะสามารถนำมาทำการประมวลลำดับเหตุการณ์ย้อนหลังได้ (Reconstruction)

การตรวจสอบคราบโลหิตในงานนิติวิทยาศาสตร์นั้นมีวิธีที่ใช้ในการทดสอบเบื้องต้นว่า เป็นคราบโลหิตหรือไม่คือ การทดสอบเบนซิดีน (Tetramethylbenzidine) และการทดสอบ ฟีนอล์ฟทาเลิน (Phenolphthalein) และการทดสอบยืนยันคราบโลหิตว่าเป็นคราบโลหิตมนุษย์ หรือไม่คือ การทดสอบ Precipitin test โดยอาศัย Anti Human Globulin ที่มีความจำเพาะเจาะจง สูงและการทดสอบหาปริมาณคราบโลหิตโดยที่มีปริมาณน้อยการทดสอบโดยใช้สารลูมินอล (Luminal) และสารบลูสตาร์ (Blue star) และการทดสอบเอกลักษณ์บุคคลโดยอาศัยสารชีวโมเลกุล เช่น การทดสอบ DNA typingสำหรับการประมาณอายุคราบโลหิตนั้นยังคงเป็นปัญหาการปฏิบัติงานเสมอมาในงานด้านนิติวิทยาศาสตร์ วิธีการต่างๆทางวิทยาศาสตร์ถูกนำมาใช้เช่น วิธีการวัดค่า อิเล็กตรอนสปินเรโซแนนซ์สามารถตรวจหาอายุคราบโลหิตซึ่งขึ้นกับความเข้มข้นของสัญญาณของ Methemoglobin หรือแม้แต่การใช้โครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงเพื่อหาปริมาณองค์ ประกอบของสายโซ่โกลบินของฮีโมโกลบินของเม็ดโลหิตแดงพบการลดลงของอัตราส่วนระหว่าง สายโซ่อัลฟากับบีเมื่อกคราบโลหิตมีอายุมากขึ้นและวิธีการประมาณอายุโลหิตโดย AFM (Atomic Force Microscopy) เป็นการถ่ายภาพเม็ดโลหิตแดงที่มีความละเอียดระดับ nanometer เพื่อหาค่า ความยืดหยุ่น

(Elasticity pattern) ของเซลล์เม็ดโลหิตแดง ที่ลดลงเมื่ออายุครรภ์โลหิตเพิ่มมากขึ้น แต่วิธีการดังกล่าวยังมีข้อจำกัดในเรื่องรายละเอียด มีความผิดพลาดสูง ค่าใช้จ่ายสูง และใช้เวลานานและเป็นวิธีการที่ทำให้ตัวอย่างเสียสภาพ และเป็นการทำให้วัตถุพยานเสื่อมคุณค่า

ปัจจุบันนี้เทคโนโลยีทางด้านเคมีได้เข้ามามีส่วนร่วมในงานด้านนิติวิทยาศาสตร์เป็นอย่างมากและที่น่าสนใจคือเทคโนโลยีการใช้แสงอินฟราเรดซึ่งเป็นคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้า (Electromagnetic Radiation) ที่แบ่งตามความยาวคลื่นในช่วงต่าง ๆ เช่น แสงอินฟราเรดช่วงไกล (FIR) แสงอินฟราเรดช่วงกลาง (MIR) ที่เหมาะสำหรับศึกษาคุณภาพวิเคราะห์และการศึกษาโครงสร้างโมเลกุลที่มีความซับซ้อนที่ให้ลักษณะที่มีความจำเพาะเจาะจงแบบ (Fingerprint) แสงอินฟราเรดช่วงใกล้ Near Infrared Region (NIR) เป็นการวัดเชิงปริมาณวิเคราะห์สามารถวัดค่าความเข้มข้นสารเคมีที่มีองค์ประกอบของ N-H, O-H และ C-H โดยใช้วัดค่าความชื้น (Moisture) หรือปริมาณของ H_2O ไขมัน (Fats) ปริมาณโปรตีน (Protein) ในผลิตภัณฑ์อาหาร ผลิตภัณฑ์ที่ทำจากเนื้อสัตว์หรือในวัตถุดิบ ปริมาณแอลกอฮอล์ในน้ำมันเชื้อเพลิงและได้ถูกนำมาประยุกต์ใช้ในงานด้านนิติวิทยาศาสตร์สำหรับในการการประมาณอายุครรภ์โลหิต โดยใช้เครื่องมือสเปกโตรสโกปีอินฟราเรดช่วงใกล้ (Near infrared spectroscopy) เพื่อศึกษาหาปริมาณพื้นที่ใต้กราฟของพิกน้ำ (H_2O) ที่ความยาวคลื่น 1400 nm และความยาวคลื่น 1900 nm ในครรภ์โลหิต พบการลดลงของปริมาณพื้นที่ใต้กราฟของ H_2O เมื่อครรภ์โลหิตมีอายุมากขึ้นตามระยะเวลา และในขณะเดียวกันพบพีกของเมทฮีโมโกลบิน (Methemoglobin) ที่มีพื้นที่ใต้กราฟช่วงความยาวคลื่น 1480-1860 nm เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาเมื่อครรภ์โลหิตมีอายุมากขึ้น (Edita et al 2009 : 111) อย่างไรก็ตาม งานวิจัยของเขามีวัตถุประสงค์เพื่อใช้ข้อมูลที่ได้พัฒนาเครื่องมือตรวจอายุครรภ์โลหิตด้วยแสงอินฟราเรดชนิดพกพาเท่านั้น และสำหรับประเทศไทยยังไม่ได้มีการวิจัยการการประมาณอายุครรภ์โลหิตโดยใช้เครื่องมือสเปกโตรสโกปี

เมื่อไม่นานมานี้เทคโนโลยี Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) ที่เป็นส่วนหนึ่งของเครื่องมือ Infrared Spectroscopy ที่ตรวจวิเคราะห์เชิงปริมาณและวิเคราะห์เชิงคุณภาพ สามารถเลือกใช้ช่วงอินฟราเรดในช่วงต่าง ๆ ได้ และใช้กับตัวอย่างที่เป็นของแข็งของเหลวและก๊าซได้ ถูกนำมาใช้ในงานด้านนิติวิทยาศาสตร์อย่างกว้างขวางเช่น การตรวจพิสูจน์เศษสิริยนต์ ลำดับชั้นของดิน หมึกปากกา หมึกพิมพ์ ยาเสพติด และใช้นำมาใช้ในงานชีวเคมีในการแยกสารคัดหลั่งจากร่างกายมนุษย์ไม่ว่าจะเป็น โลหิต น้ำลาย น้ำอสุจิ น้ำจากช่องคลอด ได้โดยอาศัยพีก (peak) สัญญาณที่จำเพาะเจาะจงในการแยกอีกทั้งวิธีการนี้เป็นวิธีการตรวจที่สะดวกและรวดเร็ว และที่สำคัญไม่ทำลายตัวอย่าง

ด้วยวิธีการ Fourier Transform Infrared Spectroscopy ที่กล่าวมาข้างต้นเป็นเพียงการใช้เพื่อแยกสารคัดหลังเบื้องต้นเท่านั้น ยังไม่มีนักวิจัยได้ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบในคราบโลหิตเมื่อเวลาผ่านไปในแต่ละช่วงเวลาเพื่อหาความสัมพันธ์ใช้สำหรับการประมาณอายุคราบโลหิต ซึ่งเห็นได้ว่าหากได้มีการศึกษาวิจัยอย่างจริงจังน่าจะสามารถนำมาใช้ประโยชน์ในงานด้านนิติวิทยาศาสตร์ได้ต่อไป

วิทยานิพนธ์นี้เป็นการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนในคราบโลหิตในระยะเวลาต่างๆ โดยวิธี FTIR โดยศึกษาหาปริมาณพื้นที่ได้กราฟของโปรตีนในคราบโลหิต ในช่วงระยะเวลาต่างๆ หลังการหลังโลหิต

2. ความมุ่งหมายและวัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาวิธีการตรวจหาอายุของคราบโลหิตโดยศึกษาการเปลี่ยนแปลงโปรตีนในคราบโลหิต ในระยะเวลาต่างๆ กันหลังการหลังโลหิตด้วยเทคนิค Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR)

3. สมมติฐานของการวิจัย

โปรตีนในคราบโลหิตมีการเปลี่ยนแปลงตามระยะเวลา การเปลี่ยนแปลงของโปรตีนในคราบโลหิตสามารถใช้ในการประมาณอายุคราบโลหิตในสถานที่เกิดเหตุได้

4. ขอบเขตของการวิจัย

4.1 ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนในคราบโลหิตโดยการหากราฟมาตรฐานจากพื้นที่ใต้พีคในช่วงเลขคลื่น $3700-3000\text{ cm}^{-1}$ ด้วยเทคนิค Fourier Transform Infrared Spectroscopy ในตัวอย่างโดยเปรียบเทียบเป็นเปอร์เซ็นต์ความเบี่ยงเบนสัมพัทธ์

4.2 ทำการประมาณหาอายุของคราบโลหิตด้วยเทคนิค Fourier Transform Infrared Spectroscopy ในตัวอย่างคราบโลหิตจำนวน 13 ตัวอย่าง

5. ข้อยกจำกัดของงานวิจัย

5.1 การวิจัยนี้ต้องมีการควบคุมน้ำหนักของโลหิตและน้ำหนักของ KBr ให้ได้ใกล้เคียงกัน และแน่นอนทุกครั้งที่ทำกรวดซึ่งทำได้ยาก ซึ่งทำให้เกิดความคลาดเคลื่อนในการประมาณอายุ

5.2 การวิเคราะห์ตัวอย่างใช้เวลาในการวิเคราะห์ระยะเวลานาน ดังนั้นในแต่ละวันจึงไม่สามารถวิเคราะห์ตัวอย่างจำนวนมากได้

5.3 เทคนิคการเตรียมตัวอย่าง KBr disc มีความประอบางทำให้แตกได้ง่ายขณะทำการวัด

6. คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย

Blood stain	หมายถึง	คราบโลหิต
KBr	หมายถึง	โพแทสเซียมโบรไมด์

7. กรอบแนวคิดงานวิจัย

โลหิตมีโปรตีนเป็นองค์ประกอบหลัก หลังจากที่ถูกโลหิตหลั่งออกภายนอกร่างกาย โปรตีนของในคราบโลหิตย่อมมีการมีเสื่อมสลายตามกาลเวลา ดังนั้นการศึกษการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนในคราบโลหิตย่อมนำไปสู่การประมาณอายุคราบโลหิตได้

8. ประโยชน์ที่จะได้รับ

8.1 สามารถใช้เทคนิค FTIR ในการประมาณอายุคราบโลหิตได้

8.2 สามารถนำวิธีการตรวจนี้ประยุกต์ใช้ในงานด้านนิติวิทยาศาสตร์ได้ อีกทั้งสะดวกและรวดเร็วและไม่ทำลายตัวอย่าง

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. ความรู้เกี่ยวกับโลหิต

โลหิตเป็นองค์ประกอบที่สำคัญของระบบไหลเวียนโลหิตของมนุษย์และสัตว์ ซึ่งทำงานร่วมกันอย่างมีระบบ เพื่อจัดหาปัจจัยพื้นฐานที่จำเป็นสำหรับเซลล์ในร่างกาย ทำให้เซลล์สามารถดำรงชีพ และทำหน้าที่ได้อย่างมีประสิทธิภาพ อันเป็นผลให้ร่างกายของสิ่งมีชีวิตนั้น สามารถดำรงชีพอยู่ได้อย่างปกติ (พิพัฒน์ เจริญศรี 2536 :140-142)

หน้าที่ของโลหิตมีหน้าที่สำคัญ ดังนี้

1.1 การขนส่ง (Transportation)

1.1.1 การขนส่งสารอาหาร (Nutrient transportation) โลหิตมีหน้าที่ขนส่งอาหารหรือผลิตภัณฑ์ของสารอาหารต่างๆ ที่ได้จากการย่อยในระบบทางเดินอาหารดูดซึมเข้าสู่เส้นโลหิตฝอยแล้วขนส่งไปสู่เนื้อเยื่อต่างๆ ทั่วร่างกาย

1.1.2 การขนส่งแก๊ส (Gaseous transportation) โดยฮีโมโกลบินซึ่งเป็นโปรตีนที่อยู่เม็ดโลหิตแดงและมีคุณสมบัติในการจับกับออกซิเจน (O_2) กลายเป็นออกซี้โมโกลบิน (Oxyhemoglobin) โดยเฉพาะที่ปอด เพื่อนำออกซิเจนไปให้เนื้อเยื่อต่างๆ นำไปใช้ในปฏิกิริยาทางเคมีขณะเดียวกันเนื้อเยื่อเหล่านี้จะมีการผลิตคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) ซึ่งจะถูกนำไปขับออกจากร่างกาย ต่อไปที่ปอด

1.1.3 การขนส่งของเสีย (Waste product transportation) ของเสียที่ได้จากขบวนการเมแทบอลิซึมในเนื้อเยื่อต่างๆ ของร่างกาย เช่น ยูเรีย กรดยูริก ครีเอตินิน เป็นต้นและพวกแร่ธาตุต่างๆ จะถูกขนส่งออกจากเนื้อเยื่อไปขับออกที่ไต ผิวหนังและอวัยวะอื่นๆ เพื่อกำจัดออกจากร่างกาย

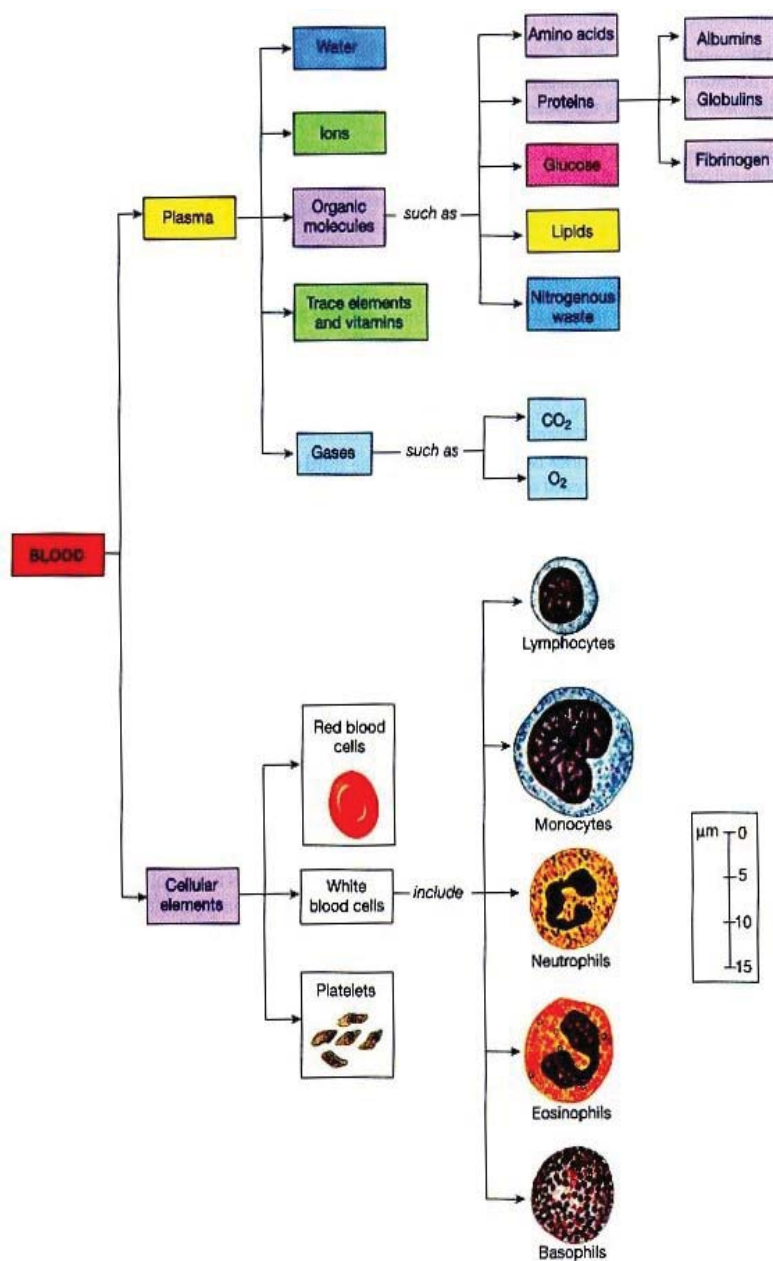
1.1.4 การขนส่งฮอร์โมน (Hormone transportation) ฮอร์โมนต่างๆ ที่ผลิตได้จากต่อมไร้ท่อ (Endocrine gland) จะถูกขนส่งไปยังเนื้อเยื่อหรืออวัยวะเป้าหมาย (Target organ) โดยโลหิต

2. องค์ประกอบของโลหิต (พิพัฒน์ เจริญรังสี 2536 :143)

โลหิตจัดเป็นเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (Connective tissue) ชนิดหนึ่ง ที่มีลักษณะเป็นของเหลวไหลเวียนอยู่ในหลอดโลหิตประกอบด้วย ส่วนที่เป็นน้ำโลหิตที่เรียกว่า พลาสมา (Plasma) เป็นของเหลวที่เป็นตัวกลาง ให้เม็ดโลหิตแขวนตัวลอยอยู่คิดเป็นสัดส่วนประมาณ 55 % ของโลหิตและส่วนที่เป็นเม็ดโลหิต (Corpuscles หรือ Formed elements) คือส่วนที่เป็นตัวเซลล์แขวนลอยไหลเวียนในหลอดโลหิตทั่วร่างกาย ได้แก่ เม็ดโลหิตแดง เม็ดโลหิตขาว และเกล็ดโลหิตหรือทอมโบไซต์ คิดเป็นสัดส่วนประมาณ 45 % ของโลหิต

2.1 พลาสมา (Plasma) (สุวรรณ ธีระวีรพันธ์ 2539 :91) พลาสมา หมายถึง น้ำโลหิตที่แยกเอาส่วนของเม็ดโลหิตออกไปแล้ว มีลักษณะเป็นของเหลวสีเหลืองใส ซึ่งมีสารต่างๆ ละลายอยู่ ได้แก่ โปรตีนชนิดต่างๆ รวมถึงปัจจัยในการแข็งตัวของโลหิต คาร์โบไฮเดรต ไขมัน วิตามิน เกลือแร่ต่างๆ (Electrolyte) ฮอร์โมน และสารอื่นๆ การแยกพลาสมาต้องเก็บโลหิตโดยใช้สารกันโลหิตแข็ง (Anticoagulants) เช่น อีดีทีเอ (EDTA, Ethylene Diamine Tetraacetate Acid) ดับเบิ้ลออกซาเลต (Double oxalate) เอซิด (ACD, Acid Citrate Dextrose) เฮปาริน (Heparin) เป็นต้น

ส่วนประกอบของพลาสมา ได้แก่ น้ำประมาณ 90 % โปรตีนชนิดต่างๆ 7 % เช่น อัลบูมิน โกลบูลิน และไฟบริโนเจน และอีก 3 % เป็นส่วนของแก๊สที่ละลายอยู่ในโลหิต อีออนต่างๆ ฮอร์โมน และสารอาหารชนิดอื่นๆ



ภาพที่ 1 องค์ประกอบของโลหิต

ที่มา: วิน เชยชมศรี, โลหิตวิทยา [ออนไลน์], เข้าถึงเมื่อ 15 พฤษภาคม 2554 เข้าถึงได้จาก

<http://www.pirun.ku.ac.th/-fsciwcc.HEMATO.PDF>

โปรตีนในพลาสมา มีคุณสมบัติทางกายภาพที่สำคัญทางสรีรวิทยาโดยอัลบูมินและโกลบูลินเป็นตัวสำคัญที่เกี่ยวข้องกับความดันออสโมติก (Colloid osmotic pressure) ในการรักษาสมดุลของน้ำในร่างกาย โกลบูลินซึ่งมีอยู่ในรูปของแอลฟา (α) เบต้า (β) และแกมมา (γ) ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างแอนติบอดี ฮอร์โมน และเอ็นไซม์ชนิดต่างๆ ไฟบริโนเจนช่วยในการแข็งตัวของโลหิต โปรตีน ทั้งหมดในพลาสมาทำหน้าที่เป็นบัฟเฟอร์ช่วยควบคุมระดับความเป็นกรด-เบสและทำให้เกิดความหนืดของโลหิตความเข้มข้นของโปรตีนเหล่านี้ได้

ตารางที่ 1 ชนิดและปริมาณโปรตีนในพลาสมา

โปรตีน	น้ำหนักโมเลกุล	ความเข้มข้น (กรัม/100 มล.พลาสมา)
อัลบูมิน	69,000	4-6
โกลบูลิน (α_1 , α_2 , β_1 , β_2 และ γ)	80,000-200,000	1.5
ไฟบริโนเจน	350,000-400,000	0.2-0.4
รวม		6-8

ที่มา: วิน เชยชมศรี, โลหิตวิทยา [ออนไลน์], เข้าถึงเมื่อ 15 พฤษภาคม 2554 เข้าถึงได้จาก
www.pirun.ku.ac.th/~fsciwcc.HEMATO.PDF

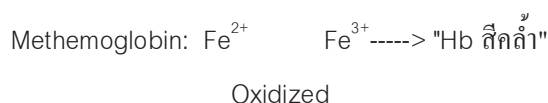
2.2 เม็ดโลหิต (Corpuscles หรือ Formed elements) เซลล์เม็ดโลหิตมีหลายชนิด โดยแบ่งเป็นชนิดใหญ่ๆ ดังนี้ (สุวรรณ ชีระวีรพันธ์ 2539 :93-94)

2.2.1 เม็ดโลหิตแดง (Erythrocyte , red blood cell) มีลักษณะเป็นถุง รูปร่างกลม ตรงกลางเว้าเข้าหากันทั้งสองด้าน (Biconcave) ทำให้รูปร่างเปลี่ยนได้มากโดยไม่ทำให้ปริมาตรเปลี่ยน เช่น ขณะผ่านหลอดโลหิตฝอย ปริมาตรจะเพิ่มได้มากโดยแรงดึงผิวและพื้นที่ผิวเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อย ภายในเม็ดโลหิตห่อหุ้มสารละลายต่างๆ ซึ่งส่วนใหญ่คือ ฮีโมโกลบิน (Hemoglobin) เอนไซม์ (Enzyme) และพวกอิออน (Ion) เพื่อทำหน้าที่ขนถ่ายออกซิเจน และคาร์บอนไดออกไซด์ระหว่างปอด และเนื้อเยื่อต่างๆ ทั่วร่างกาย และทำหน้าที่เป็นบัฟเฟอร์ที่ปรับความสมดุลของกรดและเบสของโลหิต

เม็ดโลหิตแดงถูกสร้างในไขกระดูกโดยมีความดัน ปริมาณออกซิเจนในโลหิตตลอดจน การเสียโลหิตและการได้รับโลหิต เป็นปัจจัยที่สำคัญเกี่ยวกับการสร้างโลหิตมีฮอร์โมนอีริโทรพอยติน (Erythropoietin) ในโลหิตเป็นตัวควบคุมการสร้าง เม็ดโลหิตแดงมีอายุประมาณ 120 วัน ถูกทำลายในม้าม ตับ และไขกระดูก ปริมาณเม็ดโลหิตแดงในโลหิตในเพศชายมีค่าเท่ากับ 5.5-6.0 ล้านเซลล์/ลูกบาศก์มิลลิเมตร และในเพศหญิงมีค่าเท่ากับ 4.5-5.0 ล้านเซลล์/ลูกบาศก์มิลลิเมตร โดย ปริมาณโลหิตขึ้นอยู่กับ อายุ บทบาทของร่างกาย ภูมิอากาศ ระดับความสูงของที่อยู่ พยาธิสภาพของ โรคที่เกิดกับร่างกาย การสร้างเม็ดโลหิตแดงถูกควบคุมโดยฮอร์โมน erythropoietin ในกระแส โลหิต

ฮีโมโกลบิน (Hemoglobin, Hb) คือโปรตีนในเม็ดโลหิตแดง ทำหน้าที่รับส่งแก๊ส ออกซิเจน และเป็นบัฟเฟอร์ ที่ปรับความสมดุลของกรดและเบส แต่ละโมเลกุลของฮีโมโกลบิน ประกอบด้วย 4 หน่วยย่อย แต่ละหน่วยย่อยประกอบด้วย 1 ฮีม (Heme) จับกับเปปไทด์สายยาว (Polypeptide) 1 สาย ภายในมีธาตุเหล็ก (Fe^{2+}) 1 อะตอม ฮีโมโกลบินเมื่อจับกับออกซิเจน จะ เรียกว่า ออกซีฮีโมโกลบิน (Oxyhemoglobin) โดยการจับกันของฮีโมโกลบินกับออกซิเจนขึ้นอยู่กับอุณหภูมิ ความเป็นกรด-เบส ปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์และปริมาณออกซิเจนในละลายอยู่ใน กระแสโลหิต (pCO_2 และ pO_2)

อาการไซยาโนซิส (Cyanosis) พบเมื่อโลหิตมีสีคล้ำโลหิตดำ มีฮีโมโกลบินที่ไม่ได้จับ กับออกซิเจน (Deoxyhemoglobin) อยู่มาก ผิวหนังมีลักษณะเขียวคล้ำ ซึ่งจะเห็นได้ชัดที่ เล็บมือ เล็บเท้า ริมฝีปาก ทั้งนี้ปกติเมทฮีโมโกลบิน (Methemoglobin) ซึ่งจับกับธาตุเหล็ก (Fe^{2+}) ในฮีมจะ ถูกออกซิไดซ์ไปเป็นเหล็กออกไซด์ (Fe^{3+}) ทำให้ฮีโมโกลบินมีสีคล้ำ



ปริมาตรเม็ดโลหิตแดงอัดแน่น (Hematocrit : Hct หรือ Pack Cell Volume : PCV) เป็นค่าทางโลหิตวิทยาของเม็ดโลหิตแดงสามารถหาได้จากการนำโลหิตใส่ในหลอดแก้วที่มีขนาด เล็ก (Capillary tube) นำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง มีหน่วยเป็นเปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับปริมาตรโลหิตทั้งหมด มีประโยชน์ต่อการวินิจฉัยการเกิดพยาธิสภาพของร่างกาย เช่น

ในสภาวะที่ร่างกายขาดน้ำ จะพบ Hct มีค่าสูงกว่าปกติ ในผู้ป่วยที่มีภาวะ โลหิตจาง (Anemia) มักพบ Hct มีค่าต่ำกว่าปกติ

เม็ดโลหิตแดงมีอายุเฉลี่ยประมาณ 120 วัน ระยะทางที่เคลื่อนที่ในระบบไหลเวียนประมาณ 700 ไมล์ และในที่สุดจะถูกทำลาย การเคลื่อนที่อยู่ในหลอดโลหิตนั้นย่อมมีการเสียดสีระหว่างผนังเม็ดโลหิตและหลอดโลหิต รวมทั้งสัมผัสกับสารเคมีต่างๆ ในโลหิต มีผลให้ผนังเม็ดโลหิตเสื่อม เม็ดโลหิตที่อายุมากจึงแตก (Hemolyse) ได้ง่ายซึ่งปกติอัตราการสร้างเม็ดโลหิตเท่ากับอัตราการทำลาย (ประมาณ 1% ของปริมาณเม็ดโลหิตแดงทั้งหมดต่อวัน) ถ้าอัตราสร้างสูงกว่าอัตราการทำลายมีผลให้ปริมาณเม็ดโลหิตแดงในโลหิตสูงขึ้น ปริมาณเม็ดโลหิตแดงอัดแน่นมากขึ้น (Polycythemia) และถ้าอัตราการสร้างต่ำกว่าอัตราการทำลายจะมีผลให้ปริมาณเม็ดโลหิตแดงอัดแน่นต่ำลง (Anemia)

เม็ดโลหิตแดงที่มีอายุมากจะถูกทำลายใน reticuloendothelial system ส่วนใหญ่ถูกทำลายในม้าม (spleen) ฮีโมโกลบินจะถูกแยกออกเป็น heme และ globin heme จะถูกเปลี่ยนเป็น biliverdin แล้วเป็น bilirubin เข้าสู่ตับแล้วออกมาท่อน้ำดีสู่ลำไส้เล็ก ซึ่งบางส่วนถูกดูดซึมกลับเข้าสู่ กระแสโลหิตแล้วถูกขับออกที่ไตปนออกมาท่อน้ำดีปนกับ bilirubin มีสีเหลืองท่อน้ำดีมีความเข้มข้นเกิน 2mg/100 mL พลาสมา จะทำให้ผิวหนัง scleras และ mucous membrane โลหิตมีสีเหลือง เรียกว่าอาการเช่นนี้ว่า ดีซ่าน (Jaundice) หรือ (Icterus) การเพิ่มขึ้นของปริมาณ bilirubin ในโลหิต เรียกว่า hyperbilirubinemia เกิดได้จากหลายสาเหตุเช่น เม็ดโลหิตแดงถูกทำลายมากกว่าปกติเช่น hemolytic anemia bilirubin เข้าเซลล์ตับได้น้อยลง การหลั่ง bilirubin จากเซลล์ตับสู่ bile canaliculi ผิดปกติ หรืออาจจะเกิดจากท่อน้ำดีอุดตัน

2.2.2 เม็ดโลหิตขาว (Leucocyte , white blood cell) (สุวรรณ ธีระวีรพันธ์ 2539 :93-94) เม็ดโลหิตขาวในกระแสโลหิตมีหลายชนิดโดยมีหน้าที่หลักคือป้องกันและทำลายสิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่ร่างกาย มีคุณสมบัติที่สำคัญ คือ

เม็ดโลหิตขาวสามารถเคลื่อนผ่านผนังหลอดโลหิตฝอยสู่เนื้อเยื่อไปยังบริเวณที่มีเชื้อโรค (Diapedesis)

เม็ดโลหิตขาวสามารถเคลื่อนเข้าไปหาเชื้อโรค โดยการดึงดูดของสารเคมีที่ถูกปล่อยจากเชื้อโรค เช่น แบคทีเรีย (Chemotaxis) เป็นต้น

เม็ดโลหิตขาวสามารถจับกับสิ่งแปลกปลอมโดยวิธีคล้ายอะมีบา เข้าโอบล้อมและย่อยเชื้อโรค หรือสิ่งแปลกปลอมนั้น (Phagocytosis) แบ่งเม็ดโลหิตขาวออกเป็น 2 ชนิด คือ

2.2.2.1 ชนิดมีแกรนูโลหรือมีนิวเคลียสหลายแบบ (Granulocytic or polymorpho nuclear cell) ซึ่งจะแบ่งย่อยตามลักษณะการติดสีของแกรนูโลเมื่อย้อมด้วยสีไรท์ ดังนี้

นิวโทรฟิล (Neutrophil or polymorphonuclear cell : PMN) มีขนาดใหญ่กว่าเม็ดโลหิตแดงประมาณ 2 เท่า หรือประมาณ 12 ไมครอน นิวเคลียสได้ตั้งแต่ 2-5 พู (lobe) ติดสีน้ำเงินปนม่วง ในไซโทพลาซึมมีแกรนูโลละเอียดมากติดสีชมพู หรือชมพูอมม่วง

อีโอสิโนฟิล (Eosinophil) มีขนาดประมาณ 12 ไมครอน รูปร่างเหมือนนิวโทรฟิลต่างกันที่ส่วนใหญ่นิวเคลียสจะมี 2 พูในไซโทพลาซึมจะมีแกรนูโลเม็ดใหญ่ ติดสีส้มแดงค่อนข้างขาวแสงอยู่เต็มไซโทพลาซึม และมักจะไม่มีทับนิวเคลียส

เบโซฟิล (Basophil) รูปร่างเหมือนนิวโทรฟิล ต่างกันที่ นิวเคลียสมีได้ตั้งแต่ 2-5 พู แต่มักจะเห็นนิวเคลียสได้ไม่ชัด เนื่องจากถูกบดบังด้วยแกรนูโลซึ่งมีขนาดใหญ่ ติดสีน้ำเงินเข้มกระจายทั่วไซโทพลาซึม

2.2.2.2 ชนิดไม่มีแกรนูโลหรือมีนิวเคลียสเดี่ยว (Agranulocytic or mononuclear cell) หมายถึง เม็ดโลหิตขาวที่ไม่มีแกรนูโลเฉพาะ (Specific granule) มีแต่แกรนูโลไม่เฉพาะ (Non specific granule) ซึ่งพบได้ในเซลล์เม็ดโลหิตขาวทุกชนิด เรียก อะซูโรฟิลิกแกรนูโล (Azurophilic granule) ติดสีแดงอยู่ในไซโทพลาซึม เม็ดโลหิตขาวชนิดไม่มีแกรนูโลนี้ นิวเคลียสจะไม่แบ่งเป็นพู แต่อาจมีรอยบุ๋มเว้า (Indented) เป็นลอนเหมือนรอยพับ (Folding) แบ่งย่อยได้ดังนี้

โมโนไซต์ (Monocyte) เป็นเม็ดโลหิตขาวที่มีขนาดใหญ่ที่สุดในกระแสโลหิต ขนาดใหญ่กว่าเม็ดโลหิตแดงประมาณ 2-3 เท่า หรือประมาณ 14-20 ไมครอน นิวเคลียสมักจะเว้าหรือเป็นลอน ไซโทพลาซึมติดสีเทาอ่อนๆ หรือน้ำเงินปนเทา และอะซูโรฟิลิกแกรนูโล เป็นเม็ดเล็กๆ ติดสีแดงกระจายอยู่ทั่วไป

ลิมโฟไซต์ (Lymphocyte) โดยทั่วไปเป็นเม็ดโลหิตขาวที่มีขนาดเล็กที่สุดใหญ่กว่าเม็ดโลหิตแดงเล็กน้อย (ขนาดประมาณ 10 ไมครอน) แต่บางครั้งอาจพบที่มีขนาดใหญ่ได้ (20 ไมครอน) นิวเคลียสมักจะกลมและอาจมีรอยเว้าได้บ้างติดสีเข้มที่ขอบชิดริมด้านใดด้านหนึ่งของเซลล์ ไซโทพลาซึมติดสีฟ้าอ่อนใสและพบอะซูโรฟิลิกแกรนูโลได้บ้าง

2.3.เกล็ดเลือด (Thrombocyte , platelet) (สุวรรณ ชีระวีรพันธ์ 2539 :94-95)

เป็นองค์ประกอบของเลือดที่มีขนาดเล็กที่สุด ประมาณ 2-4 ไมครอน ไม่มีนิวเคลียส ส่วนใหญ่รูปร่างกลมแบน หรือ รูปไข่ ดิสก์ฟลาต มีพอบะซุโรฟิลิกแกรนูลดิสก์ฟลาตหรือมีวงแหวนกระจายอยู่ทั่วไปกลางเซลล์ในคนและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมชนิดอื่นๆ มีต้นกำเนิดมาจากเซลล์เมกะการิโอไซต์ (Megakaryocyte) ในไขกระดูกในสัตว์มีกระดูกสันหลังชนิดอื่น จะพบองค์ประกอบนี้เป็นเซลล์ที่เรียกว่า ทอมโบไซต์ (Thrombocyte) ทำหน้าที่สำคัญ เกี่ยวกับการแข็งตัวของเลือด ช่วยทำให้เลือดหยุดไหลหรือห้ามเลือดเมื่อเกิดบาดแผล

2.3.1 กลไกห้ามเลือด (Homeostasis) ประกอบด้วย ขั้นตอนที่สำคัญ คือ

หลอดเลือดหดตัว (Vasoconstriction) เมื่อเกิดบาดแผล สารซีโรโทนิน (Serotonin) จากเกล็ดเลือดจะกระตุ้นให้หลอดเลือดหดตัว

การเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือด (Platelet aggregation) คือเซลล์ที่ได้รับความเสียหาย และเกล็ดเลือด จะปล่อยสาร ADP (Adenosine diphosphate) ออกมาทำให้เกล็ดเลือดเกิดการเปลี่ยนรูปร่าง และรวมกัน (Aggregate)อุดหลอดเลือดที่เกิดบาดแผล

2.3.2 การแข็งตัวของเลือด (Coagulation, clot) เกิดจากปฏิกิริยาของเกล็ดเลือด สารต่างๆ ในพลาสมา และสารจากเนื้อเยื่อที่เกิดบาดแผล แบ่งเป็น 4 ขั้นตอนย่อย คือ

2.3.2.1 การเกิดการกระตุ้นโปรทรอมบิน (Prothrombin activation) แบ่งย่อยได้เป็น 2 ขบวนการ คือ

Extrinsic pathway เกิดจากการทำลายเซลล์หลอดเลือด และเซลล์ข้างเคียงจะกระตุ้นให้เซลล์เหล่านี้สร้างทอมโบพลาสติน (Tissue thromboplastin)

Intrinsic pathway เกิดขึ้นภายในหลอดเลือดเมื่อเกล็ดเลือดเกิดการแตก จะมีการทำปฏิกิริยากันของสารที่หลั่งออกมาจากเกล็ดเลือดและปัจจัยการแข็งตัวของเลือดได้ ทอมโบพลาสติน (Intrinsic thromboplastin)

2.3.2.2 การเปลี่ยนโปรทรอมบิน (Prothrombin) เป็นทรอมบิน (Thrombin) ทอมโบพลาสติน (Thromboplastin) ที่เกิดขึ้นจะกระตุ้นการเปลี่ยนโปรทรอมบิน เป็นทรอมบิน

2.3.2.3 การเปลี่ยนไฟบริโนเจน (Fibrinogen) เป็นไฟбрิน (Fibrin) ทรอมบินที่เกิดขึ้นจะเปลี่ยนไฟบริโนเจนเป็นไฟบรินโดยใช้แคลเซียมไอออน (Ca^{2+}) และปัจจัยการแข็งตัวของเลือดชนิดต่างๆ ไฟบรินเป็นเส้นใยโปรตีนที่ไม่ละลายน้ำมีการรวมตัวกันแน่นประสานเป็นร่างแห และยึดจับกับเม็ดเลือดแดงกลายเป็นก้อนเลือด (Clot)

2.3.2.4 การเกิดการหดตัวของก้อนโลหิต (Clot retraction) มีการหดตัวของก้อนโลหิตและร่างแห ทำให้น้ำโลหิต (ซีรัม) ออกจากก้อนโลหิตและเป็นผลให้เกิดการเชื่อมติดบาดแผลมากขึ้น บาดแผลหลังจากเกิดก้อนโลหิตอุดบาดแผลและไม่มีโลหิตไหลออกมาแล้วเซลล์ไฟโบรบลาส (Fibroblast) จะทำหน้าที่เป็นเนื้อเยื่อประสาน เจริญแทรกเข้าไปในก้อนโลหิต โดยปกติร่างกายของมนุษย์จะมีสารป้องกันการเกิดก้อนโลหิตที่เกิดจากขบวนการการแข็งตัว ซึ่งอาจจะไปอุดตันหลอดเลือดในอวัยวะที่สำคัญ เช่น สมอง สารเหล่านี้ได้แก่ แอนติทროมโบพลาสติน (Antithromboplastin) แอนติทროมบิโน (Antithrombin) และเฮปาริน

3. การเก็บวัตถุพยาน

อรรถพล แซ่มสุวรรณวงศ์ (2546 : 131-136) ได้กล่าวถึงหลักการเก็บรวบรวมวัตถุพยานไว้ว่า ขณะทำการตรวจค้นหาพยานหลักฐาน เมื่อพบสิ่งใดที่ใช้เป็นพยานวัตถุได้ ผู้เก็บต้องมีหลักการที่พึงปฏิบัติเสมอ

3.1 ขั้นตอนการเก็บวัตถุพยาน

3.1.1 บันทึกตำแหน่งและสภาพของพยานวัตถุ เมื่อตรวจพบสิ่งใดระหว่างการตรวจสถานที่เกิดเหตุ ก่อนจะจับต้องหรือหยิบขึ้นมาต้องมีการบันทึกตำแหน่งและสภาพของวัตถุพยานนั้นให้เรียบร้อยเสียก่อน

3.1.2 ถ่ายภาพวัตถุที่ตรวจพบไว้ พยานวัตถุทุกชิ้นต้องทำการถ่ายภาพไว้ก่อนทำการเก็บและควรถ่ายภาพทั้งในระยะไกลและใกล้ การถ่ายภาพระยะไกลเพื่อยืนยันตำแหน่งที่พบ และแสดงความสัมพันธ์ของพยานวัตถุนั้นกับสภาพโดยรอบ ส่วนการถ่ายระยะใกล้เพื่อให้เห็นพยานวัตถุจริงที่จะทำการเก็บ ซึ่งการถ่ายภาพระยะใกล้ควรมีมาตราวัดระยะกำกับทุกครั้งเพื่อจะได้ทราบขนาดที่แน่นอนของวัตถุจากการถ่ายภาพ

3.1.3 ทำคำหนังสือลักษณะลงบนพยานวัตถุที่ตรวจพบ หรือบนภาชนะที่ใช้บรรจุ เพื่อเป็นหลักฐานว่าเป็นสิ่งที่ตรวจพบในคดีใด เมื่อใด โดยผู้ใด การทำคำหนังสือควรทำที่พยานวัตถุทุกชิ้น และ ทำในตำแหน่งที่จะไม่กระทบกระเทือนต่อการตรวจพิสูจน์

3.1.4 การเก็บรวบรวม เป็นขั้นตอนสุดท้ายของการปฏิบัติ ต่อพยานวัตถุเพื่อนำไปดำเนินการทางคดีต่อไป ขั้นตอนนี้มีความสำคัญ เพราะหากบกพร่อง อาจทำให้เกิดการสูญเสีย หรือแปลสภาพของพยานวัตถุที่จะตามมาได้ หากผู้เก็บรวบรวม ปฏิบัติไม่ถูกต้องตามหลักวิธี ในการเก็บพยานวัตถุ จะต้องเก็บรวบรวมพยานวัตถุที่สูญหาย หรือเสียหายได้ง่ายเป็นลำดับแรก ในกรณีที่มี

พยานวัตถุหลายชิ้นต้องแยกบรรจุ ไม่นำเก็บไว้ในที่เดียวกัน เพราะอาจทำให้เกิดการสลับพยานวัตถุ และพยานวัตถุบางชนิดอาจเสียหายไป

3.2 วิธีการเก็บคราบโลหิต (โลหิตเปียก)

3.2.1 มีปริมาณคราบโลหิตมากหรือเป็นกองโลหิต

3.2.1.1 ใช้ที่หยอดตา (Eyedropper) หรือ หลอดฉีดยา ดูดเก็บของเหลวใส่ไว้ในภาชนะบรรจุ ที่ผ่านการฆ่าเชื้อโรค (Sterile) ปริมาณที่ใช้สำหรับการตรวจพิสูจน์ ประมาณ 5 มิลลิลิตร

3.2.1.2 ใช้น้ำส่งตรวจพิสูจน์ทันทีทันใด ถ้าไม่สามารถทำได้ให้แช่ไว้ในตู้เย็นหรือถุงน้ำแข็ง แต่ห้ามนำไปแช่แข็งโดยเด็ดขาด

3.2.1.3 ในบางประเทศศาลอาญา อนุญาตให้ใช้สารเคมี เช่น โซเดียมอะไซด์ ใส่ลงไปเพื่อป้องกันโลหิตเสียหาย

3.2.2 มีปริมาณคราบโลหิตน้อย

3.2.2.1 ใช้สำลีชนิด 100 % หรือผ้าก๊อช กระดาษซับ ผ้าขาวสะอาด กระดาษเยื่อ ใดๆอย่างหนึ่ง ซับเก็บขึ้นมา

3.2.2.2 นำไปผึ่งลมให้แห้ง ห้ามผึ่งแดด เพื่อป้องกันไม่ให้โลหิตเสียหรือเสื่อมสภาพ

3.2.2.3 เก็บในหลอดทดลอง หรือภาชนะที่ผ่านการฆ่าเชื้อโรคแล้ว

3.3 วิธีการเก็บคราบโลหิต (โลหิตแห้ง)

3.3.1 บนผิววัตถุที่ไม่ดูดซึม ถ้าปริมาณโลหิตแห้งไม่เพียงพอ ให้ใช้ใบมีดโกนที่สะอาดขูดออกจากผิววัตถุ กรณีที่ไม่สามารถใช้วิธีการขูดได้ ให้ใช้กระดาษซับ กระดาษเยื่อ สำลี ผ้าก๊อช ใดๆอย่างหนึ่งที่สะอาด ขนาดพอสมควร ขูดน้ำเกลือ (น้ำเกลือผสมร้อยละ 0.9) หรือน้ำกลั่น ปิดตรงคราบโลหิตจนกระทั่งโลหิตซึมซับออกมาที่กระดาษ (สังเกตจากสี) และนำกระดาษผึ่งลมให้แห้งวิธีนี้ต้องนำของกลางตัวอย่าง (Control Sample) ส่งไปตรวจพิสูจน์พร้อมกับของกลางปัญหาด้วย และไว้ในภาชนะที่ผ่านการฆ่าเชื้อโรค

3.3.2 บนพื้นผิววัตถุดูดซึม เช่น ไม้ที่เคลือบผิว สิ่งที่ทำจากเส้นใย

3.3.2.1 นำวัสดุที่มีคราบโลหิตส่งตรวจพิสูจน์ทั้งชิ้น เช่น เสื้อผ้า ท่อนไม้ที่สงสัยว่าคนร้ายใช้ผู้ตาย

3.3.2.2 ให้แยกบรรจุหีบห่อ เช่น เสื้อผ้าผู้ตาย ต้องไม่เก็บรวมกับเสื้อผ้าผู้ต้องสงสัย และเก็บไว้ในภาชนะที่ผ่านการฆ่าเชื้อโรค ถ้าวัตถุนั้นมีขนาดใหญ่เกินไปไม่สะดวกในการ

นำส่งตรวจพิสูจน์ทั้งชิ้นให้แยกหรือถอด หรือตัดเฉพาะส่วนที่มีคราบ โลหิตติดอยู่ปริมาณเพียงพอ นำส่งตรวจพิสูจน์

อุปกรณ์เก็บโลหิต เช่น ใบมีดโกน มีด สำลี ใช้ได้สำหรับคราบโลหิตเดียวเท่านั้น เมื่อจะทำการเก็บคราบโลหิตใหม่ก็ต้องเปลี่ยน เพื่อป้องกันการปนเปื้อน นอกจากนี้ควรระมัดระวังอย่าจับต้องอุปกรณ์ตรงบริเวณที่จะสัมผัสกับคราบโลหิตของกลาง เนื่องจากสารจากร่างกายอาจปนเปื้อนกับคราบโลหิตของกลางในขณะที่ทำการเก็บ

4. การตรวจคราบโลหิต (พ.ต.ท.หญิง ธรรมภรณ์ ธนวัฒน์วงศ์ธร 2548:80-81)

ในคดีอาญาประเภทประทุษร้ายต่อร่างกายและชีวิต เช่น คดีฆาตกรรม ข่มขืนกระทำชำเรา และคดีอื่นๆ ที่คล้ายคลึงกับคดีเหล่านี้ รอยคราบโลหิตจะเป็นหลักฐานสำคัญอันหนึ่งเสมอ ในคดีเหล่านี้จะพบคราบโลหิตจากบริเวณดังกล่าว คือ

จากตัวผู้ถูกประทุษร้าย

จากสถานที่เกิดเหตุ

จากตัวผู้ร้าย

จากอาวุธที่ใช้

4.1 การตรวจพิสูจน์ว่าคราบนั้นเป็นคราบโลหิตหรือไม่

เป็นการพิสูจน์ทางเคมีที่นำยาทำปฏิกิริยากับเหล็กหรือที่มาจากธาตุเหล็กในเม็ดโลหิตแดง น้ำยาที่ใช้คือเบนซิดีน (Benzidine) กับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Hydrogen Peroxide) เมื่อโลหิตทำปฏิกิริยากับเบนซิดีนกลายเป็นออกไซด์ซึ่งไม่มีสี จากนั้นใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ทำปฏิกิริยากับออกไซด์ของโลหิต ซึ่งจะทำให้เกิดสีน้ำเงินปรากฏขึ้น ความไวต่อยาเบนซิดีนต่อโลหิตในอัตราส่วน 1 ต่อ 300,000 เท่าทำให้สามารถทดสอบว่าเป็นโลหิตหรือสิ่งที่สงสัยว่า มีคราบโลหิตติดอยู่ได้ ถึงแม้ว่าคราบโลหิตนั้นจะจางลงไปถึง 300,000 เท่า ถือได้ว่าวิธีเบนซิดีนจึงเป็นวิธีที่สะดวกในการตรวจหาโลหิต

4.2 การตรวจพิสูจน์ว่าเป็นโลหิตมนุษย์หรือสัตว์

หลังจากการตรวจพิสูจน์ว่าสิ่งที่สงสัยเป็นโลหิตแล้ว ต่อไปเป็นการตรวจพิสูจน์ว่าโลหิตนั้นเป็นโลหิตของมนุษย์หรือสัตว์ วิธีการที่ใช้เรียกว่า วิธีพรีซิปีติน (Precipitin test) คราบโลหิตที่พบนั่นอาจจะติดอยู่กับสิ่งของต่างๆ เช่น เสื้อผ้า พื้น หรืออาวุธ โดยพยายามละลายคราบโลหิตกับน้ำเกลือ (Normal saline) ประมาณ 2-3 หยด โลหิตที่ละลายอยู่ในน้ำเกลือนี้นี้ถ้าขุ่นหรือมีเศษผงผสมอยู่ควรนำไปปั่นให้ตกตะกอนหรือกรองผงออกก่อน ใส่แอนตี้ซีรัมแมนชีรั่ม ลงใน

หลอดแก้วขนาดเล็ก กว้างประมาณ 5 mm จากนั้นใส่สารละลายโลหิตไปอย่างช้าๆ ในปริมาณที่เท่ากับแอนตี้ฮีโมโกลบินซีรัม ระวังไม่ให้น้ำเกลือกับแอนตี้ฮีโมโกลบินซีรัมผสมกัน ถ้าโลหิตที่ละลายอยู่ในน้ำเกลือเป็นโลหิตมนุษย์ วงสีขาวจะเกิดขึ้นตรงบริเวณรอยต่อของสารละลายทั้งสองนี้

4.3 การตรวจพิสูจน์ว่าเป็นโลหิตสัตว์นั้นเป็นสัตว์ชนิดใด

ถ้าโลหิตที่ละลายในน้ำเกลือมีใช้โลหิตมนุษย์กล่าวคือ ไม่มีวงขาวในหลอดแก้วบริเวณรอยต่อของแอนตี้ฮีโมโกลบินซีรัมกับสารละลายโลหิตในน้ำเกลือ จากนั้นจะพิสูจน์ต่อไปว่าเป็นโลหิตของสัตว์ชนิดใด โดยใช้หยดน้ำแอนตี้ฮีโมโกลบินซีรัมของสัตว์ชนิดต่างๆ มาทำการทดสอบ ถ้ามีวงขาวเกิดขึ้นในหลอดแก้วที่ใช้กับแอนตี้ฮีโมโกลบินซีรัมของสัตว์ชนิดใดก็หมายถึงโลหิตที่ละลายอยู่ในน้ำเกลือนั้นเป็นโลหิตของสัตว์ชนิดนั้น

4.4 การตรวจพิสูจน์หาหมู่โลหิตจากคราบโลหิตมนุษย์

การตรวจหาหมู่โลหิตแบ่งได้ออกเป็น 2 ประเภทคือ ประเภทโลหิตแห้ง ประเภทโลหิตสด ในร่างกายมนุษย์มีแอนติเจนอยู่ 2 ชนิดคือ ชนิด A ชนิด B และมีแอนติบอดีอยู่ 2 ชนิดคือ แอนติบอดี A และแอนติบอดี B ในการตรวจหาหมู่โลหิตจากวัตถุของกลางต่างๆ เช่น เสื้อผ้าและอาวุธนั้น จำเป็นจะต้องใช้คือ

เม็ดโลหิตหมู่ A และ B ผสมลงในน้ำเกลือประมาณ 2%

แอนติบอดี A และแอนติบอดี B เจือจางพอที่จะทำให้เม็ดโลหิตเกาะกันประมาณ

15 นาที

วัตถุของกลางที่พบคราบโลหิตแล้วนั้น ตัดส่วนที่พบคราบโลหิตมากที่สุด ใส่ลงในหลอดทดลอง 2 หลอด ใส่แอนติบอดี A ลงในหลอดแรก และใส่แอนติบอดี B ลงในหลอดที่สอง ปริมาณแอนติบอดีที่ใส่ไปควรพอที่จะทำให้คราบโลหิตละลายออกมา หากปิดหลอดทดลองแล้วใส่เอาไว้ในตู้เย็นประมาณ 8 ชั่วโมง โลหิตจะมีสีแดงหรือสีน้ำตาลแล้วแต่ว่าโลหิตจะละลายมากแค่ไหน นำแผ่นแก้วมาแบ่งออกเป็นสองด้าน โดยด้านซ้ายใส่หลอดที่แช่ แอนติบอดี A ส่วนด้านขวาใส่น้ำจากหลอดที่แช่ แอนติบอดี B ประมาณ 1-2 หยด เอาเม็ดโลหิตหมู่เอ ใส่ผสมลงไปทางด้านซ้าย และเอาเม็ดโลหิตหมู่บี ใส่ผสมลงไปทางด้านขวา ด้านละ 1 หยดเอียงแผ่นกระจกไปมาเพื่อให้น้ำซีรัมกับเม็ดโลหิตผสมกัน หลังจากใส่เม็ดโลหิตลงไปแล้ว สังเกตดูว่าเม็ดโลหิตเกาะกันหรือไม่ โดยใช้กล้องจุลทรรศน์ ถ้าเม็ดโลหิตเกาะกันทั้ง 2 ด้านแสดงว่าเป็นโลหิตหมู่ โอ

ถ้าเม็ดโลหิตไม่เกาะกันทั้ง 2 ด้านแสดงว่าเป็นโลหิตหมู่ เอบี

ถ้าเม็ดโลหิตไม่เกาะด้านซ้ายแต่เกาะด้านขวาแสดงว่าเป็นโลหิตหมู่ เอ

ถ้าเม็ดโลหิตเกาะด้านซ้ายแต่ไม่เกาะด้านขวาแสดงว่าเป็นโลหิตหมู่ บี

5. ความรู้เกี่ยวกับอินฟราเรดสเปกโทรสโคปี (ฉันทนา อารมย์ดี 2535 :64-66)

อินฟราเรดสเปกโทรสโคปีเป็นเทคนิคที่นำแสงอินฟราเรดมาประยุกต์ใช้ในการพิสูจน์เอกลักษณ์, หาสูตรโครงสร้างหรือหาปริมาณของสาร โดยโมเลกุลของสารแต่ละชนิดจะดูดกลืนแสงอินฟราเรดในช่วงความถี่ที่มีค่าเฉพาะแล้วทำให้เกิดการเคลื่อนไหวของพันธะปรากฏการณ์ที่เกิดขึ้นจะถูกบันทึกเป็นสเปกตรัมซึ่งแสดงลักษณะเฉพาะตัวของแต่ละสาร

6. แสงอินฟราเรด

แสงอินฟราเรดเป็นคลื่นรังสีแม่เหล็กไฟฟ้าที่มีความยาวคลื่นอยู่ในช่วงที่มองเห็น (Visible light) และ microwave ส่วนที่นำมาใช้ประโยชน์ในอินฟราเรดสเปกโทรสโคปีคือ ช่วงอินฟราเรดกลางซึ่งมีความยาวคลื่น 2.5-25 ไมโครมิเตอร์

ช่วงคลื่นของอินฟราเรด

Region	Wavelength range (nm)	Wavenumber range (cm ⁻¹)
Near	0.78 -2.5	12800 - 4000
Middle	2.5 -50	4000 - 200
Far	50 -1000	200 -10

7. การดูดกลืนแสงอินฟราเรด

การดูดกลืนแสงอินฟราเรดของสารมีลักษณะเช่นเดียวกับการดูดกลืนแสงชนิดอื่นๆ นั่นคือ โมเลกุลหนึ่งๆจะดูดกลืนแสงที่มีพลังงานพอดีที่ทำให้เกิดการกระตุ้นหนึ่งๆเท่านั้นแต่แสงอินฟราเรดมีพลังงานต่ำ เมื่อโมเลกุลดูดกลืนแสงจึงทำให้เกิดเพียงการเคลื่อนไหวของพันธะ โดยพันธะแต่ละชนิดจะดูดกลืนแสงที่มีความถี่เฉพาะแตกต่างกันไป การดูดกลืนขนาดพลังงานที่เฉพาะนี้ เราเรียกว่าเป็น quantized energy ผลของการดูดกลืนพลังงานที่เฉพาะนี้ ทำให้เราทราบได้ว่าเป็นการดูดกลืนแสงที่เกิดจากพันธะชนิดใด อย่างไรก็ตาม หากการเคลื่อนไหวของพันธะเป็นการเคลื่อนไหวในลักษณะที่ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง dipole moment แล้วเราจะตรวจไม่พบการดูดกลืนแสงของพันธะนั้น ๆ ยิ่งการเคลื่อนไหวของพันธะที่ก่อให้เกิด dipole moment มากเท่าใด สัญญาณที่ตรวจได้จะยิ่งสูงขึ้นเท่านั้น

8. ลักษณะการสั่นของพันธะ

8.1 การสั่นแบบพื้นฐาน (Fundamental vibration) แบ่งได้เป็นสองชนิดคือ

8.1.1 การยืด (Stretching) เป็นการเปลี่ยนแปลงระยะทางระหว่างอะตอมตามแนวแกนพันธะ แต่มุมของพันธะไม่เปลี่ยนแปลง

8.1.2 การงอ (Bending) เป็นการสั่นที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของมุมระหว่างอะตอม เช่น การขยับเข้าหากันและแยกกันแบบกรรไกร (Scissoring) การเหวี่ยง (Rocking) การกระดิก (Wagging) การบิด (Twisting)

โดยทั่วไปการยืดจะใช้พลังงานสูงกว่าการงอสำหรับกลุ่มอะตอมที่มีอะตอมที่เหมือนกัน อยู่สองอะตอม จะพบการยืดและการงอสองแบบคือ แบบสมมาตร (Symmetric) และแบบอสมมาตร (Asymmetric) โดยพลังงานที่ทำให้เกิดการยืดแบบอสมมาตรจะสูงกว่าการยืดแบบสมมาตร

8.2 การสั่นแบบซับซ้อน (Complicated vibration) เป็นการสั่นที่มีผลสืบเนื่องมาจากการสั่นแบบพื้นฐาน แบ่งเป็น

8.2.1 Overtone เป็นการสั่นที่มีผลจากการสั่นแบบพื้นฐานที่แรงมาก ทำให้เกิดระลอกคลื่นกระจายออก ซึ่งระลอกที่ถัดออกมาจะมีความถี่เป็นสองเท่า (Overtone ที่ 1) หรือสามเท่า (Overtone ที่ 2) ของความถี่เดิม

8.2.2 Combination band เมื่อการสั่นแบบพื้นฐานของ 2 พันธะที่มีความถี่หนึ่ง ($\bar{\nu}_1$) มาประสานกันความถี่หนึ่ง ($\bar{\nu}_2$) band ที่เกิดขึ้นใหม่จะมีความถี่เท่ากับผลบวกของแต่ละอันมารวมกัน

8.2.3 Difference band เป็นการสั่นที่เกิดจากการหักล้างกันของการสั่นแบบพื้นฐานของสองพันธะ

8.2.4 Fermi resonance เกิดเนื่องจากตำแหน่งของความถี่ของการเกิด overtone หรือ combination band ใกล้เคียงกับตำแหน่งของความถี่ของ fundamental band ทำให้เกิดการ coupling กัน

9. อินฟราเรดสเปกตรัม

อินฟราเรดสเปกตรัมเป็นกราฟที่เกิดจากการพล็อตระหว่างแสงที่ผ่านตัวอย่างออกมา (Transmittance light) โดยคำนวณเป็น % transmittance (%T) (อัตราส่วนระหว่างความเข้มของ

แสงที่ผ่านสารตัวอย่างต่อความเข้มของแสงที่ตกกระทบบนสารตัวอย่าง $\times 100$) (แกน y) กับจำนวนคลื่น (แกน x)

10. ส่วนประกอบของเครื่องอินฟราเรดสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (แมน อมรสิทธิ์ 2535 :112)

เครื่องอินฟราเรดสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ โดยทั่วไปประกอบด้วย 5 ส่วน คือ

10.1 IR source แหล่งกำเนิดแสง เป็นส่วนที่ผลิตหรือแปลงแสงให้เป็นแสงในช่วงจำนวนคลื่นที่ต้องการ หลอดที่นำมาใช้เป็นเครื่องกำเนิดแสงจะต้องมีไส้หลอดที่สามารถให้รังสีอินฟราเรดได้ ชนิดที่นิยมใช้ได้แก่ Nernst glower, Globar และ Nichrome coil เป็นต้น

10.2. Sampling area ในระหว่างทางเดินของแสงจะมีบริเวณที่วางตัวอย่าง ลักษณะเป็นหน้าต่างและมีส่วนที่เสียบ sample cell สารที่ใช้เป็นตัวกลางยึดจับ sample ต้องทำด้วยวัสดุที่ยอมให้แสงอินฟราเรดผ่าน เช่น NaCl, KBr, AgCl, AgBr, CaF₂, BaF₂ เป็นต้น การเลือกใช้ต้องคำนึงช่วงความถี่ของแสงที่สารเหล่านี้นยอมให้ผ่าน ลักษณะตัวอย่าง ช่วงความถี่ของแสงที่ sample ดูดกลืน

10.3 Monochromator ตัวแยกความถี่แสง เป็นตัวแยกรังสีหรือจัดลำดับรังสีของแสง อาจทำได้ด้วย prism หรือ grating

10.4 Detector เครื่องตรวจสัญญาณ เป็นส่วนที่รับพลังงานแสงขั้นสุดท้ายแล้วแปลงออกมาเป็นสัญญาณส่งเข้าเครื่องบันทึกสัญญาณ

10.5 Recorder เครื่องบันทึกสัญญาณทำหน้าที่รับสัญญาณจาก Detector แล้วแสดงผลลัพธ์ ออกมา โดยมากจะแสดงเป็นเส้นกราฟที่เรียกว่าสเปกตรัม

11. ชนิดของเครื่องอินฟราเรดสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (ณรงค์ ไซตสุต 2548 :201)

เครื่องมืออินฟราเรด (Infrared instruments) มี 3 แบบ คือ

11.1 มาตรฐานสเปกโทรแบบกระจาย (Dispersive) ใช้เกรตติงแบบสะท้อนแสงแยกความยาวคลื่น ใช้งานคุณภาพวิเคราะห์

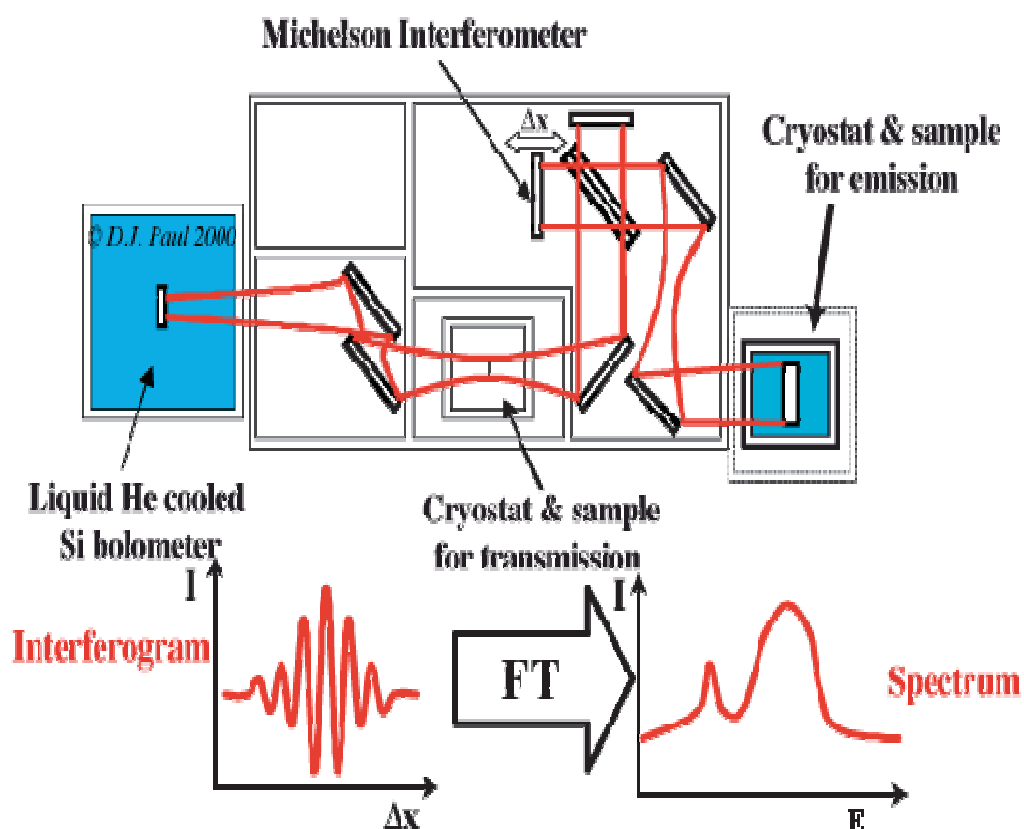
11.2 เครื่องมือแบบมัลติเพล็กซ์ (Multiplex) ใช้เทคนิคฟลูเรียร์ทรานส์ฟอร์ม ใช้งานคุณภาพและปริมาณวิเคราะห์

11.3 มาตรฐานแสงแบบไม่กระจาย (Nondispersive) ใช้งานปริมาณวิเคราะห์สารอินทรีย์ในบรรยากาศ โดยวิธีสเปกโทรชนิดดูดกลืน แปลง และสะท้อน

ก่อนปี ค.ศ.1980 Infrared Spectrometers เป็นแบบกระจาย ปัจจุบันนิยมใช้เครื่องมืออินฟราเรดแบบ Fourier transform มากกว่าแบบกระจาย เพราะราคาลดลง ให้ผลแน่นอน

12. Fourier Transform Infrared Spectrophotometer (FTIR) (แม้น อมรสิทธิ์ 2535 :118)

FTIR มีหลักการทำงานคล้ายกับ Dispersive infrared spectrophotometer แต่ใช้ interferometer แทน monochromator โดย FTIR จะวัดความเข้มของแสงที่จำนวนคลื่นต่าง ๆ อย่างต่อเนื่องเทียบกับเวลาแล้วแปลผลด้วยสูตรทางคณิตศาสตร์เรียกว่า Fourier transformation



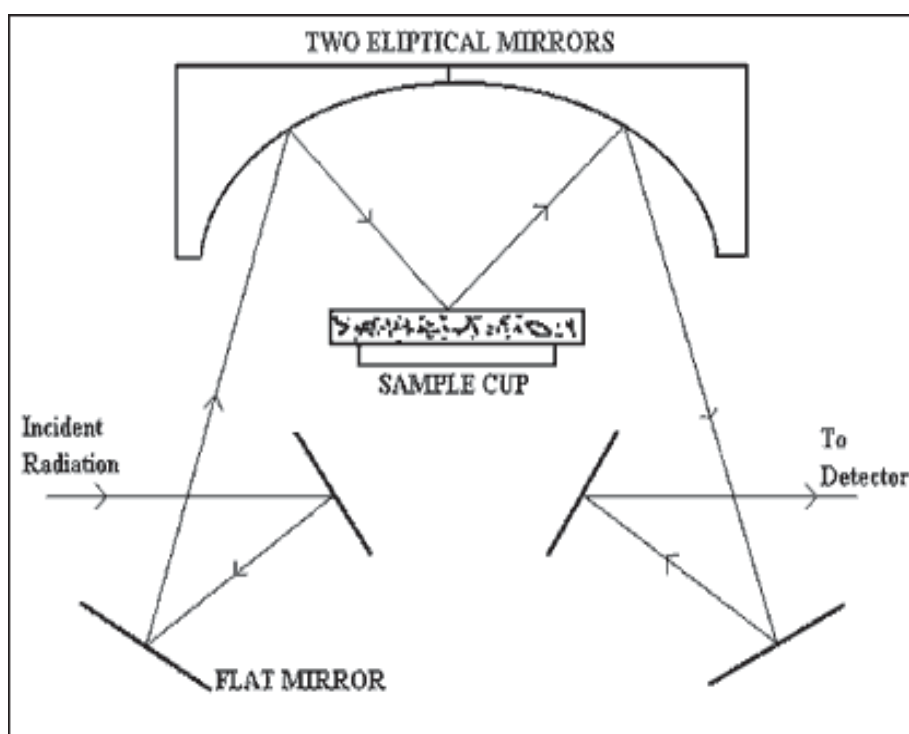
ภาพที่ 2 Fourier Transform Infrared Spectrophotometer

ที่มา : Anonymous. [FTIR Diagram block](http://faculty.sdmiramar.edu/fgarces/LabMatters/Instruments/FTIR/Pic_FTIR/FTIR-1.gif)[Online], Accessed 24 May 2011. Available from http://faculty.sdmiramar.edu/fgarces/LabMatters/Instruments/FTIR/Pic_FTIR/FTIR-1.gif

FTIR มีข้อดีเหนือกว่าชนิด Dispersive คือ สามารถตรวจวัด (Scan) ได้รวดเร็วมีความไวและความเที่ยงตรงสูงกว่า ให้สเปกตรัมที่มีความละเอียดและชัดเจนกว่า แต่มีราคาแพง

13. Diffuse Reflection Infrared Fourier Transform (DRIFT) (แมน อมรสิทธิ์ 2535 :120)

เป็นเทคนิคที่มีความเหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ตัวอย่างที่มีผิวขรุขระหรือมีลักษณะที่เป็นผง เทคนิค DRIFT มีทั้งกระบวนการ Reflection และ Diffraction ของแสงเกิดขึ้นในเวลาเดียวกัน โดยที่มุมของแสงตกกระทบกับตัวอย่างจะแตกต่างจากมุมของแสงที่สะท้อนออก แสงที่สะท้อนออกจะถูกรวบรวมด้วยกระจกลังดังภาพที่ 3



ภาพที่ 3 ทิศทางการเคลื่อนที่ของแสงด้วยเทคนิค Diffuse Reflection Infrared Fourier Transform (DRIFT)

ที่มา : Anonymous. DRIFT[Online], Accessed 24 May 2011. Available from <http://www.shu.ac.uk/research/meri/equipment/spectroscopy5.html>

ในการวิเคราะห์นั้นตัวอย่างที่จะวิเคราะห์ซึ่งเป็นผงจะถูกบดรวมกับสารที่ไม่ถูกดูดกลืนแสง IR บรรจุลงในช่องใส่สารตัวอย่าง ที่มีความลึกประมาณ 2-3 มิลลิเมตร สเปกตรัมที่ได้ จะมีลักษณะคล้ายกับสเปกตรัมของเทคนิค Transmission technique แตกต่างกันตรง Relative intensity ของพีคในสเปกตรัม

14. เทคนิคการเตรียมตัวอย่าง (ณรงค์ ไซตสุต 2548 :216)

โดยทั่วไปไม่มีตัวทำละลายใดที่ยอมให้รังสีอินฟราเรดผ่านตลอดช่วงความยาวคลื่นที่สนใจ ดังนั้นการเตรียมสารละลายจึงทำได้ยากและใช้เวลาในการเตรียมนาน สามารถเตรียมได้ทั้งตัวอย่างที่เป็นของแข็ง ของเหลว และก๊าซ

14.1 ของแข็ง (Solids) สารประกอบอินทรีย์ส่วนมากให้พีคดูดกลืนในช่วงกลาอินฟราเรดหลายพีค ถ้าตัวทำละลายที่ใช้ละลายสาร ไม่ให้พีคในช่วงความยาวคลื่นนี้ก็ใช้ได้ การวิเคราะห์ใช้หลักการกระจายของแข็งในของเหลวหรือเมทริกซ์ของแข็ง นำตัวอย่างของแข็งมาบดให้ละเอียดให้มีขนาดเล็กกว่าความยาวคลื่นของรังสีอินฟราเรดเพื่อเลี่ยงปัญหาจากการกระเจิงรังสี การกระเจิงเกิดขึ้นเมื่ออนุภาคมีขนาดใหญ่กว่าความยาวคลื่นอินฟราเรด

14.1.1 เทคนิคการอัดเม็ด (Pelleting technique) โดยการนำตัวอย่างของแข็งมาบดกับโพแทสเซียมโบรไมด์ให้ละเอียดและอัดเป็นเม็ด(เกลือโลหะอัลคาไลน์ชนิดอื่นก็ใช้ได้) เกลือฮาไลด์มีสมบัติโปร่งใสต่อรังสีอินฟราเรดคล้ายแก้ว เมื่อใส่หรืออัดด้วยความดันสูงจะเป็นเม็ด นำตัวอย่างมา 1 mg บดให้ละเอียด ผสมกับโพแทสเซียมโบรไมด์แห้ง 100 mg บดให้เข้ากันในโกร่ง (Mortar) ด้วยสาก (Pestle) ใส่ของผสมนี้ลงใน (Die)และอัดด้วยความดันสูง 10,000 ถึง 15,000 ปอนด์ต่อตารางนิ้วพร้อมกับดูดอากาศออก(ไม่มีอากาศภายในเม็ด)ได้เม็ดใส นำเม็ดนี้ใส่ในที่ใส่สารตัวอย่าง ถ้าพบแถบสเปกตรัมที่ $3,450\text{ cm}^{-1}$ และ $1,640\text{ cm}^{-1}$ (2.9 และ $6.1\text{ }\mu\text{m}$)แสดงว่ามีความชื้นปน ถ้าศึกษาที่เลขคลื่นต่ำกว่า 400 cm^{-1} ใช้โพแทสเซียมโบรไมด์ไม่ได้ เพราะโพแทสเซียมโบรไมด์ดูดกลืนรังสีช่วงความยาวคลื่นนี้ ต้องใช้ซีเซียมไอออไดด์แทน แต่ซีเซียมไอออไดด์ดูดกลืนรังสีช่วงความยาวคลื่นต่ำกว่า 200 cm^{-1}

15. การวิเคราะห์หาปริมาณ (แม้น อมรสิทธิ์ 2535 :148-150)

ด้วยเทคนิคนี้จะใช้หลักการเดียวกับ UV-spectrophotometry ก็คือใช้ Lambert-Beer's Law ซึ่งกล่าวไว้ว่า การดูดกลืนแสง (Absorbance)จะแปรผันโดยตรงกับความเข้มข้น (c)และความหนาของ cell ที่บรรจุ (b)

$$A = abc$$

สำหรับเครื่องอินฟราเรดที่ไม่สามารถอ่านค่าออกมาเป็น absorbance แต่อ่านเป็น % transmittance (%T) จะต้องคำนวณกลับให้เป็นค่า A ก่อน โดย

$$A = -\log (\%T/100)$$

การหาปริมาณด้วยเทคนิคนี้ยังไม่แพร่หลายเท่า UV และการวิเคราะห์หาปริมาณด้วยสำคัญ ในตำราต่าง ๆ ก็มีไม่มากนัก เนื่องจากวิธีนี้มีความไวต่ำ และบางครั้งให้ผลการวิเคราะห์ที่ไม่เป็นไปตาม Lambert-Beer's Law

วิธีการหาปริมาณวิเคราะห์ โดยการดูดกลืนรังสี อินฟราเรด ต่างจากวิธีอื่นเนื่องจากค่อนข้าง ซับซ้อน แลพบดูดกลืนแคบ ซึ่งเป็นขีดจำกัดของเครื่องมืออินฟราเรด เครื่องมือปริมาณวิเคราะห์จากเครื่องมืออินฟราเรด แบบกระจายเหมาะกับการทำคุณภาพวิเคราะห์ ดีกว่ามาตรสเปกโทรโฟโตอัลตราไวโอเลต/วิสิเบิลเชิงแสง ความเที่ยงและความแม่นยำในการทำคุณภาพวิเคราะห์ด้วยเครื่องฟลูอริเมตริสอินฟราเรด ดีกว่าเครื่องมืออินฟราเรดแบบกระจาย และทำให้สเปกตรัมคุณภาพดี

โดยทั่วไป ในการหาปริมาณวิเคราะห์โดยใช้เทคนิคทาง Infrared spectroscopy นั้นไม่มีความจำเป็นต้องหาค่า ϵ หรือ a เพราะนิยมใช้วิธีเทียบกับสารมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้นแล้ว นั่นคือ

$$\frac{A_u}{A_s} = \frac{abuCu}{absCs}$$

เมื่อ a ของสารอย่างเดียวกันจะเท่ากัน

$$b_u = b$$

เมื่อใช้เซลล์ขนาดเดียวกัน หรือเซลล์เดียวกัน

$$b_u = b$$

ดังนั้น เมื่อ

$$A_u = \text{Absorbance ของสารตัวอย่าง}$$

A_s A_s = Absorbance ของสารมาตรฐาน

C_u = ความเข้มข้นของสารตัวอย่าง

C_s = ความเข้มข้นของสารมาตรฐาน

บางครั้งในการหาค่า transmittance (I_0) หรือ absorbance (A_2) โดยใช้ base-line method เมื่อพีคหรือแบนด์อยู่ใกล้กันมาก หรือบางครั้งบดบังกัน (Overlap) กับพีคอื่นๆเพื่อให้ได้ค่าที่มีความแม่นยำดี (Best precision) ให้ใช้เส้นราบเป็น base-line เพราะการกระเจิงแสงก็ยังมีส่วนเข้ามาเกี่ยวข้อง ดังนั้น โดยทั่วไปในการวัดค่าแอบซอร์เบ้นซ์ (Absorbance) ของสารจึงนิยมใช้วิธีที่เรียกว่า “base-line method” วิธีหาปริมาณ อาจทำได้ 2 วิธี คือ

15.1 การวิเคราะห์หาปริมาณโดยใช้วิธีเทียบกับสารมาตรฐาน การคำนวณหาค่า absorbance จากสเปกตรัมอินฟราเรดโดยการเลือกจุดสำหรับหาค่า A_1 นั้นควรจะต้องมีค่าอยู่ระหว่าง 20% T และ 80% และจุดที่เลือกก็ไม่จำเป็นจะต้องเป็นจุดสูงสุดของการดูดกลืนแสง (Minimum T) แต่ทางที่ดีที่สุดควรเลือกจุดสูงสุด เพราะง่ายต่อการกำหนดตำแหน่ง การหาค่า %T ถ้าได้ค่าต่างกันมากกว่า 1% จาก 2 สเปกตรัม ให้หาจากสเปกตรัมที่ 3 ถ้า %T ต่างกันอีกมากกว่า 2% ให้หาจากสเปกตรัมที่ 4 แล้วนำมาเฉลี่ยเป็นค่า %T ที่วัดได้

15.2 การหาปริมาณของสาร โดยใช้วิธีทำกราฟมาตรฐาน โดยการเขียนกราฟระหว่างค่า absorbance กับความเข้มข้น ในการทำกราฟมาตรฐานควรใช้เครื่องเดียวกันโดยตลอด ใช้เซลล์ใส่สารตัวอย่างและสารมาตรฐานอันเดียวกัน ตลอดจนสภาวะต่าง ๆ ของการใช้เครื่องจะต้องเหมือนกันด้วย จะต้องไม่ลืมว่าอุปกรณ์ที่ใช้และวิธีการทำมีส่วนสำคัญต่อผลของการวิเคราะห์โดยขั้นตอนดังนี้

หาสารมาตรฐานที่บริสุทธิ์แล้วทดลองหาสเปกตรัมอินฟราเรดของแต่ละชนิด

ผสมตัวทำละลายทั้งสามชนิดนี้ให้มีความเข้มข้น (% โดยปริมาตร) ต่างๆกัน แล้วนำไปหาสเปกตรัมอินฟราเรด

เลือกพีคของสเปกตรัมที่เห็นว่าดีที่สุดของสารแต่ละชนิด

หาค่า absorbance ของแต่ละสารแล้วนำมาเขียนกราฟมาตรฐานระหว่างค่า absorbance แล้วนำไปอ่านจากกราฟมาตรฐาน ก็จะทราบปริมาตรหรือความเข้มข้นได้

16. การแปลผลสเปกตรัมของ FTIR

ตารางที่ 2 ตารางการดูดกลืนแสงอินฟราเรดในช่วงเลขคลื่นต่างๆ

Bond	Compound Type	Frequency range, cm^{-1}
C-H	Alkanes	2960-2850(s) stretch
		1470-1350(v) scissoring and bending
	CH ₃ Umbrella Deformation	1380(m-w) - Doublet - isopropyl, <i>t</i> -butyl
C-H	Alkenes	3080-3020(m) stretch
		1000-675(s) bend
C-H	Aromatic Rings	3100-3000(m) stretch
	Phenyl Ring Substitution Bands	870-675(s) bend
	Phenyl Ring Substitution Overtones	2000-1600(w) - fingerprint region
C-H	Alkynes	3333-3267(s) stretch
		700-610(b) bend
C=C	Alkenes	1680-1640(m,w)) stretch
C $\equiv$ C	Alkynes	2260-2100(w,s) stretch
C=C	Aromatic Rings	1600, 1500(w) stretch
C-O	Alcohols, Ethers, Carboxylic acids, Esters	1260-1000(s) stretch
C=O	Aldehydes, Ketones, Carboxylic acids, Esters	1760-1670(s) stretch
O-H	Monomeric -- Alcohols, Phenols	3640-3160(s,br) stretch
	Hydrogen-bonded -- Alcohols, Phenols	3600-3200(br) stretch
	Carboxylic acids	3000-2500(br) stretch
N-H	Amines	3500-3300(m) stretch
		1650-1580 (m) bend

ตาราง(ต่อ)

C-N	Amines	1340-1020(m) stretch
C ^o N	Nitriles	2260-2220(v) stretch
NO ₂	Nitro Compounds	1660-1500(s) asymmetrical stretch
		1390-1260(s) symmetrical stretch

v - variable, m - medium, s - strong, br - broad, w – weak

ที่มา : Stanislaus. Interpretation of Infrared Spectra [Online], Accessed 28 May 2011.

Available from <http://wwwchem.csustan.edu/Tutorials/INFRARED.HTM>

17. ข้อดีของสเปกโทรฟลูอริเตอร์แทรนซ์ฟอร์ม (ณรงค์ ไซตสุต 2548 :236)

เครื่องฟลูอริเตอร์แทรนซ์ฟอร์มอินฟราเรดใช้ศึกษาช่วงกลางอินฟราเรดให้อัตราส่วนสัญญาณต่อการรบกวนสูงกว่าเครื่องมืออินฟราเรดแบบกระจายที่มีคุณภาพดีหลายเท่า การเพิ่มสัญญาณต่อการรบกวนอย่างรวดเร็ว ทำให้ได้สเปกตรัมที่ดีภายใน 2 ถึง 3 วินาที เครื่องมือที่ใช้หลักการแทรกสอดสเปกตรัมที่ได้มีการแยกสูง (น้อยกว่า 0.1 cm^{-1}) ความถี่ที่วัดได้มีความแม่นยำสูงและ reproduce ข้อดีอีกข้อได้แก่สเปกตรัมที่ได้เป็นสเปกตรัมที่ลบ background แล้ว

ข้อดีเชิงทฤษฎีของเครื่องฟลูอริเตอร์แทรนซ์ฟอร์มให้พลังงานของระบบแสงมากกว่าเครื่องมือแบบกระจายหนึ่งถึงสองเท่า เนื่องจากเครื่องมือแบบกระจายใช้ความกว้างช่องเล็ก ขาว แคบ แต่ใช้วิธีการเพิ่มกำลังขยาย (Gain) เพื่อชดเชยสภาพไวที่ลดลง ส่วนแทรนซ์ดิวเซอร์ที่ใช้กับมาตรแทรกสอดไม่มีปัญหาเนื่องจากรังสีอื่นลอคเข้าไป เพราะเป็นรังสีแบบต่อเนื่อง ส่วนรังสี infrared เป็นแบบ สับมีความถี่ต่างออกไป transducer ตอบสนองสัญญาณเร็วและใช้หลักการแทรกสอดจึงวิเคราะห์สารที่มีปริมาณน้อยได้ แสงที่มีลอคเข้าไปไม่มีผลต่อระบบแทรกสอด เพราะแสงที่วัดเป็นแบบสับ ส่วนแสงที่ลอคเข้าไปเป็นแบบต่อเนื่อง

เครื่องมือที่ใช้หลักการแทรกสอด (Fourier Transform) นิยมใช้งานทางเคมีเนื่องจากงานที่ต้องการการแยกสูงทำได้โดยเฉพาะตัวอย่างแก๊สซับซ้อน เนื่องจากแถบระดับพลังงานการสั่นและการหมุนทับกัน

วิเคราะห์ตัวอย่างที่มีความเข้มข้นสูงได้ วัดค่าความดูดกลืนสูงสุด

ศึกษาสารที่ให้ค่าแถบดูดกลืนน้อยได้ (เช่น สารประกอบที่ศึกษาที่มีการดูดทางเคมี

ผิว (catalyst)

การสแกนตัวอย่างรวดเร็วจึงใช้ทางจุลศาสตร์ได้ดี (เช่น หา gas ที่ออกจากเครื่องแยก gas)

ศึกษาสารตัวอย่างปริมาณน้อยๆ ได้ (รวบรวมข้อมูลสเปกตรัมต่างๆ)

ศึกษาสเปกตรัมแบบสะท้อนได้

ศึกษาสเปกตรัมเปล่ง infrared

18. งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Edita Botonjic-Sehic(2009) ได้พยายามในการพัฒนาเครื่องมือตรวจด้วยแสงแบบพกพาสำหรับการตรวจหาอายุคราบโลहितโดยใช้แสง Visible, แสงอินฟราเรดช่วงใกล้ (NIR) และแสงอินฟราเรดช่วงกลาง (MID) โดยเฉพาะช่วงความยาวคลื่น 1100 -2500 nm ของ NIR เป็นช่วงที่เหมาะสมสำหรับการตรวจหาคราบโลहितเป้าหมายโดยรวมในการทำการวิจัยครั้งนี้คือ การสำรวจความเป็นไปได้ในการพัฒนาเครื่องมือนี้ในการประมาณอายุของคราบโลहितที่พบในสถานที่เกิดเหตุ หลักการคือ การวัดสัญญาณแสง(สเปกตรัม) ที่สะท้อนจากคราบโลहितและใช้ข้อมูลที่ได้ตรวจสอบไว้ก่อนหน้านี้เพื่อเทียบข้อมูลในการตรวจหาอายุของคราบโลहित จากการได้ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของสเปกตรัมในช่วง (NIR) โดยนำโลहितของมนุษย์จากเส้น โลहितดำและหลอดโลहितฝอยถูกนำมาใช้ในการตรวจสอบ ตัวอย่างถูกเตรียมโดยการวางบนพื้นผิววัสดุเช่น ฝ้ายก๊อชและกระจก สเปกตรัมอินฟราเรดช่วงใกล้ (NIR) ของตัวอย่างถูกวัดเป็นระยะๆ ที่สภาวะแวดล้อม 1 เดือน การเปลี่ยนแปลงของสเปกตรัมสามารถใช้ แปลผลในแง่การเปลี่ยนแปลงทางเคมีของตัวอย่าง การสูญเสียน้ำมันพบที่สำคัญในการสร้างการเริ่มต้นการเปลี่ยนแปลงในสเปกตรัม หลังจากชั่วโมงแรก, พบแถบขนาดใหญ่ที่ปรากฏระหว่างช่วงความยาวคลื่น 1460 และ 1860 nm และจะโตขึ้นตามอายุของคราบโลहितแถบที่ปรากฏนี้ เกิดมาจากก่อดัวของเมทิลโมโกลบีนและการจับกับน้ำ และจะเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องประมาณ 21 วันและจะสามารถใช้ในการประมาณอายุของคราบโลहितได้.

Stefan Strasser(2007) ใช้วิธีการทาง Force spectroscopy สำหรับการประมาณอายุของคราบโลहितซึ่งสามารถนำมาใช้ในงานด้านนิติวิทยาศาสตร์ได้ โดยใช้ AFM (Atomic Force Microscopy) เพื่อการถ่ายภาพที่มีความละเอียดสูงในการถ่ายภาพเซลล์เม็ดโลहितแดง และระบุความยืดหยุ่นที่เปลี่ยนแปลงได้ในระดับ nanometer scale ในขั้นตอนการวิเคราะห์ได้นำหอยดโลहितหอยดลงบน slide glass เมื่อหอยดโลहितแดงเริ่มการศึกษาโดย AFM ในขั้นตอนแรกจะแสดงรูปภาพของเซลล์เม็ดโลहितแดงจำนวนหลายเซลล์ ซึ่งสามารถระบุได้ง่ายเนื่องจากรูปร่างของเซลล์เม็ดโลहितแดงมีลักษณะคล้ายโดนัท ลำดับต่อมาเป็นการศึกษารูปร่างลักษณะของเซลล์เม็ดโลहित

แดงในระยะเวลา 4 สัปดาห์ ซึ่งไม่เห็นการเปลี่ยนแปลงใดๆ ขั้นตอนที่สองจะใช้ AFM ทดสอบความยืดหยุ่นโดยบันทึกแนวของความโค้งที่เปลี่ยนแปลง ซึ่งจะทำทันทีขณะที่โลหิตกำลังแห้งที่ระยะเวลา 1.5 ชั่วโมง, 30 ชั่วโมง และ 31 วัน ภายใต้สภาวะแวดล้อมคงที่ ณ อุณหภูมิห้อง (20 °C) และที่ความชื้นสัมพัทธ์ 30% หลังจากนั้นนำค่าที่วัดความยืดหยุ่นดังกล่าวมาเขียนกราฟเทียบกับระยะเวลา ทำซ้ำหลายๆ ครั้ง จากการทดลองแสดงว่าความยืดหยุ่น (Elasticity pattern) จะลดลงเมื่อระยะเวลาผ่านไปนานขึ้น ซึ่งมีความเป็นไปได้อย่างมากว่า เนื่องมาจากการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นภายในหยดโลหิตขณะที่กำลังแห้งและจากการเปลี่ยนแปลงในกระบวนการแข็งตัวของโลหิตจากข้อมูลเบื้องต้นแสดงให้เห็นถึงความเป็นไปได้ของวิธีการนี้ที่จะนำมาใช้ในการสร้างกราฟมาตรฐาน (Calibration Curves) ซึ่งสามารถนำมาใช้ในการประมาณอายุของโลหิตได้

Hiroyuki Inoue, et al. (1992) ได้ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนในคราบโลหิต โดยเก็บตัวอย่างโลหิตจากอาสาสมัครจำนวน 8 คน ตัวอย่างโลหิตได้เก็บไว้ใน Ethylene Diamine Tetraacetic Acid (EDTA) โดยอาสาสมัครทุกคนไม่พบว่ามีความผิดปกติของฮีโมโกลบิน โลหิตตัวอย่างถูกหยดลงบนกระดาษกรอง (Toyo Roshi, Ltd., No. 1, Tokyo, Japan) และทำให้แห้งโดยผึ่งทิ้งไว้ข้ามคืนในสภาวะปกติ แต่ละตัวอย่างถูกเก็บไว้ที่ 6 สภาวะ คือ ภายใต้แสงฟลูออเรสเซนซ์ และในที่มืดโดยเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 37 °C ที่อุณหภูมิห้อง และที่ 4 °C ทำการทดสอบ ได้รายงานการลดลงตามระยะเวลาของอัตราส่วนระหว่างพื้นที่พีคของแอลฟาโกลบิน (α – globin peak area) ต่อพื้นที่พีคของฮีม (heme peak area) ในคราบโลหิต และหลังจากนั้นได้รายงานการพบพีคที่มีพื้นที่เพิ่มขึ้นตามระยะเวลา โดยเรียกว่าพีค “X” ซึ่งไม่สามารถตรวจพบพีคนี้ในโลหิตสด

Andrasko J, Rosén B (1994) ได้รายงานการใช้ HPLC ในการวิเคราะห์ฮีโมโกลบินในคราบโลหิต ด้วย reversed phase large pore column (5 μ m particle size, C₄-phase, 300 Å pore size) โดยใช้วิเคราะห์สารสกัดจากคราบโลหิตของสิ่งมีชีวิตสปีชีส์ต่างๆ สำหรับคราบโลหิตของมนุษย์นั้น ดำเนินการโดยเก็บตัวอย่างโลหิตจากเส้นโลหิตดำของผู้ใหญ่ ตัวอย่างโลหิตเหล่านี้ถูกแช่แข็งและเก็บรักษาไว้ที่ -67 °C สำหรับใช้หลายๆ ปี คราบโลหิตตัวอย่างได้มาโดยหยดโลหิตสด หรือโลหิตที่ทำให้ละลายจากการแช่แข็งแล้วลงบนกระดาษกรอง (Munktell No.3) และทำให้แห้งโดยทิ้งไว้ข้ามคืน และจากที่ทราบกันแล้วว่า พื้นที่พีคของ α -globin ต่อพื้นที่พีคของ heme ในโครมาโตแกรมที่ได้จากสารสกัดจากคราบโลหิตนั้นลดลงทีละน้อยตามระยะเวลา ซึ่งการทดลองนี้ก็พบปรากฏการณ์เช่นเดียวกัน และนอกจากนี้ยังพบว่าความกว้างของฐานพีคของ α และ β -globin เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาที่ใช้ในการเก็บตัวอย่าง ซึ่ง globin peak แต่ละอันจะถูกชะออกมา

ใกล้เคียงมากขึ้น แนวทางในการประมาณอายุสามารถดูได้จากความสามารถในการแยกที่ลดลงของทั้งสองฟิสิกส์ และจากการสูงขึ้นของตำแหน่งต่ำสุดที่อยู่ระหว่างกลางของฟิสิกส์ทั้งสอง

Barcot O, Balarin M, et al.(2006) กล่าวว่า เครื่อง FTIR แสดงสเปกตรัมของตัวอสุจิของมนุษย์และน้ำอสุจิซึ่งถูกวิเคราะห์และบันทึกข้อมูลไว้ ขั้นตอนเหล่านี้ได้รับการยอมรับสำหรับการเตรียมตัวอย่างที่ง่ายต่อการทราบลักษณะของสเปกตรัม การกำหนดของ band เหล่านี้ได้อ้างอิงมาจากแหล่งกำเนิดของการรวมลักษณะของตัวอสุจิ (sperm specific doublet) ได้ถูกพิจารณา ณ ตำแหน่ง band ที่เลขคลื่น 968 cm^{-1} และ 981 cm^{-1} หลักการ PCR ถูกใช้เพื่ออธิบายสเปกตรัมที่มีความจำเพาะและมีความสัมพันธ์กับความเป็นเอกลักษณ์ของตัวอสุจิ เช่น ความเข้มข้น, ความเร็วในการเคลื่อนที่, จังหวะสัญญาณความถี่ ดังนั้น พารามิเตอร์ของสเปกตรัมแบบง่ายนี้ เช่น ความเข้มของ band และอัตราส่วนของ band ได้ถูกทดสอบเพื่อวิเคราะห์ให้ทราบถึงการเชื่อมโยงความสัมพันธ์ที่ดีที่สุดเพื่อให้ทราบถึงเอกลักษณ์ของอสุจิ บริเวณ band ของสเปกตรัม amide I ระหว่างเลขคลื่น 1700 cm^{-1} และ 1590 cm^{-1} ถูกกำหนดว่ามีความสัมพันธ์จำเพาะกับความเข้มข้นของอสุจิ, พารามิเตอร์ที่ให้เส้นสเปกตรัมสัมพันธ์กับความเข้มข้นของอสุจิมีความเข้มข้นของ amide I สำหรับความเร็วในการเคลื่อนที่ band ที่มีเลขคลื่นระหว่าง 1119 cm^{-1} และ 943 cm^{-1} ถูกกำหนดให้เป็นบริเวณแสดงเอกลักษณ์จำเพาะ ความสัมพันธ์ของปริมาณของกรดนิวคลีอิกซึ่งสัมพันธ์กับโปรตีนแสดงเส้นที่ขึ้นอยู่ด้วยความเร็วในการเคลื่อนที่ของอสุจิ จังหวะสัญญาณความถี่แสดงความสัมพันธ์ที่ดีที่สุด ณ ตำแหน่ง band เลขคลื่นระหว่าง 3678 cm^{-1} และ 2749 cm^{-1} ซึ่งส่วนใหญ่แสดงถึงไขมันและโปรตีน ผลลัพธ์นี้แสดงได้ว่า เครื่อง FTIR มีประโยชน์เพื่อช่วยส่งเสริมการศึกษาเกี่ยวกับหน้าที่ของเซลล์และเนื้อเยื่อ

บทที่ 3
วิธีการดำเนินการวิจัย

1. วัสดุอุปกรณ์

ตารางที่ 3 วัสดุอุปกรณ์

วัสดุอุปกรณ์	แหล่งที่ผลิต
เครื่อง Fourier Transform Infrared Spectroscopy รุ่น Spectrum 1000	บริษัท Perkin Elmer Thailand
เครื่อง Fourier Transform Infrared Spectroscopy รุ่น Spectrum GX	บริษัท Perkin Elmer Thailand
Diffuse Reflectance Accessory รุ่น Spectrum GX	บริษัท Perkin Elmer
เครื่องชั่งแบบละเอียด รุ่น DRAGON 204	บริษัท Mettler Toledo
โกร่งบด	บริษัท Perkin Elmer Thailand
สากบด	บริษัท Perkin Elmer Thailand
เครื่องอัดแรงดัน (Hydraulic pellet press)	บริษัท Specac
Blood lancet	บริษัท Terumo
Needle injection	บริษัท Terumo
Syringe volume 5 ml	บริษัท Terumo
Auto pipette 20-200 ml	บริษัท GIB Thai
Glass slide (microscopic slide)	บริษัท Jed Pella, Inc.
นาฬิกาจับเวลา	บริษัท Casio

2. สารเคมี

ตารางที่ 4 สารเคมี

สารเคมี	แหล่งที่ผลิต
Potassium Bromide (KBr powder) เกรด FTIR	บริษัท Sigma-Aldrich
Acetone	บริษัท fluka
Titanium dioxide	บริษัท Sigma-Aldrich

3. วิธีการทดลอง

3.1 การวิเคราะห์ตัวอย่างด้วยเทคนิค Diffuse Reflectance Infrared Fourier Transform Spectroscopy (DRIFT FTIR)

3.1.1 การเก็บตัวอย่างเก็บตัวอย่างโลหิตจากอาสาสมัครในหลอดที่มีสารกันโลหิตแข็ง Ethylene Diamine Tetraacetic Acid (EDTA) บันทึกเวลาและวันที่ทำการเก็บตัวอย่าง จากนั้นนำไปเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 °C

3.1.2. การเตรียมตัวอย่าง

3.1.2.1 นำตัวอย่างโลหิตที่เก็บไว้ในตู้เย็นหยดลงบนช่องใส่ตัวอย่างที่มี Titanium dioxide เป็นตัวรองรับ

3.1.2.2 ทำการวิเคราะห์ด้วย FT-IR Perkin Elmer รุ่น Spectrum GX โดยใช้ mode Kubelka-Munk ที่ช่วงเลขคลื่น 7800-4000 cm^{-1} resolution 4 cm^{-1} จำนวนสแกน 256 รอบ/ครั้ง โดยทำการวิเคราะห์ที่เวลาต่างๆกัน (30-100) นาทีหลังจากหยดโลหิตลงบนตัวรองรับ

3.1.2.3 นำผลสเปกตรัมที่ได้ไปวิเคราะห์ข้อมูลโดยวัดพื้นที่ใต้พีคในช่วงเลขคลื่น 7153-5394 cm^{-1} แล้วนำมาสร้างกราฟหาความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ใต้พีคกับเวลา (นาที)

3.2 การวิเคราะห์ตัวอย่างด้วยเทคนิค Transmission Infrared Fourier Transform Spectroscopy (TIFTs)

3.2.1 การเก็บตัวอย่าง เก็บตัวอย่างด้วยวิธีเดียวกันกับเทคนิค Diffuse Reflectance Infrared Fourier Transform Spectroscopy (DRIFTs) ข้อ 3.1.1

3.2.2 การเตรียมตัวอย่าง

3.2.2.1 นำตัวอย่างโลหิตหยดลงบนกระจกสไลด์ ให้ได้น้ำหนักประมาณ 0.0040 g

3.2.2.2 ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องที่ระยะเวลาต่างๆกัน

3.2.2.3 ชั่งน้ำหนักที่แน่นอนของคราบโลหิตบนกระจกสไลด์ ชูคราบโลหิตบนกระจกสไลด์ออก แล้วชั่งน้ำหนักกระจกสไลด์หลังชูคราบโลหิต เพื่อให้ทราบน้ำหนักที่แน่นอนของคราบโลหิต

3.2.2.4 ทำการเตรียมด้วยวิธี KBr disc ด้วยการนำคราบโลหิตมาผสมกับ KBr อัตราส่วน 1 : 99 โดยน้ำหนัก อัดเป็นแผ่นโดยใช้แรงดัน 10 kPa เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำ KBr disc ที่ได้มาชั่งน้ำหนัก บันทึกน้ำหนักของแผ่น KBr disc

3.2.2.5 วิเคราะห์โดย FTIR Perkin Elmer รุ่น Spectrum 100 ที่ช่วงเลขคลื่น 4000 -400 cm^{-1} resolution 4 cm^{-1} จำนวนสแกน 256 รอบ/ครั้ง

3.2.2.6 ทำการวิเคราะห์ทุกๆ 6 ชั่วโมง เป็นเวลา 4 วัน นำสเปกตรัมที่ได้ไปวิเคราะห์ผลการทดลองต่อไป

3.2.2.7 นำสเปกตรัมที่ได้จากข้อ 3.2.2.6 มาทำการเปลี่ยน % transmittance เป็น % absorbance จากนั้นทำการปรับ smoot สเปกตรัม พร้อมทั้งทำการปรับ auto baseline ตามลำดับโดยใช้ software ที่ติดตั้งมากับเครื่อง FTIR Perkin Elmer รุ่น Spectrum 100 จะได้สเปกตรัมที่พร้อมสำหรับ integrate peak ต่อไป

3.2.2.8 นำน้ำหนักของคราบโลหิต, KBr และ KBr disc มาคำนวณหาค่า Factor จากสมการต่อไปนี้

$$\text{ค่า Factor} = \frac{\text{น้ำหนักของตัวอย่างที่ชั่งจากสไลด์} + \text{น้ำหนักของ KBr ที่ใช้วิเคราะห์}}{\text{น้ำหนักของตัวอย่างที่ชั่งจากสไลด์} \times \text{น้ำหนักของ KBr disc}}$$

3.2.2.9 นำเส้นสเปกตรัมที่ได้จากการวิเคราะห์ที่เวลาต่างๆ นำมาคำนวณหาเส้นสเปกตรัมใหม่จากสมการดังนี้

$$\text{เส้นสเปกตรัมใหม่} = \text{เส้นสเปกตรัม} \times \text{ค่า Factor}$$

3.2.3 จากเส้นสเปกตรัมใหม่ที่ได้จากการวิเคราะห์ตัวอย่างที่เวลาต่างๆ มาวัดพื้นที่ใต้พีกในช่วงเลขคลื่น $3700 - 3000 \text{ cm}^{-1}$ (A_{3300}) กับพื้นที่ของพีกที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงเมื่อเวลาผ่านไป ในช่วงเลขคลื่น $770 - 730 \text{ cm}^{-1}$ (A_{744})

3.2.4 คำนวณอัตราส่วน (A_{3300} / A_{744}) แล้วนำอัตราส่วนที่ได้พล็อตกราฟมาตรฐานเทียบกับอายุของตัวอย่างและหาสมการเส้นตรงจากความสัมพันธ์ดังกล่าว

3.2.5 ทำการวิเคราะห์ซ้ำจำนวน 4 ซ้ำ แล้วนำมาหาค่าเฉลี่ยของอัตราส่วนพื้นที่ใต้พีก ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานและ %RSD

4. การวิเคราะห์ตัวอย่างโลหิตจากอาสาสมัคร

4.1 นำตัวอย่างโลหิตจากอาสาสมัครจำนวน 13 รายมาหยดลงบนแผ่นกระจกสไลด์และทิ้งไว้ให้แห้งและเก็บตัวอย่างที่เวลาๆกัน

4.2 ทำการเก็บตัวอย่างเช่นเดียวกับข้อ 3.2.3 – 3.2.8

4.3 ทำการวิเคราะห์หาอัตราส่วนพื้นที่ใต้พีก จากตัวอย่างโดยทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคเดียวกันกับการทำกราฟมาตรฐาน คำนวณอัตราส่วน (A_{3300} / A_{744}) แล้วนำอัตราส่วนที่ได้จากการคำนวณในแต่ละครั้ง ประมวลอายุของคราบโลหิตจากกราฟมาตรฐาน

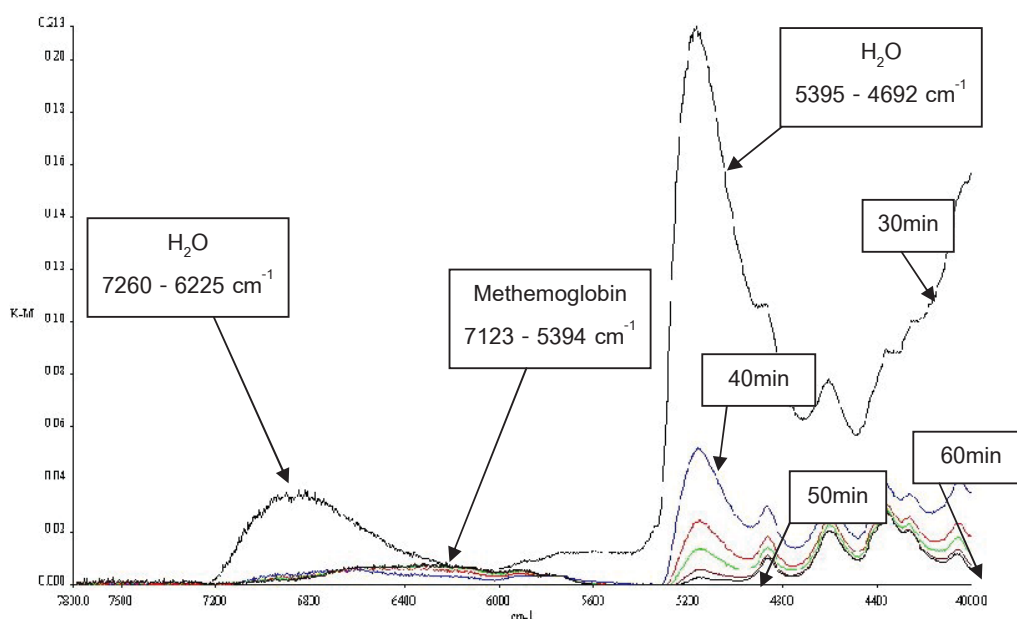
4.4 เปรียบเทียบอายุของคราบโลหิตที่ได้จากการทดลองเทียบกับเวลาจริง

บทที่ 4

ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

1. การวิเคราะห์ตัวอย่างโลหิตด้วยเทคนิค Diffuse Reflectance Infrared Fourier Transform Spectroscopy

จากการศึกษาการประมาณอายุของคราบโลหิตมนุษย์ โดยนำตัวอย่างโลหิตมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Diffuse Reflectance Infrared Fourier Transform Spectroscopy (DRIFT FTIR) โดยใช้ Titanium dioxide เป็นตัวรองรับในช่วงเลขคลื่น $7800\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$ ได้สเปกตรัมดังภาพที่ 4

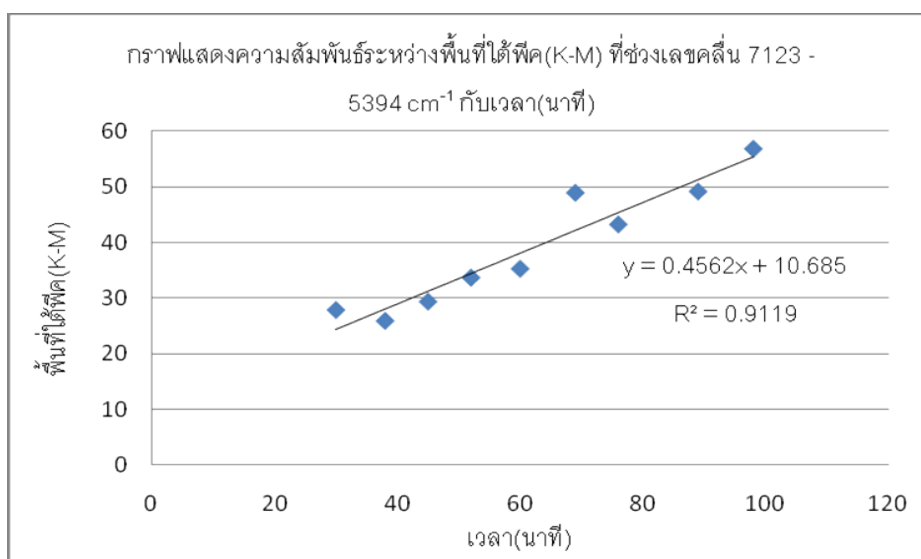


ภาพที่ 4 สเปกตรัมของคราบโลหิตที่ระยะเวลาต่างๆ กันในช่วงเลขคลื่น $7800\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$ ด้วยเทคนิค DRIFT FTIR

จากสเปกตรัมของตัวอย่างคราบโลหิตในช่วงเลขคลื่น $7800\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$ ในช่วงระยะเวลาตั้งแต่เริ่มต้นหยดโลหิตถึงภายใน 1 ชั่วโมงแรก พบฟลักของน้ำที่ชัดเจนอยู่ 2 ฟลักคือในช่วงเลขคลื่น $7260\text{--}6225\text{ cm}^{-1}$ และ $5395\text{--}4692\text{ cm}^{-1}$ หลังจากเวลาผ่านไป 1 ชั่วโมงแล้ว ฟลักของ Methemoglobin ที่ช่วงเลขคลื่น $7123\text{--}5394\text{ cm}^{-1}$ จะปรากฏขึ้นมาและพบว่าฟลักของน้ำมีพื้นที่

ลดลงในขณะที่ฟลักซ์ของ Methemoglobin มีพื้นที่เพิ่มขึ้น เนื่องจากเหล็ก (Fe^{2+}) ที่อยู่ในโมเลกุลของฮีโมโกลบินในเม็ดโลหิตแดงถูกออกซิไดซ์ เกิดการออกซิเดชันจาก Fe^{2+} เป็น Fe^{3+} เกิดเป็นเมทฮีโมโกลบิน

เมื่อนำสเปกตรัมที่ได้จากตัวอย่างกราบโลหิตมาหาพื้นที่ใต้พีค (K-M) ของ Methemoglobin ที่ช่วงเลขคลื่น $7123 - 5394 \text{ cm}^{-1}$ จากนั้นพลอตกราฟเทียบกับอายุของกราบโลหิต พบว่ามีการเพิ่มขึ้นตามสมการ $y = 0.4562x + 10.685$ มีค่าสหสัมพันธ์เท่ากับ 0.9119 ดังภาพที่ 5



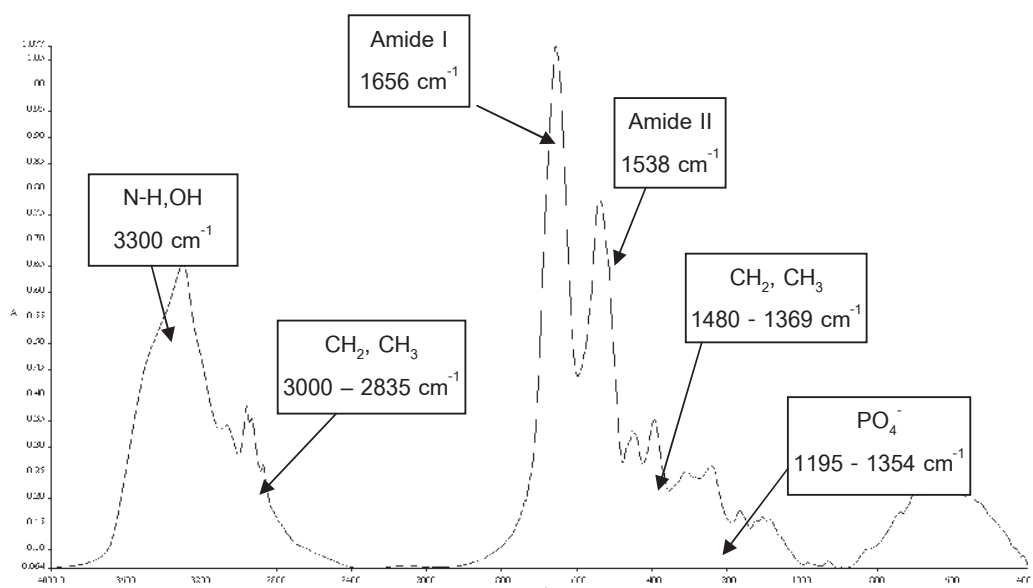
ภาพที่ 5 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ใต้พีค(K-M) ของ Methemoglobin ที่ช่วงเลขคลื่น $7123 - 5394 \text{ cm}^{-1}$ ของตัวอย่างกราบโลหิตกับอายุของกราบโลหิต

จากภาพที่ 5 พบว่าเมื่อเวลานานขึ้น กราฟที่ได้จะมีพื้นที่ฟลักซ์ของ Methemoglobin มีพื้นที่เพิ่มขึ้นเมื่อเวลาผ่านไป 100 นาที หลังจากหยดโลหิตลงบนตัวรองรับ Titanium dioxide

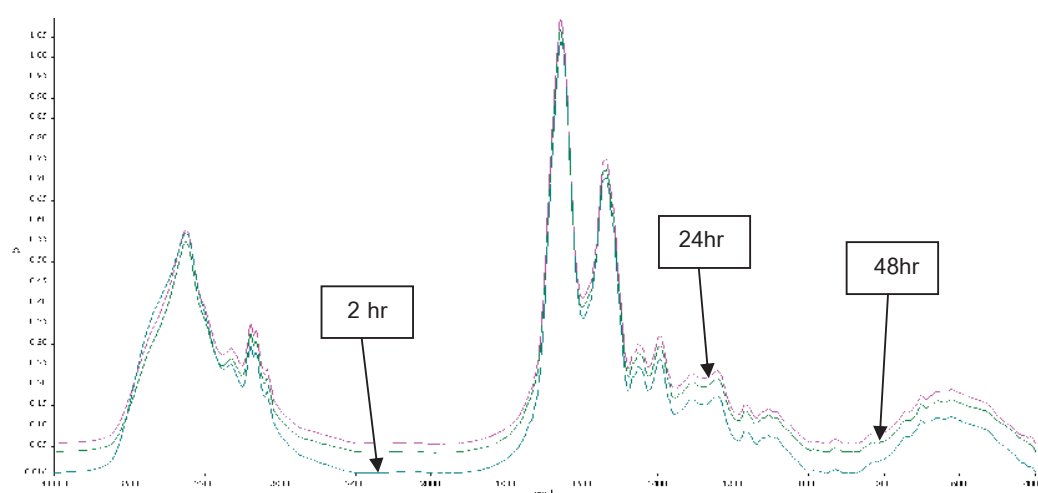
จากการทดลองโดยวิธี Diffuse Reflectance Infrared Fourier Transform Spectroscopy ในช่วงเลขคลื่น $7800-4000 \text{ cm}^{-1}$ ไม่เหมาะสมที่จะนำไปประยุกต์ใช้ในการประมาณอายุกราบโลหิตได้เนื่องจากพบการเปลี่ยนแปลงในช่วงเวลานั้นๆเท่านั้น, ไม่สามารถนำมาใช้กับตัวอย่างจริงได้ และโดยทั่วไปกราบโลหิตที่พบจะอยู่ในสถานะเป็นของแข็ง

2. การวิเคราะห์ตัวอย่างโลหิตด้วยเทคนิค Transmission Infrared Fourier Transform Spectroscopy

การศึกษาการตรวจประมาณหาอายุของคราบโลหิตของมนุษย์ ที่นำมาเตรียมตัวอย่างด้วยวิธี KBr disc และนำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) ในช่วงเลขคลื่น $4000-400\text{ cm}^{-1}$ ได้สเปกตรัม ดังภาพที่ 6 และภาพที่ 7



ภาพที่ 6 สเปกตรัมของคราบโลหิตในช่วงเลขคลื่น $4000 - 400\text{ cm}^{-1}$



ภาพที่ 7 สเปกตรัมของคราบโลหิตตัวอย่างชั่วโมงที่ 2, 24, 48

จากสเปกตรัม ของกราบโลหิตพบพีกลักษณะกว้างมีเลขคลื่นประมาณ $3700\text{--}2400\text{ cm}^{-1}$ ซึ่งคาดว่าเกิดจากการซ้อนทับกันของพีกที่เกิดจาก N-H stretching ที่เลขคลื่น 3300 cm^{-1} , พีกของ O-H stretching ที่เลขคลื่นในช่วง $2500 - 3300\text{ cm}^{-1}$ และพีกของ C-H stretching ที่ช่วงเลขคลื่น $2835 - 3000\text{ cm}^{-1}$, พีก Amide I ที่เกิดจาก C=O stretching ที่เลขคลื่น 1656 cm^{-1} , พีก Amide II ที่เกิดจาก N-H bending ที่เลขคลื่น 1538 cm^{-1} , พีกในช่วงเลขคลื่น $1480 - 1369\text{ cm}^{-1}$ เกิดจาก C-H bending ของหมู่ Methyl(CH_3) ของกรดไขมัน และพบพีกในช่วงเลขคลื่น $1354 - 1195\text{ cm}^{-1}$ เกิดจาก PO_4^- stretching ของกรดนิวคลีอิก จากภาพที่ 7 แสดงให้เห็นการเปลี่ยนแปลงของสเปกตรัมกราบโลหิตตัวอย่างชั่วโมงที่ 2, 24, 48 และจากสเปกตรัมของกราบโลหิตพบช่วงเลขคลื่น ต่างๆดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ช่วงเลขคลื่นที่พบในสเปกตรัมได้จากการวิเคราะห์ของโลหิต

ช่วงเลขคลื่น (cm^{-1})	พันธะ	หมู่ฟังก์ชันนอล	ช่วงเลขคลื่น ที่พบในสเปกตรัม ที่ได้จากการทดลอง (cm^{-1})
3400-3250 3300-2500 3330-3270	N-H stretch O-H stretch C-H stretch	2° amide carboxylic acids alkynes (terminal)	3700-3000
3000-2850 2830-2695	C-H stretch H-C=O: C-H stretch	alkanes aldehydes	2835-3000
1680-1640 1650-1580 1600-1585 1550-1475	-C=C- stretch N-H bend C-C stretch (in-ring) N-O asymmetric stretch	alkenes 1° amines, 1° amides aromatics nitro compounds	1538
1500-1400 1470-1450	C-C stretch (in-ring) C-H bend	alkanes alkanes	1450
1320-1000	C-O stretch	alcohols, carboxylic acids, esters, ethers	
1000-650 950-910	=C-H bend O-H bend	alkenes carboxylic acids	
910-665 900-675 850-550	N-H wag C-H C-Cl stretch	1°, 2° amines aromatics alkyl halides	
910-665 850-550	N-H wag C-Cl stretch	1°, 2° amines alkyl halides	
900-675 700-610 690-515	C-H C-H: C-H bend C-Br stretch	aromatics alkynes alkyl halides	

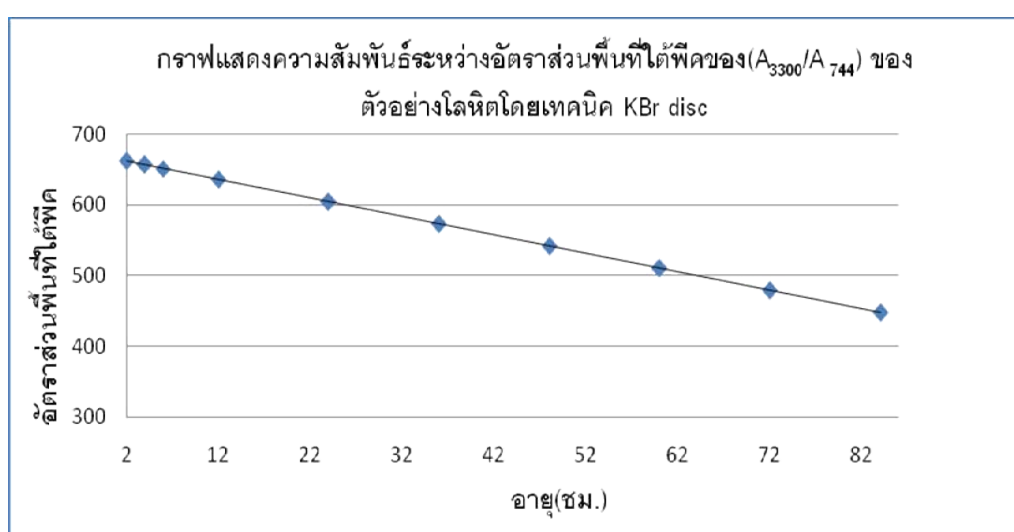
จากการนำตัวอย่างกราบโลหิตมาเตรียมด้วยเทคนิค KBr disc และนำมาศึกษาในช่วงเวลาต่าง ๆ กันด้วยเทคนิค FTIR โดยทำการวัดในช่วงเวลา 4 วัน ที่ช่วงเลขคลื่น $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$ ทำการทดลองซ้ำ 4 ครั้ง พบว่าสเปกตรัมของตัวอย่างกราบโลหิตมีการลดลงของพื้นที่ใต้พีกช่วงเลขคลื่น $3700 - 3000 \text{ cm}^{-1}$ (A_{3300}) และเมื่อนำพิกนี้ และพีกที่ช่วงเลขคลื่น $770 - 730 \text{ cm}^{-1}$ (A_{744}) ซึ่งเป็นพีกที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงเมื่อระยะเวลาผ่านไปมาหาอัตราส่วนพื้นที่ใต้พีกได้ผลแสดงดังตารางที่ 6

ตารางที่ 6 อัตราส่วนระหว่างพื้นที่ใต้พีกที่ช่วงเลขคลื่น $3700 - 3000 \text{ cm}^{-1}$ (A_{3300}) กับพื้นที่ใต้พีกของพีกที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลง เมื่อระยะเวลาผ่านไปที่ช่วงเลขคลื่น $770 - 730 \text{ cm}^{-1}$ (A_{744})

เวลา (ชั่วโมง)	อัตราส่วนพื้นที่ใต้พีก A_{3300} / A_{744}						
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 4	mean	SD	%RSD
2	658.76	676.14	654.69	658.60	662.05	8.30	1.25
4	653.71	671.53	648.82	653.23	656.82	8.70	1.32
6	648.67	666.92	642.94	647.85	651.59	9.11	1.40
12	633.52	653.08	625.31	631.73	635.91	10.37	1.63
24	603.23	625.41	590.06	599.47	604.54	12.97	2.15
36	572.94	597.74	554.80	567.22	573.18	15.63	2.73
48	542.65	570.07	519.55	534.96	541.81	18.32	3.38
60	512.36	542.40	484.29	502.71	510.44	21.03	4.12
72	482.07	514.73	449.03	470.45	479.07	23.76	4.96
84	451.79	487.06	413.78	438.20	447.71	26.49	5.92

จากตารางอัตราส่วนของพื้นที่ใต้พีก A_{3300} / A_{744} จากการทำซ้ำ 4 ครั้ง ได้ค่าเปอร์เซ็นต์ความเบี่ยงเบนสัมพัทธ์อยู่ในช่วง 1.25 – 5.92 %

เมื่อนำอัตราส่วนระหว่างพื้นที่ใต้พีคในช่วงเลขคลื่น $3700-3000\text{ cm}^{-1}$ กับพีคในช่วงเลขคลื่น $770 - 730\text{ cm}^{-1}$ ซึ่งเป็นพีคที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงเมื่อระยะเวลาผ่านไป มาพล็อตกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนของพื้นที่ใต้พีคกับอายุของคราบโลहितพบว่าอัตราส่วนพื้นที่ใต้พีคของ (A_{3300}/A_{744}) มีการลดลงเป็นเส้นตรงอย่างมีนัยสำคัญ ได้สมการเส้นตรง $y = -2.613x + 667.2$ มีค่าสหสัมพันธ์เท่ากับ 1 ดังภาพที่ 8



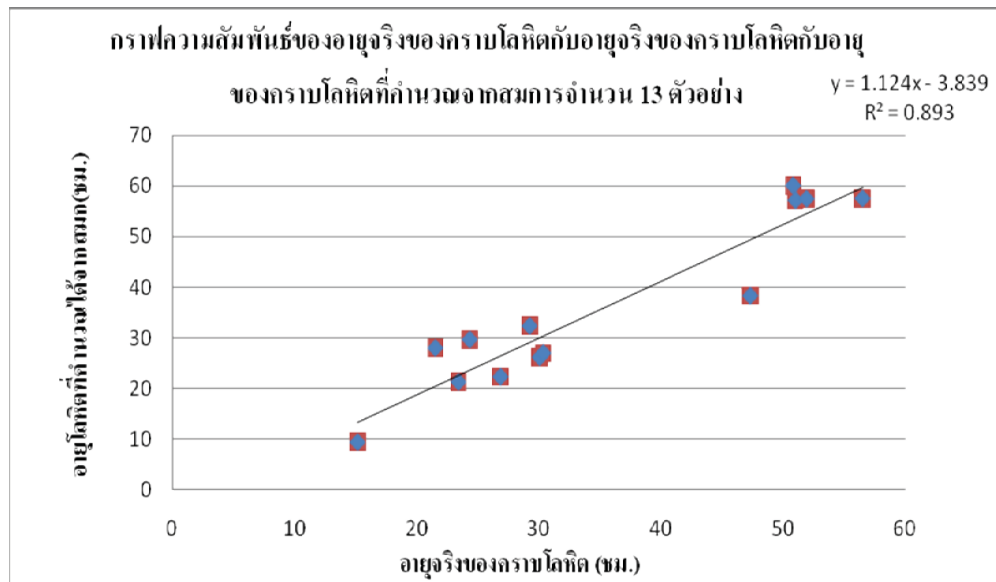
ภาพที่ 8 ความแสดงสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนพื้นที่ใต้พีคของ (A_{3300}/A_{744}) ของตัวอย่างกับอายุของคราบโลहितโดยใช้ KBr disc

การประมาณอายุคราบโลहितตัวอย่าง จากความสัมพันธ์ที่ได้จากกราฟเส้นตรงนี้พล็อตระหว่างอัตราส่วนพื้นที่ใต้พีคเฉลี่ยของ (A_{3300}/A_{744}) กับอายุของคราบโลहित สามารถนำมาประมาณอายุของคราบโลहितได้ โดยการนำตัวอย่างคราบโลहितจากแหล่งต่างๆ ที่ได้จากอาสาสมัครที่มี เพศ อายุ และระยะเวลาที่แตกต่างกัน มาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค FTIR ได้ผล ดังตารางที่ 7

ตารางที่ 7 อัตราส่วนระหว่างพื้นที่ใต้พีคในช่วงเลขคลื่น $3700 - 3000 \text{ cm}^{-1}$ (A_{3300}) กับพื้นที่ใต้พีคของพีคที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลง เมื่อระยะเวลาผ่านไปในช่วงเลขคลื่น $770 - 730 \text{ cm}^{-1}$ (A_{744}) ของตัวอย่างคราบโลहितจำนวน 13 ตัวอย่าง

ตัวอย่างที่	อัตราส่วนพื้นที่ใต้พีค A_{3300}/A_{744} ของตัวอย่าง	เวลาจริง (ชั่วโมง)	เวลาที่คำนวณจาก สมการ $Y = -2.613x + 667.2$	ค่าความผิดพลาด จากการคำนวณ %
1	608.98	26.89	22.2	17.44
2	567.21	47.38	38.26	19.25
3	516.91	56.58	57.51	1.60
4	517.87	51.08	57.14	11.90
5	517.17	51.99	57.41	10.43
6	510.30	50.89	60.05	18.00
7	642.79	15.18	9.34	38.27
8	594.13	21.55	27.96	29.74
9	611.69	23.45	21.24	9.42
10	589.76	24.37	29.63	21.67
11	582.76	29.28	32.31	10.41
12	598.93	30.10	26.13	13.19
13	596.75	30.40	26.96	11.32

จากตารางแสดงอายุของคราบโลहितที่คำนวณได้จากสมการเส้นตรง และ อายุจริงของคราบโลहित จากตัวอย่างจำนวน 13 ตัวอย่าง เมื่อนำมาพล็อตกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอายุของคราบโลहितจริงกับอายุของคราบโลहितที่คำนวณได้จากสมการได้กราฟดังภาพที่ 9



ภาพที่ 9 ความสัมพันธ์ระหว่างอายุจริงของกราบโลहितกับอายุของกราบโลहितที่คำนวณได้จากสมการ

จากภาพที่ 8 แสดงให้เห็นว่าเมื่อนำอายุของกราบโลहितที่ได้จากการประมาณอายุจากสมการมาพล็อตกับอายุจริงของกราบโลहितจะมีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรง ได้ความสัมพันธ์มีค่า $R^2 = 0.893$

บทที่ 5

สรุป อภิปราย และข้อเสนอแนะ

สรุปและอภิปรายผล ผลการวิจัย

จากการศึกษาการตรวจประมาณอายุคราบโลหิตของมนุษย์ ที่นำตัวอย่างมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Diffuse Reflectance Infrared Fourier Transform Spectroscopy (DRIFTS) โดยใช้ Titanium dioxide เป็นตัวรองรับในช่วงเลขคลื่น $7800-4000\text{ cm}^{-1}$ พบว่าในช่วงระยะเวลาดังแต่เริ่มต้นหยดโลหิตจนเวลาผ่านไป 1 ชั่วโมง พบพิกของน้ำที่ชัดเจนอยู่ 2 พิก คือในช่วงเลขคลื่น $7260 - 6225\text{ cm}^{-1}$ และ $5395 - 4692\text{ cm}^{-1}$ โดยพื้นที่ใต้พิกลดลงเมื่อเทียบกับเวลา หลังจากผ่าน 1 ชั่วโมงแล้ว จะปรากฏพิกใหม่ซึ่งเป็นพิกของ Methemoglobin ที่ช่วงเลขคลื่น $7123 - 5394\text{ cm}^{-1}$ พิกของ Methemoglobin นี้จะมีพื้นที่ใต้พิกเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับเวลา ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิจัยของ Edita Botonjic-Sehic et al. (2009) ที่พบว่าพื้นที่ใต้พิกของน้ำจะลดลงเมื่อเทียบกับเวลา และเมื่อเวลาผ่านไปจะปรากฏพิกใหม่ขึ้นคือพิกของ Methemoglobin นั้นเอง แต่เนื่องจากการลดลงของพิกนี้เกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว อีกทั้งคราบโลหิตที่พบโดยทั่วไปมักอยู่ในสถานะของแข็ง ถ้านำมาประยุกต์ใช้กับตัวอย่างจริง จะคำนวณอายุได้ภายใน 1-2 ชั่วโมงเท่านั้น

จากการศึกษาการตรวจประมาณหาอายุของคราบโลหิตมนุษย์ ที่เตรียมตัวอย่างด้วยวิธี KBr disc และนำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) ในช่วงเลขคลื่น $4000-400\text{ cm}^{-1}$ จากสเปกตรัม พบพิกที่เกิดจาก N-H stretching ที่เลขคลื่น 3300 cm^{-1} ซึ่งพิกที่เกิดขึ้นมีลักษณะกว้าง เนื่องจากเกิดการซ้อนทับกันกับพิกของ O-H stretching ที่เลขคลื่นช่วง $2500 - 3300\text{ cm}^{-1}$ และซ้อนทับกับพิก C-H stretching ที่ช่วงเลขคลื่น $3000 - 2835\text{ cm}^{-1}$ พบพิก Amide I ที่เกิดจาก C=O stretching ของพันธะเพปไทด์ที่เลขคลื่น 1656 cm^{-1} พิก Amide II ที่เกิดจาก N-H bending ที่เลขคลื่น 1538 cm^{-1} พิกในช่วงเลขคลื่น $1480 - 1369\text{ cm}^{-1}$ เกิดจาก C-H bending ของหมู่ Methyl(CH_3) ของกรดไขมัน และพบพิกในช่วงเลขคลื่น $1354 - 1195\text{ cm}^{-1}$ เกิดจาก PO_4^- stretching ของกรดนิวคลีอิก

และเมื่อนำพื้นที่ใต้พิกของสเปกตรัมของคราบโลหิตเมื่อระยะเวลาผ่านไป มาประมาณอายุของคราบโลหิตโดยการพล็อตจากอัตราส่วนพื้นที่ใต้พิกช่วงเลขคลื่น $3700-3000\text{ cm}^{-1}$ กับพิกในช่วง

เลขคลื่น $770 - 730 \text{ cm}^{-1}$ ซึ่งเป็นพีคที่ไม่มีเปลี่ยนแปลงเมื่อระยะเวลาผ่านไปกับเวลา พบว่าอัตราส่วนพื้นที่ใต้พีคของ A_{3300}/A_{744} มีแนวโน้มลดลงเป็นเส้นตรงอย่างมีนัยสำคัญ เนื่องจากโปรตีนในคราบโลหิตเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโปรตีนในระดับทุติยภูมิ โดยความสัมพันธ์ของอัตราส่วนพื้นที่ใต้พีคของ A_{3300}/A_{744} กับอายุของคราบโลหิตได้สมการเส้นตรง $y = -2.613x + 667.2$ มีค่าสหสัมพันธ์เท่ากับ 1

เมื่อนำสมการเส้นตรงมาใช้ประมาณอายุของคราบโลหิตจากแหล่งต่างๆ กัน พบว่าอายุของคราบโลหิตที่ประมาณได้ค่าใกล้เคียงกับอายุจริงของคราบโลหิตตัวอย่างและเมื่อนำอายุจริงของคราบโลหิตกับอายุของคราบโลหิตที่คำนวณได้จากสมการมาพล็อตกราฟ ได้ค่า R^2 เท่ากับ 0.893 ซึ่งอายุของคราบโลหิตที่ประมาณได้มีความแปรผันตรงกับอายุของคราบโลหิตจริงของตัวอย่าง

การตรวจหาอายุของคราบโลหิตจะช่วยเชื่อมโยงถึงระยะเวลาของการเกิดคราบโลหิต ถูกนำมาใช้เป็นวัตถุพยาน เวลาที่อาชญากรรมเกิดขึ้นได้ ซึ่งหากมีเหตุอาชญากรรมเกิดขึ้น แล้วพบวัตถุพยานที่เป็นคราบโลหิตเราจำเป็นต้องใช้เทคนิคหรือวิธีการทางเคมีที่เหมาะสม ซึ่งเทคนิค FTIR นั้นสามารถใช้ในการประมาณเวลาในการเกิดเหตุอาชญากรรมได้ใกล้เคียงความเป็นจริง และเป็นเทคนิคที่ไม่ทำลายตัวอย่าง และช่วยให้วัตถุพยานไม่เสื่อมคุณค่า

ข้อเสนอแนะ

ในการศึกษารั้งนี้เป็นการทดสอบขั้นต้นเพื่อศึกษาวิธีการตรวจหาอายุคราบโลหิตด้วยเทคนิค Fourier Transform Infrared Spectroscopy สำหรับผู้ที่สนใจและต้องการที่จะศึกษาเพิ่มเติมเพื่อใช้ในงานด้านนิติวิทยาศาสตร์มีดังนี้

1. ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนในคราบโลหิตในช่วงเวลาที่เพิ่มมากขึ้น
2. ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของคราบโลหิตบนพื้นผิวที่แตกต่างกันเช่น กระดาษ พื้นซีเมนต์

ซีเมนต์

3. ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของคราบโลหิตที่อุณหภูมิและความชื้นและความร้อนต่างๆกัน

บรรณานุกรม

ภาษาไทย

- พิพัฒน์ เจริญศรี. ระบบไหลเวียนเลือด. ใน: สรีรวิทยา. คณะจารย์ภาควิชาสรีรวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล. กรุงเทพฯ: ฤทธิศิริการพิมพ์, 2536.
- สุวรรณ ชีระวีรพันธ์, วิชุดา สิวทยาวัฒน์และเพ็ญ โฉม พงวิหา. สรีรวิทยาระบบไหลเวียนโลหิต. คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล. กรุงเทพฯ: ไทมิตการพิมพ์, 2539.
- อรรถพล แซ่มสุวรรณวงศ์, พล.ต.อ.และคณะ. นิติวิทยาศาสตร์ 1 เพื่อการสืบสวนสอบสวน. พิมพ์ครั้งที่ 4. กรุงเทพฯ: บริษัท ทีซีจี พรินติ้ง จำกัด, 2546.
- แม่น อมรสิทธิ์, อมร เพชรสม. หลักการและเทคนิคการวิเคราะห์เชิงเครื่องมือ. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์ ชวนพิมพ์, 2535.
- ณรงค์ ไซตตุต. วิธีการวิเคราะห์โดยอุปกรณ์ Instrumental Methods of Analysis. พิมพ์ครั้งที่ 9. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยรามคำแหง, 2548.
- นันทนา อารมย์ดี. Infrared Spectroscopy. ภาควิชาเคมี คณะเภสัชศาสตร์ ขอนแก่น: มหาวิทยาลัยขอนแก่น, 2535.
- กฤษณะ พวงระชา. การประมาณคราบอายุเลือด. นครปฐม: มหาวิทยาลัยศิลปากร, 2552
- รศ.พ.ต.อ.อุทัย ศิริวานินทร และคณะ. เอกสารประกอบการเรียน นิติเวชศาสตร์. นครปฐม: โรงเรียนนายร้อยตำรวจ สามพราน, 2548.
- พ.ต.ท.หญิง ธรรมภรณ์ ธนวัฒน์วงศ์. เอกสารประกอบการเรียน นิติเวชศาสตร์. นครปฐม: โรงเรียนนายร้อยตำรวจ สามพราน, 2548.
- วิน เขษมศรี, โลหิตวิทยา [ออนไลน์], เข้าถึงเมื่อ 15 พฤษภาคม 2554 เข้าถึงได้จาก www.pirun.ku.ac.th/~fsciwcc.HEMATO.PDF

ภาษาอังกฤษ

- Barcot O, Balarin M, et al. "Investigation of spermatozoa and seminal plasma by fourier transform infrared spectroscopy". Applied Spectroscopy 61 (2006) : 56–62.

Edita Bottonjic-Sehic, Chris W. Brown, et al. "Forensic Application of Near –Infrared Spectroscopy : Aging of Bloodstains". Spectroscopy (2009) :1–6.

Hiroiyuki Inoue, Fukutaro Takabe, et al. "A new marker for estimation of bloodstain age by high performance liquid chromatography". Forensic Science International 57 (1992) : 17-27.

Jan Andrasko, B Rosén, "Sensitive identification of hemoglobin in bloodstains from different species by high performance liquid chromatography with combined UV and fluorescence detection". Journal of Forensic Sciences 39 (1994) : 1018-1025.

Stacey Anderson, Brandi Howard, et al. "A method for determining the age of a bloodstain". Forensic Science International 148 (2005) : 37-45.

Strasser Stefan, Zink Albert, et al. "Age determination of blood spots in forensic medicine by force spectroscopy". Forensic Science International 170 (2007) : 8-14.

Anonymous. FTIR Diagram block[Online], Accessed 24 May 2011. Available from http://faculty.sdmiramar.edu/fgarces/LabMatters/Instruments/FTIR/Pic_FTIR/FTIR-1.gif

Anonymous. DRIFT[Online], Accessed 24 May 2011. Available from <http://www.shu.ac.uk/research/meri/equipment/spectroscopy5.html>

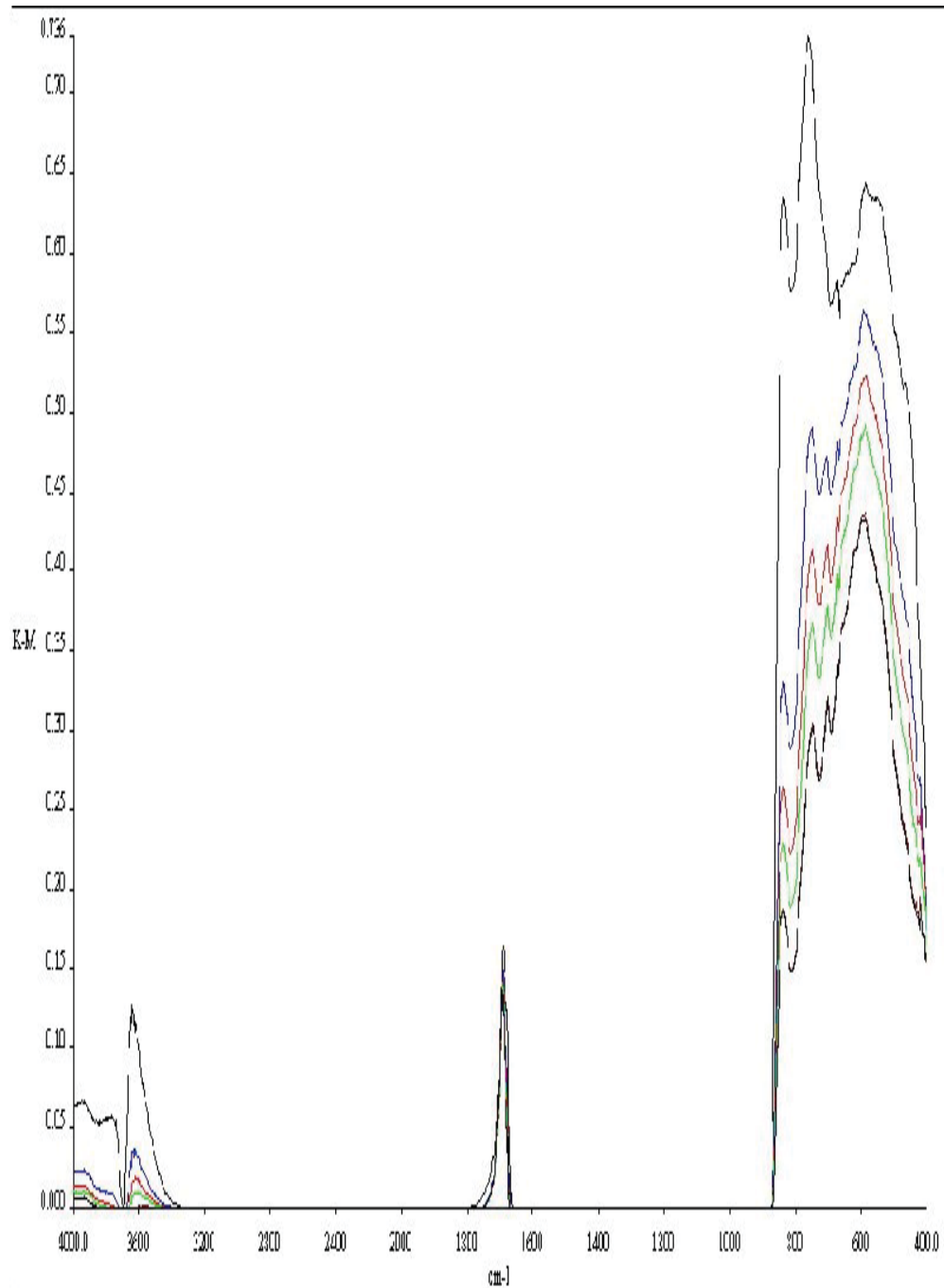
Stanislaus. Interpretation of Infrared Spectra [Online], Accessed 28 May 2011. Available from <http://wwwchem.csustan.edu/Tutorials/INFRARED.HTM>

ภาคผนวก

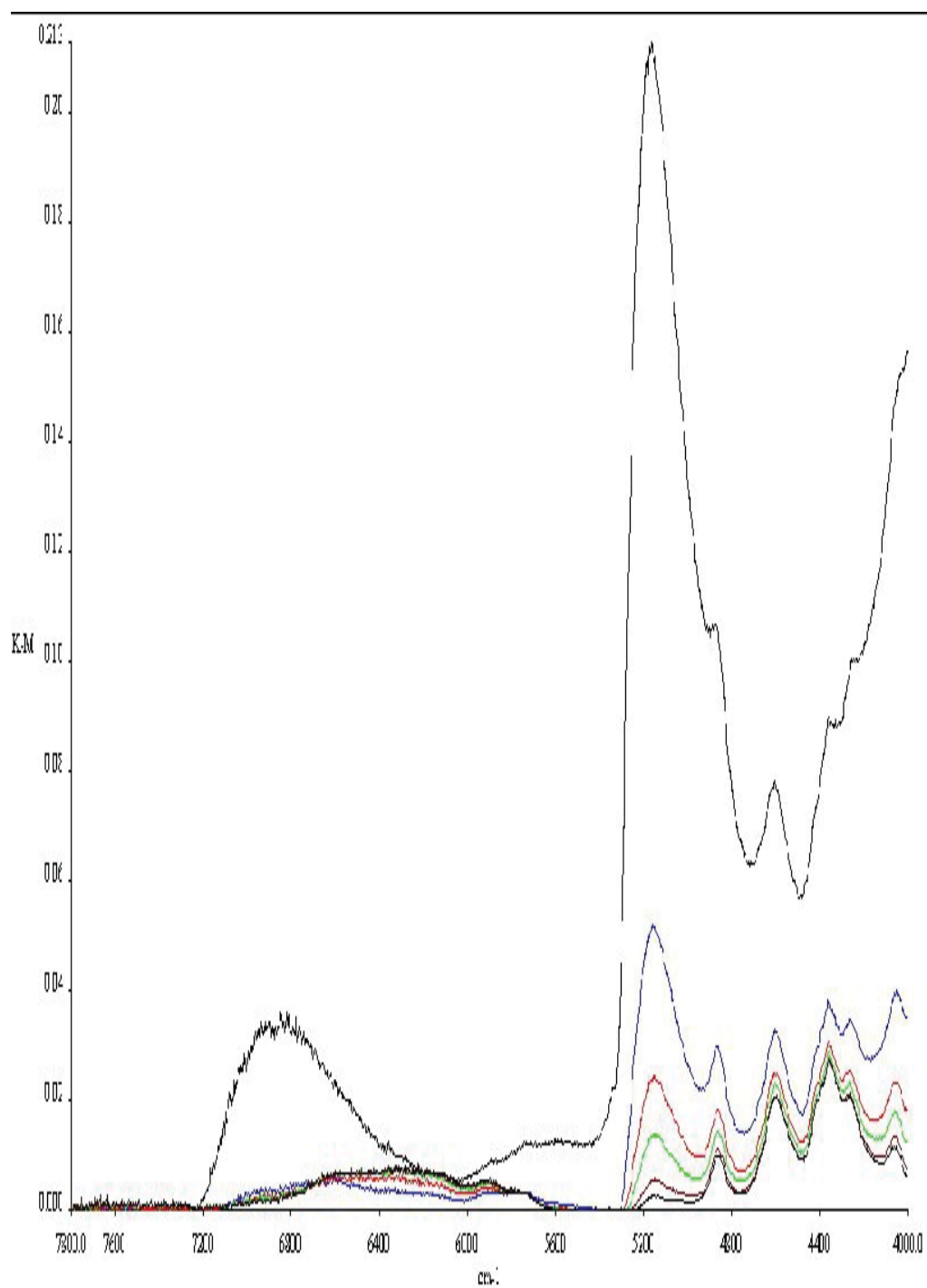
ภาคผนวก ก

สเปกตรัมที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิค Diffuse Reflectance Infrared Fourier Transform
Spectroscopy (DRIFT FTIR)

สเปกตรัมที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิค Diffuse Reflectance Infrared Fourier Transform Spectroscopy (DRIFT FTIR)



ภาพที่ 10 สเปกตรัมของคราบโลहितที่ระยะเวลาต่างๆ กันในช่วงเลขคลื่น 4000 - 400 cm⁻¹

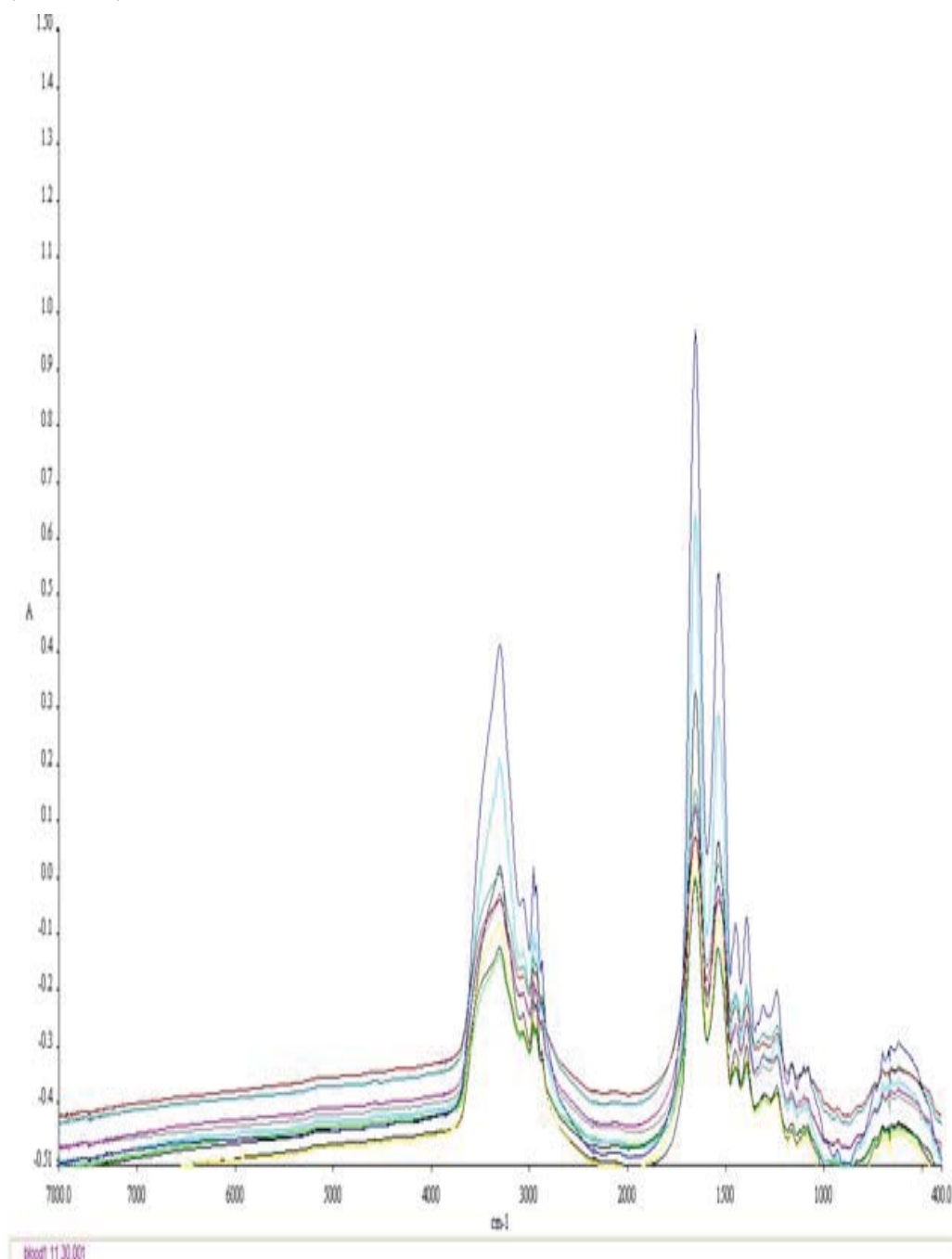


ภาพที่ 11 สเปกตรัมของกราบโลหิตที่ระยะเวลาต่างๆ กัน ในช่วงเลขคลื่น 7800-4000 cm^{-1}

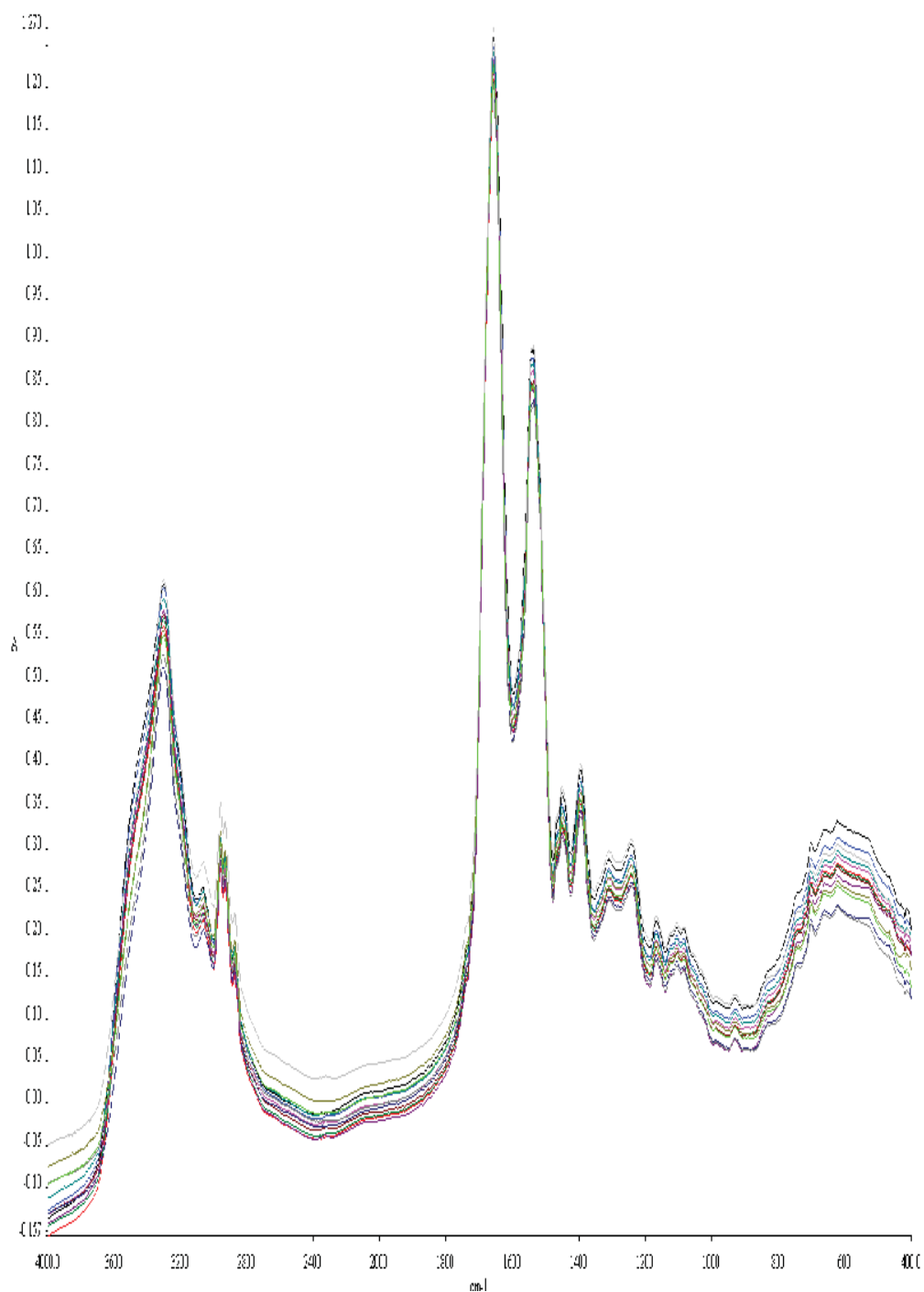
ภาคผนวก ข

สเปกตรัมที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิค Transmission Infrared Fourier Transform Spectroscopy
(TIFT FTIR)

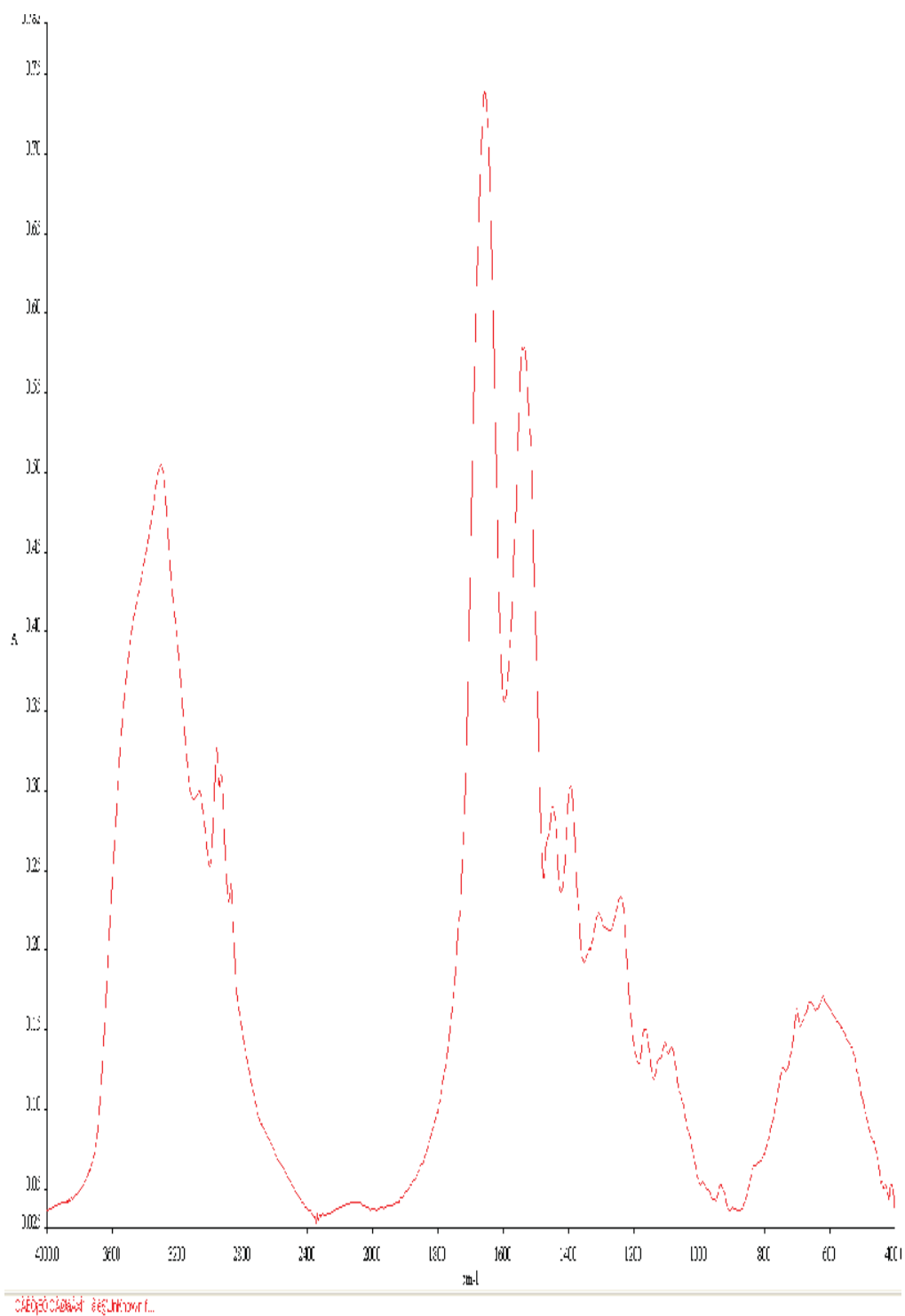
สเปกตรัมที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิค Transmission Infrared Fourier Transform Spectroscopy (TIFT FTIR)



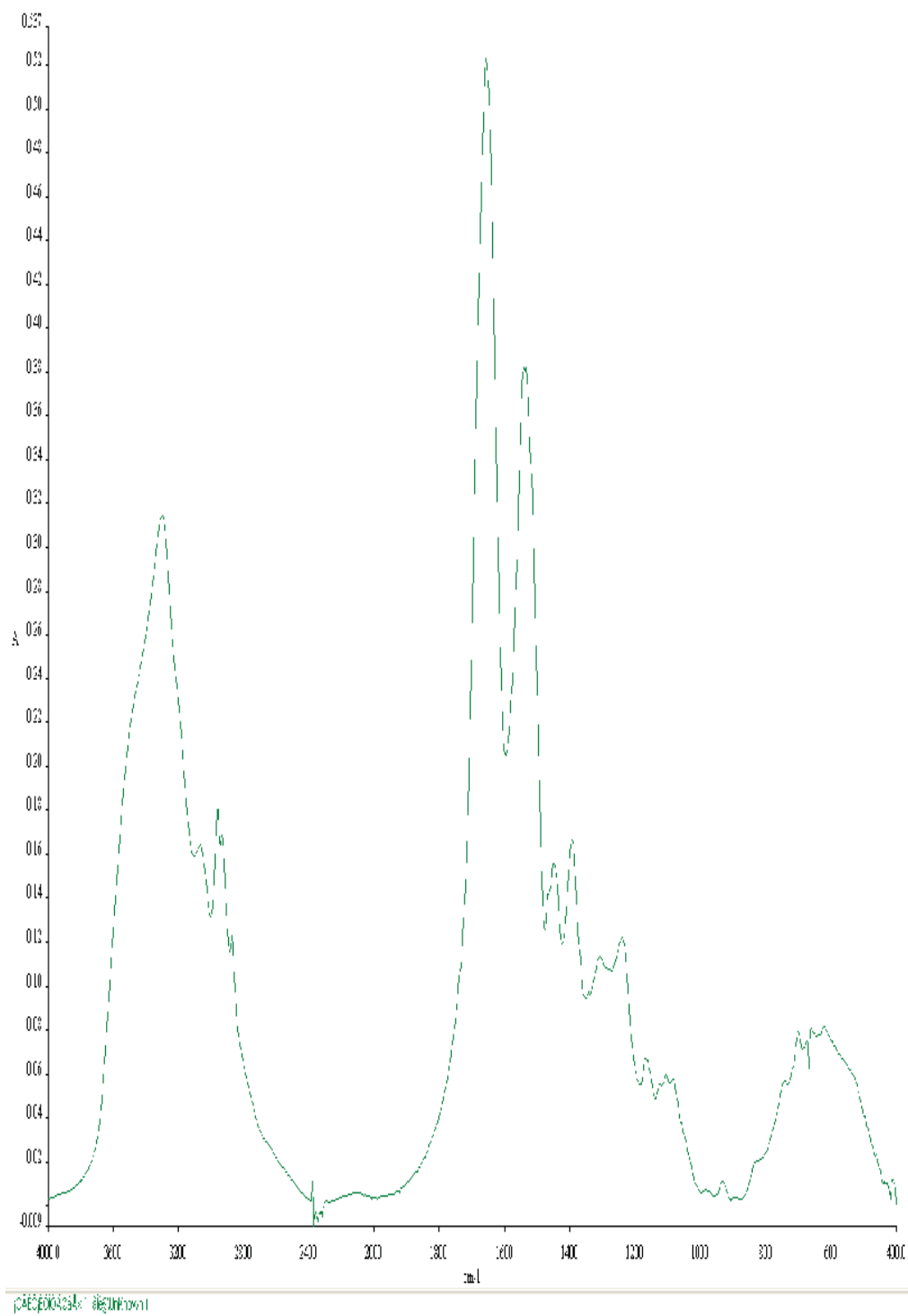
ภาพที่ 12 สเปกตรัมของคราบไล้หินในช่วงเลขคลื่น 7800 – 400 cm⁻¹



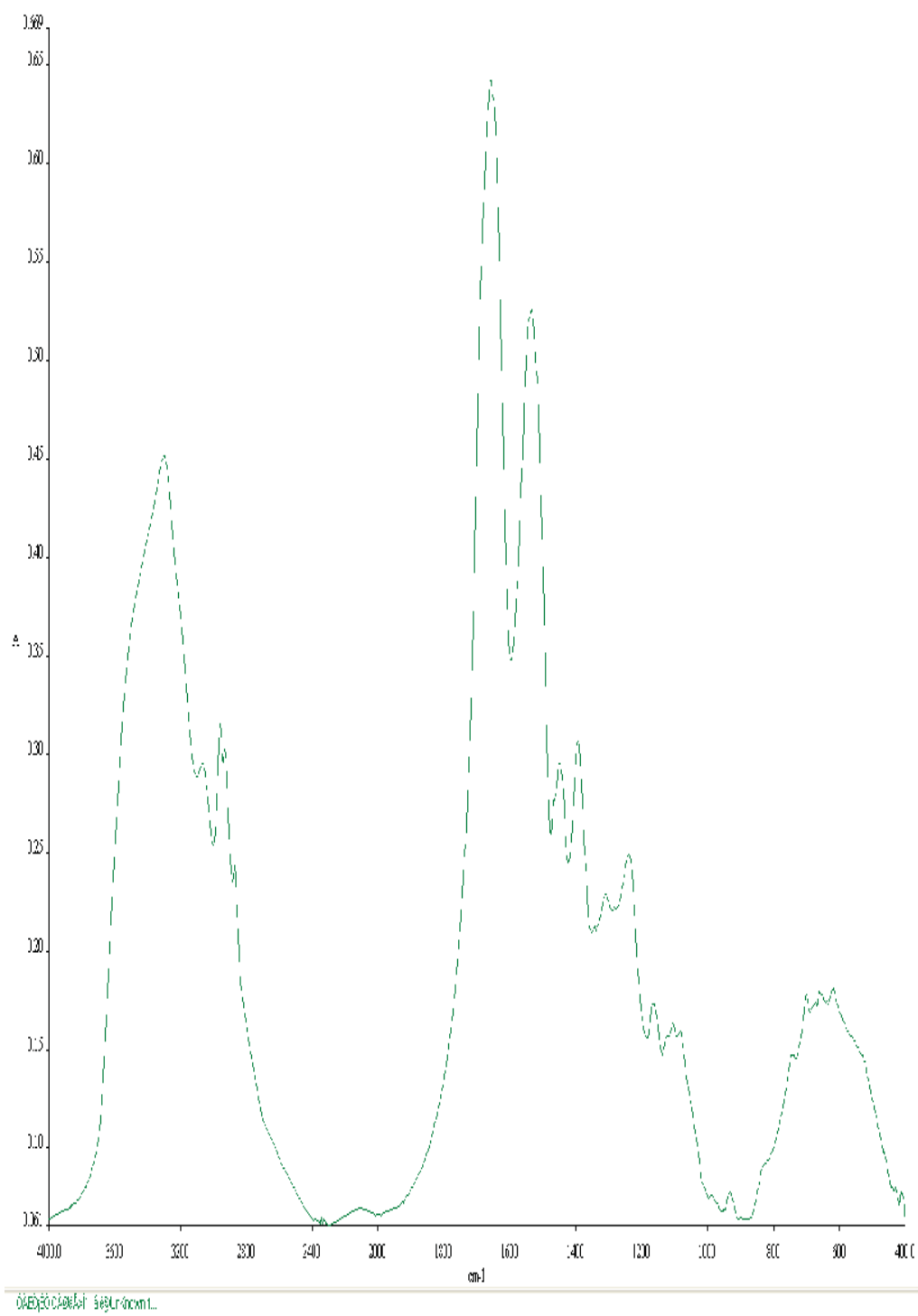
ภาพที่ 13 สเปกตรัมของกราฟโลहितแสดงการลดลงของพื้นที่ได้ฟิกลในช่วงระยะเวลา 4 วัน ของ
วิธีการเตรียมตัวอย่างโดย การใช้ KBr disc ทำการวิเคราะห์ซ้ำในระยะเวลาต่างกัน



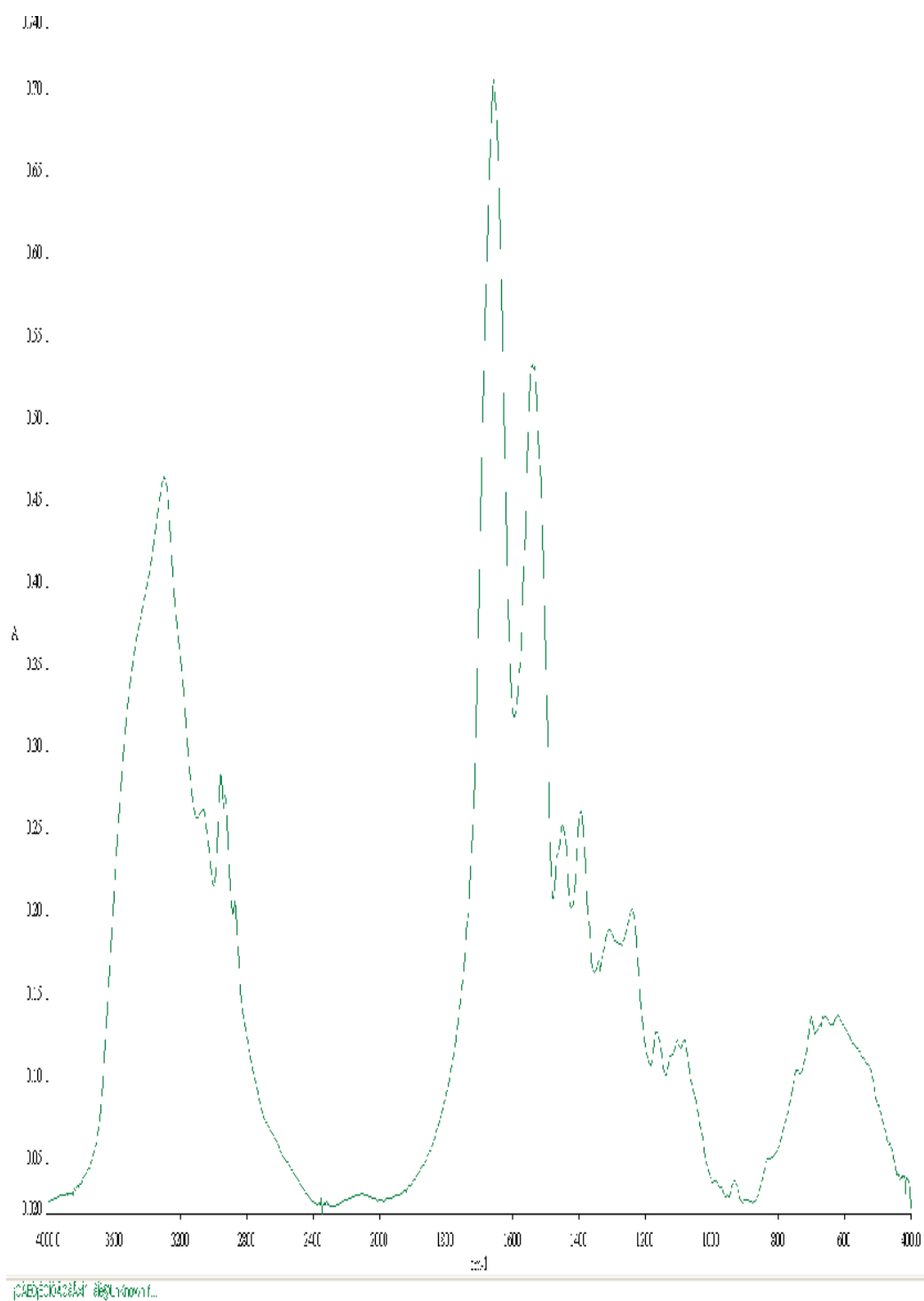
ภาพที่14 สเปกตรัมของกราบโลहितตัวอย่างอาสาสมัครคนที่ 1



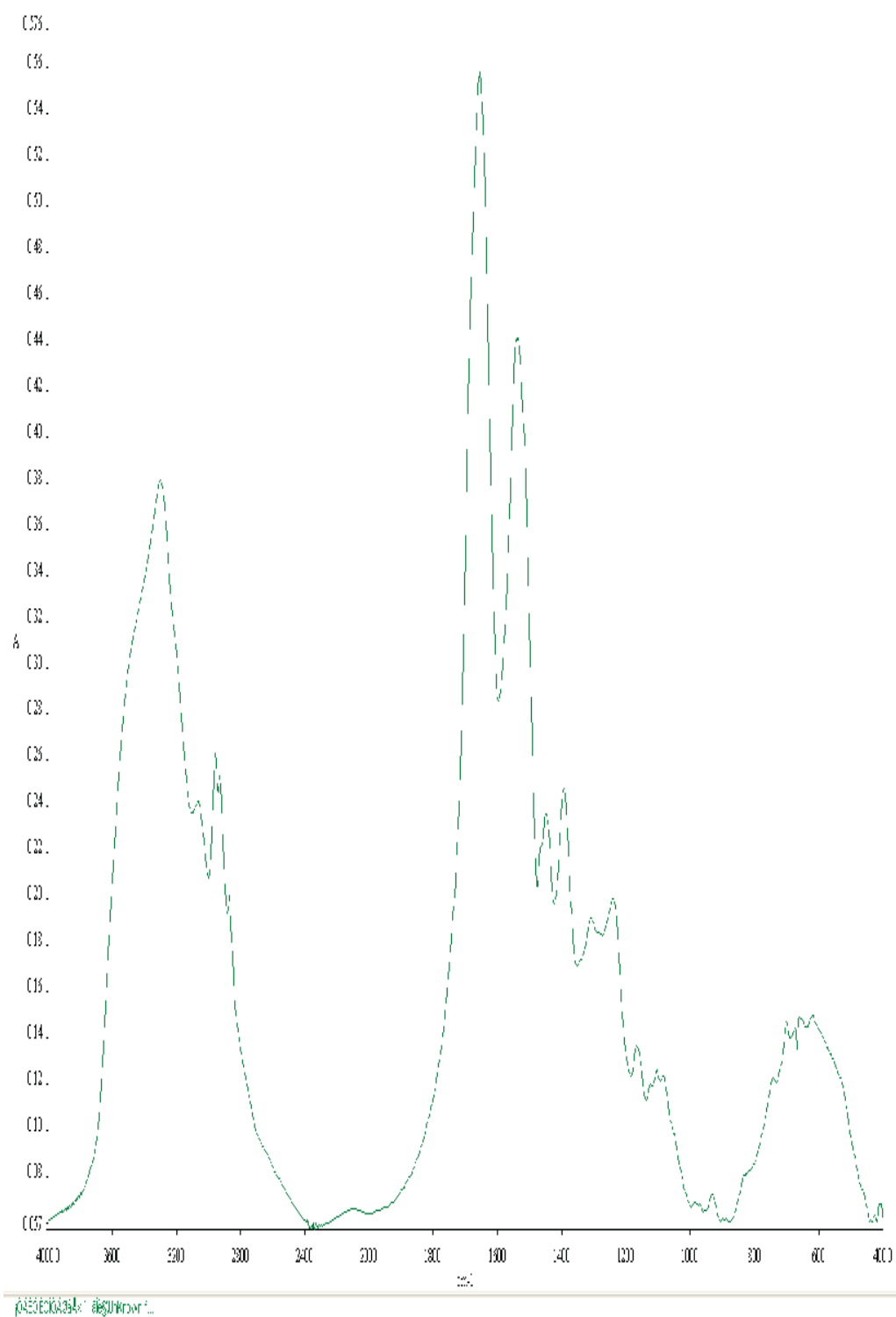
ภาพที่15 สเปกตรัมของคราบโลหิตด้วยอย่างอาสาสมัครคนที่ 2



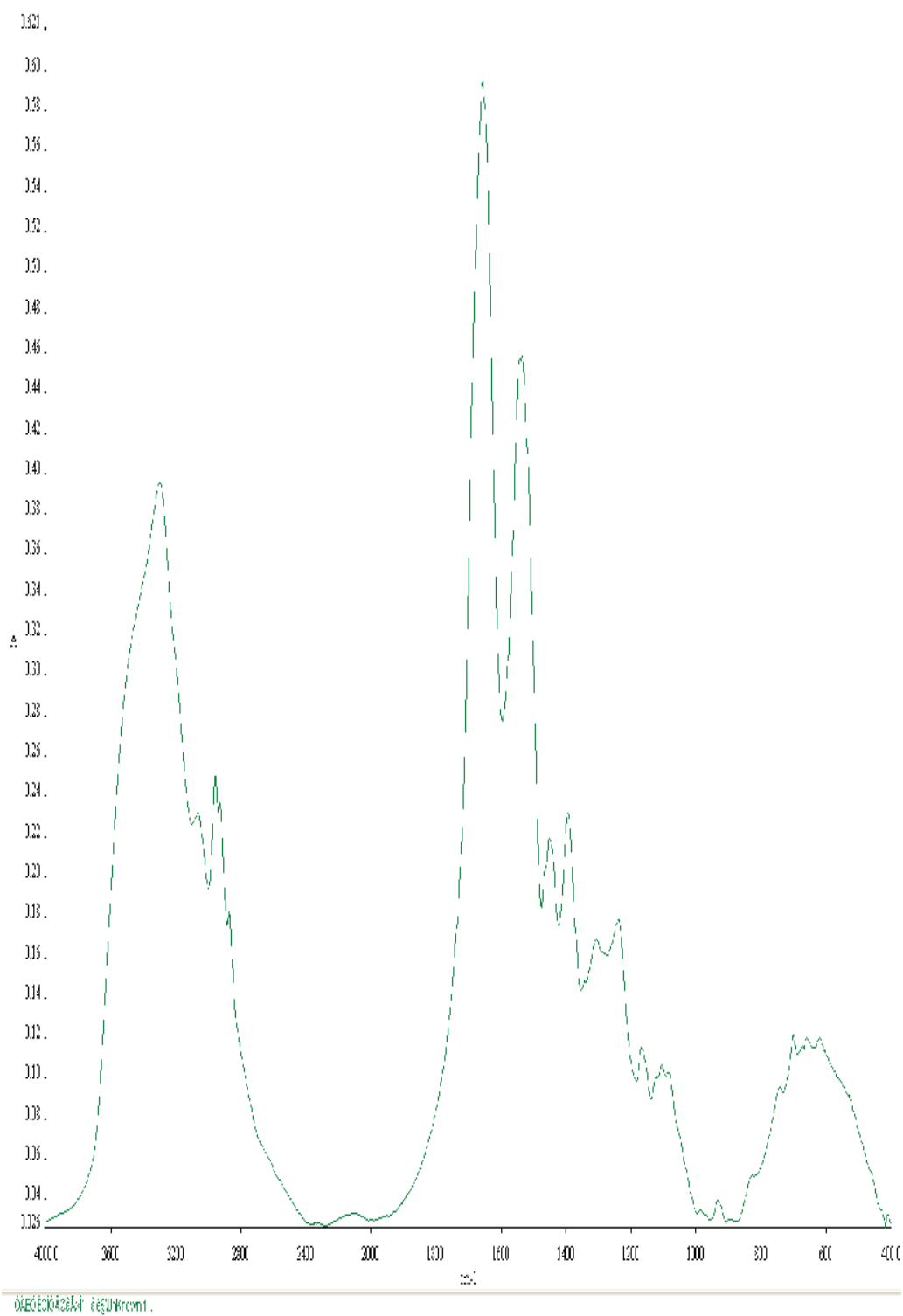
ภาพที่16 สเปกตรัมของกราบโลहितตัวอย่างอาสาสมัครคนที่ 3



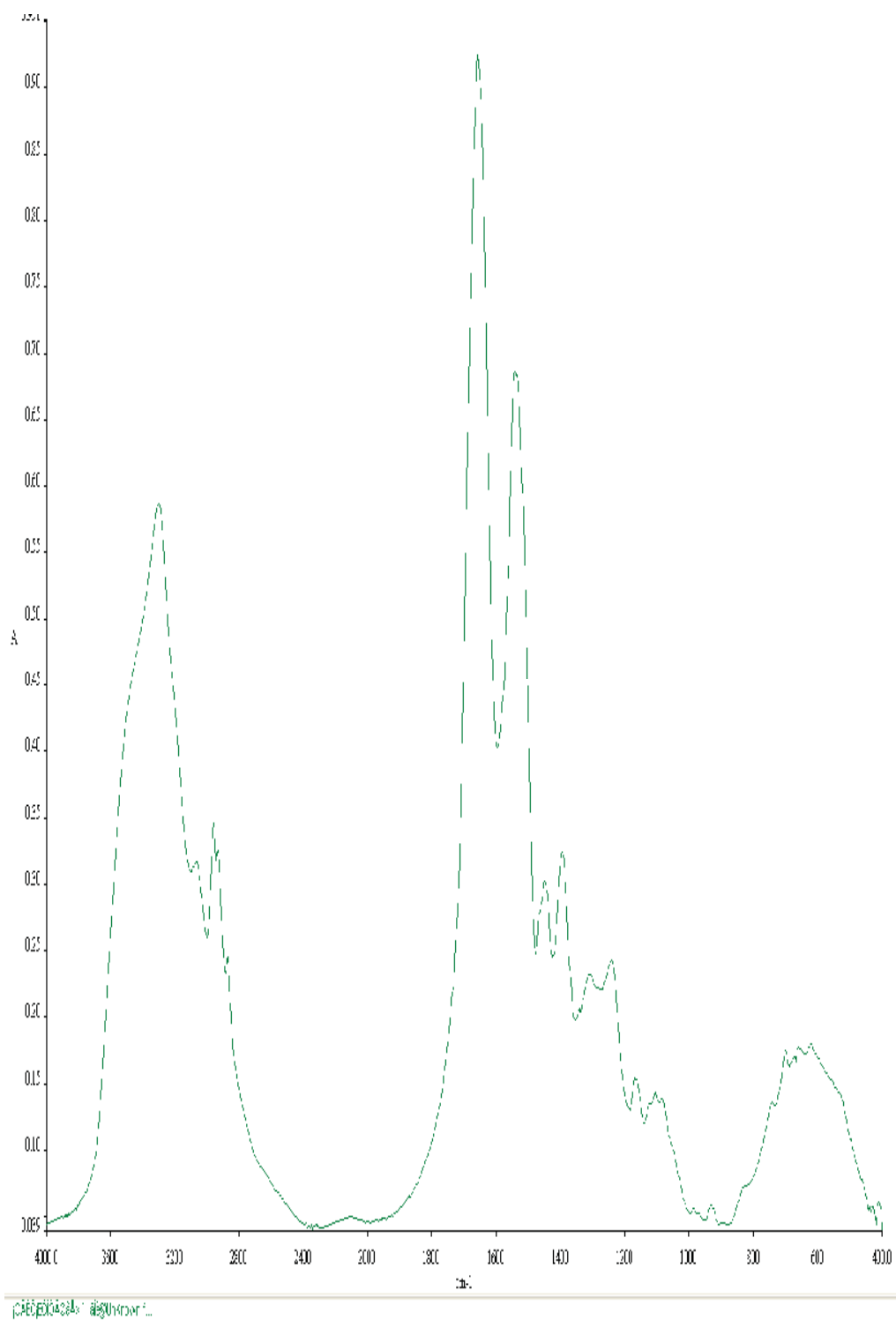
ภาพที่ 17 สเปกตรัมของกราบโลหิตตัวอย่างอาสาสมัครคนที่ 4



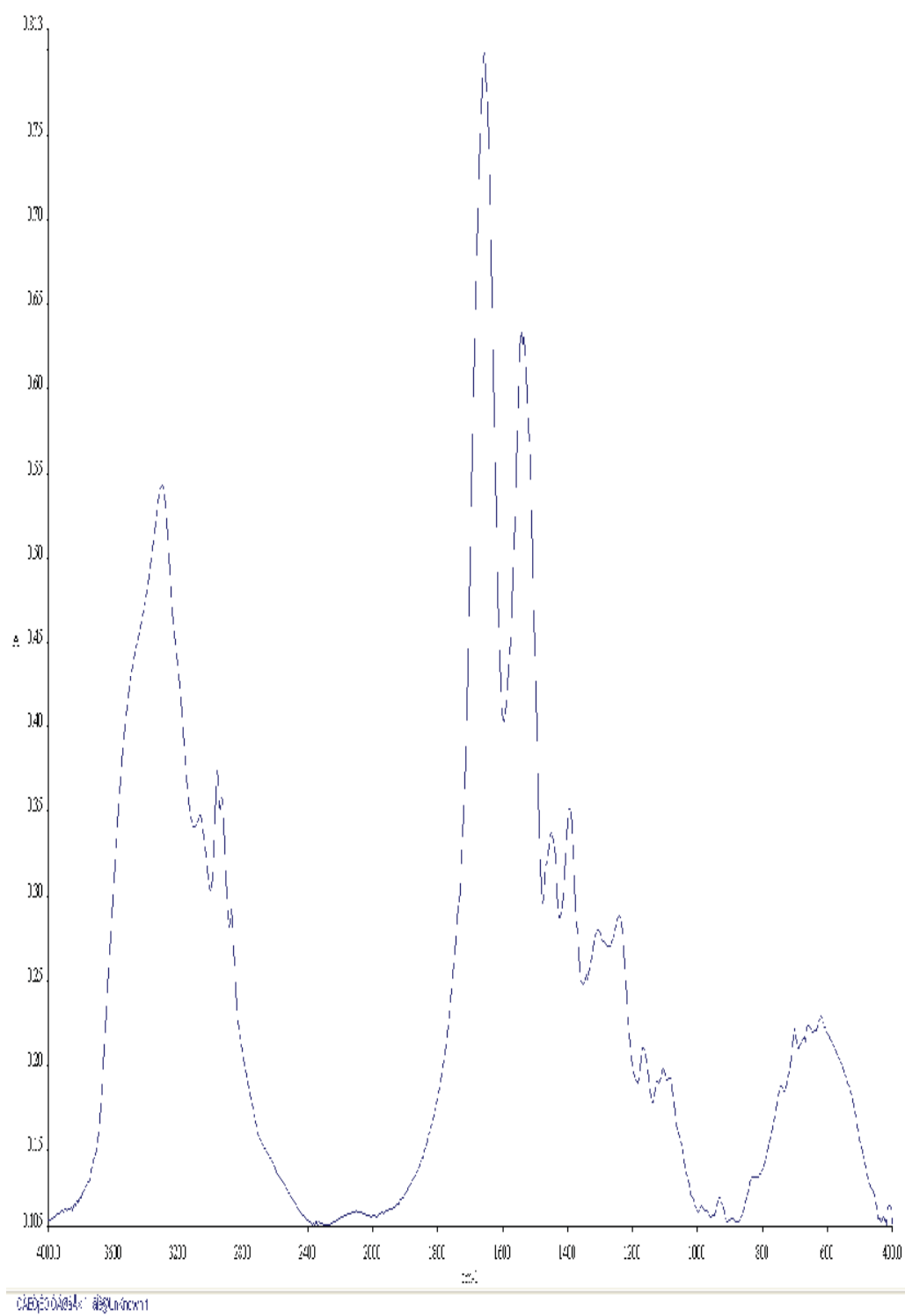
ภาพที่18 สเปกตรัมของกราบโลहितตัวอย่างอาสาสมัครคนที่ 5



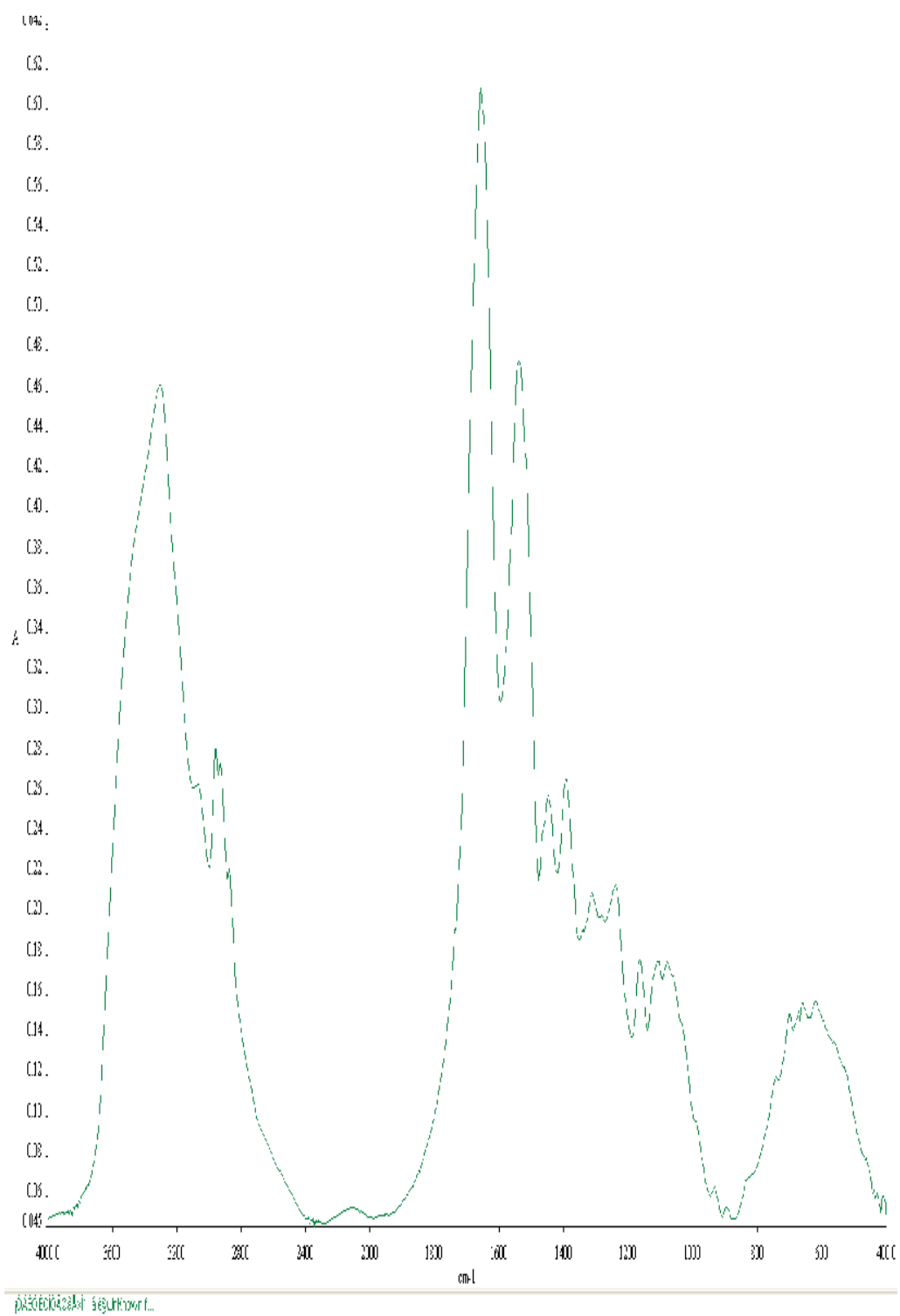
ภาพที่19 สเปกตรัมของกราบโลหิตตัวอย่างอาสาสมัครคนที่ 6



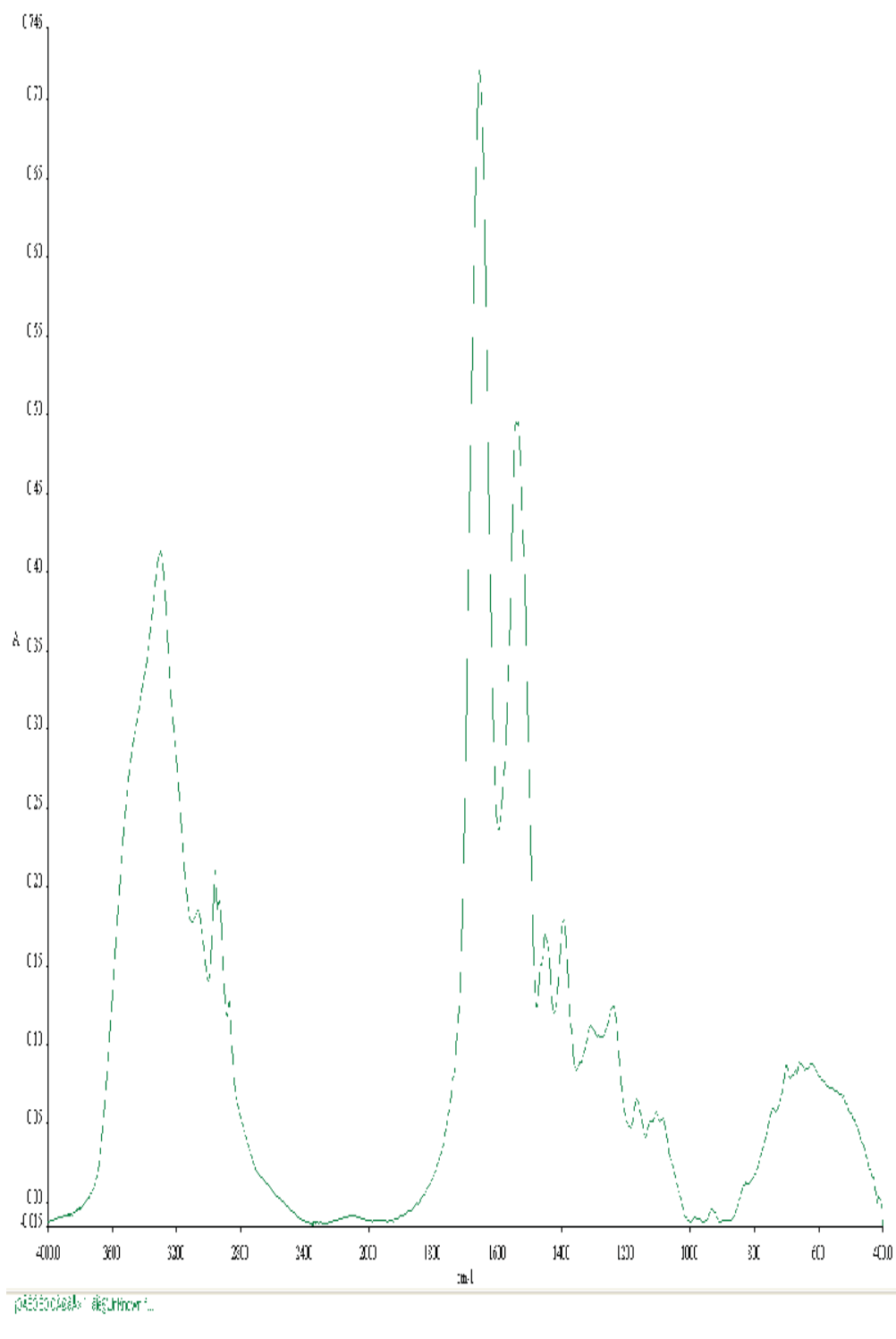
ภาพที่ 20 สเปกตรัมของกราบไลต์ตัวอย่างอาสาสมัครคนที่ 7



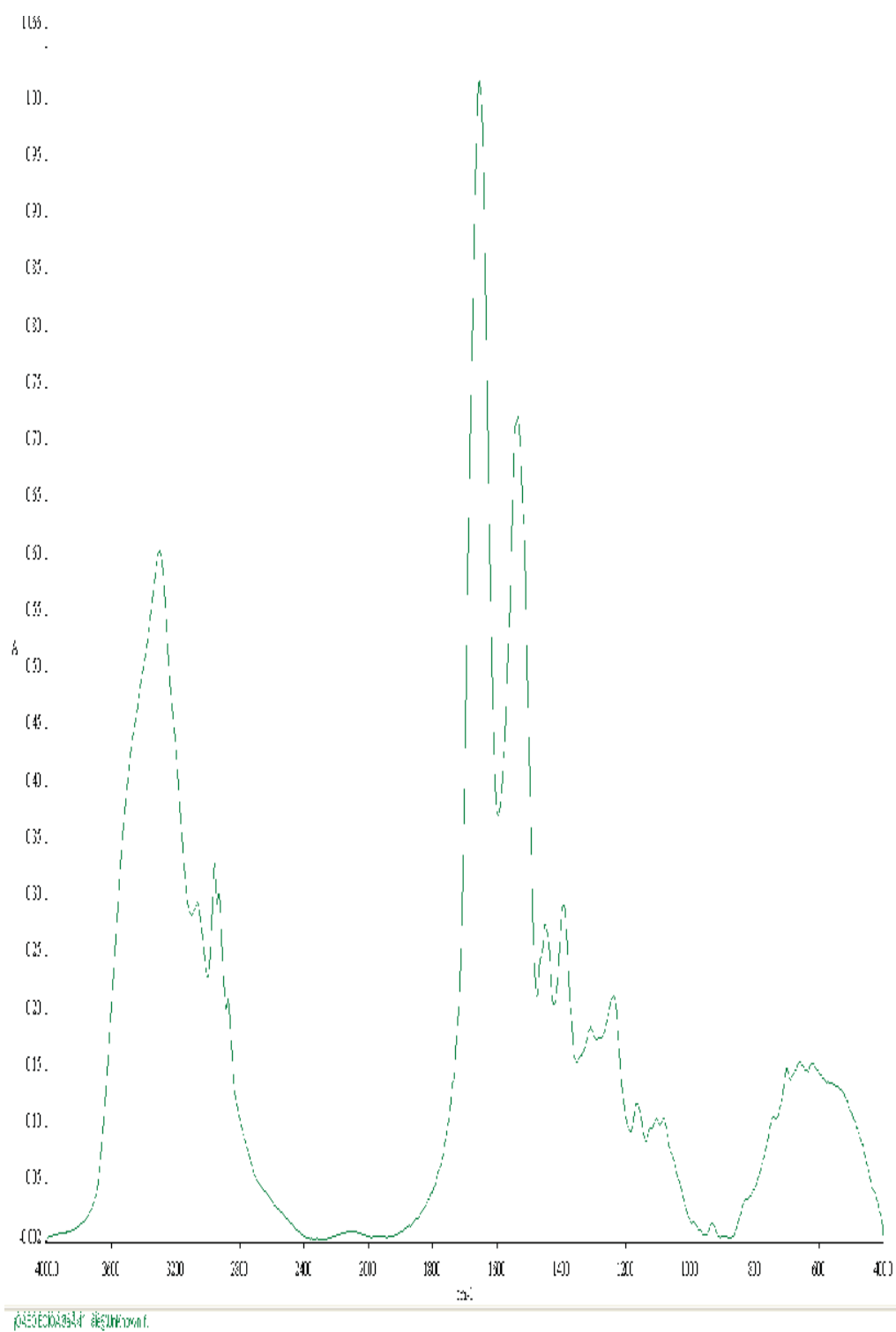
ภาพที่ 21 สเปกตรัมของกราบไลต์ตัวอย่างอาสาสมัครคนที่ 8



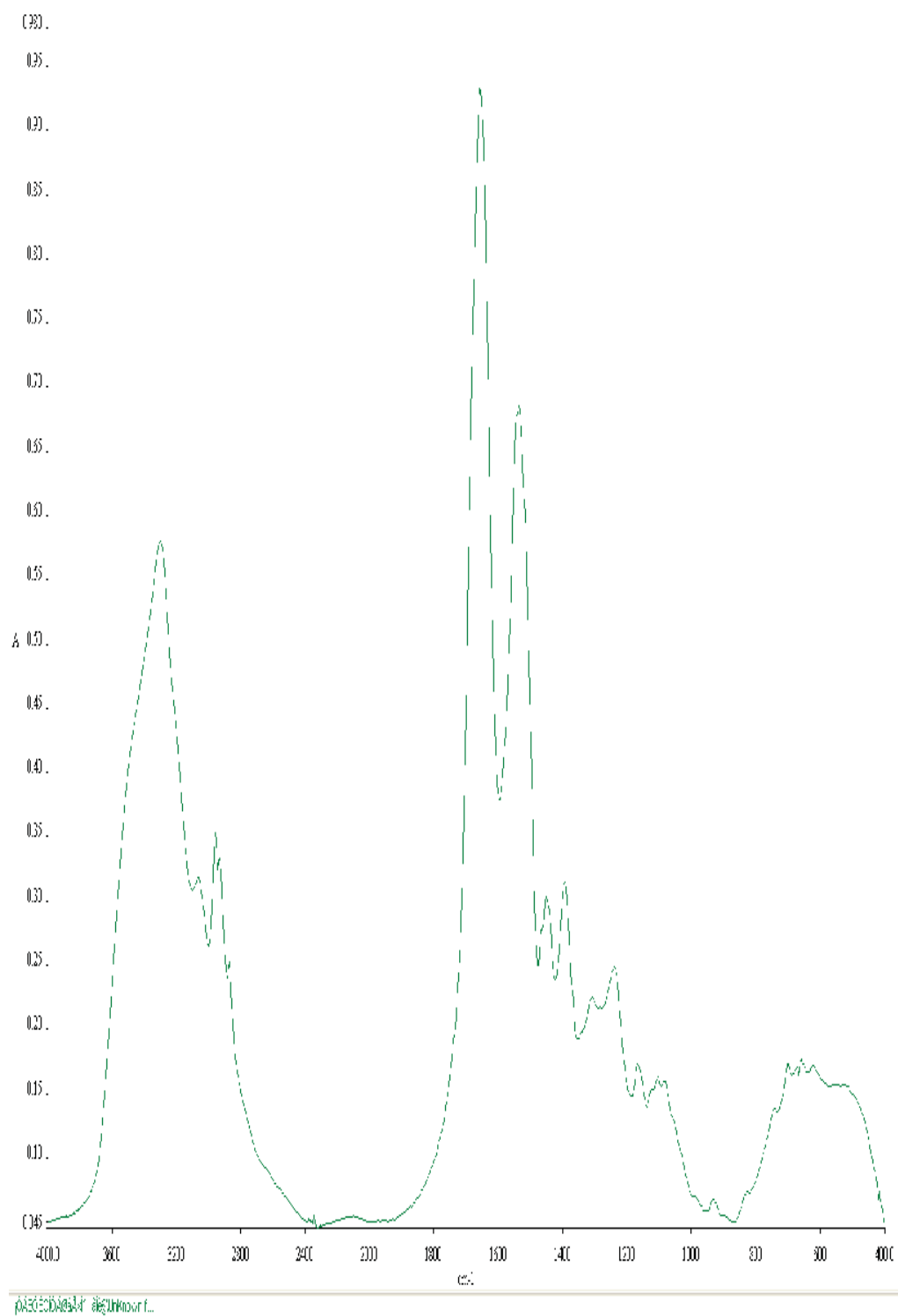
ภาพที่ 22 สเปกตรัมของกราบไลต์ตัวอย่างอาสาสมัครคนที่ 9



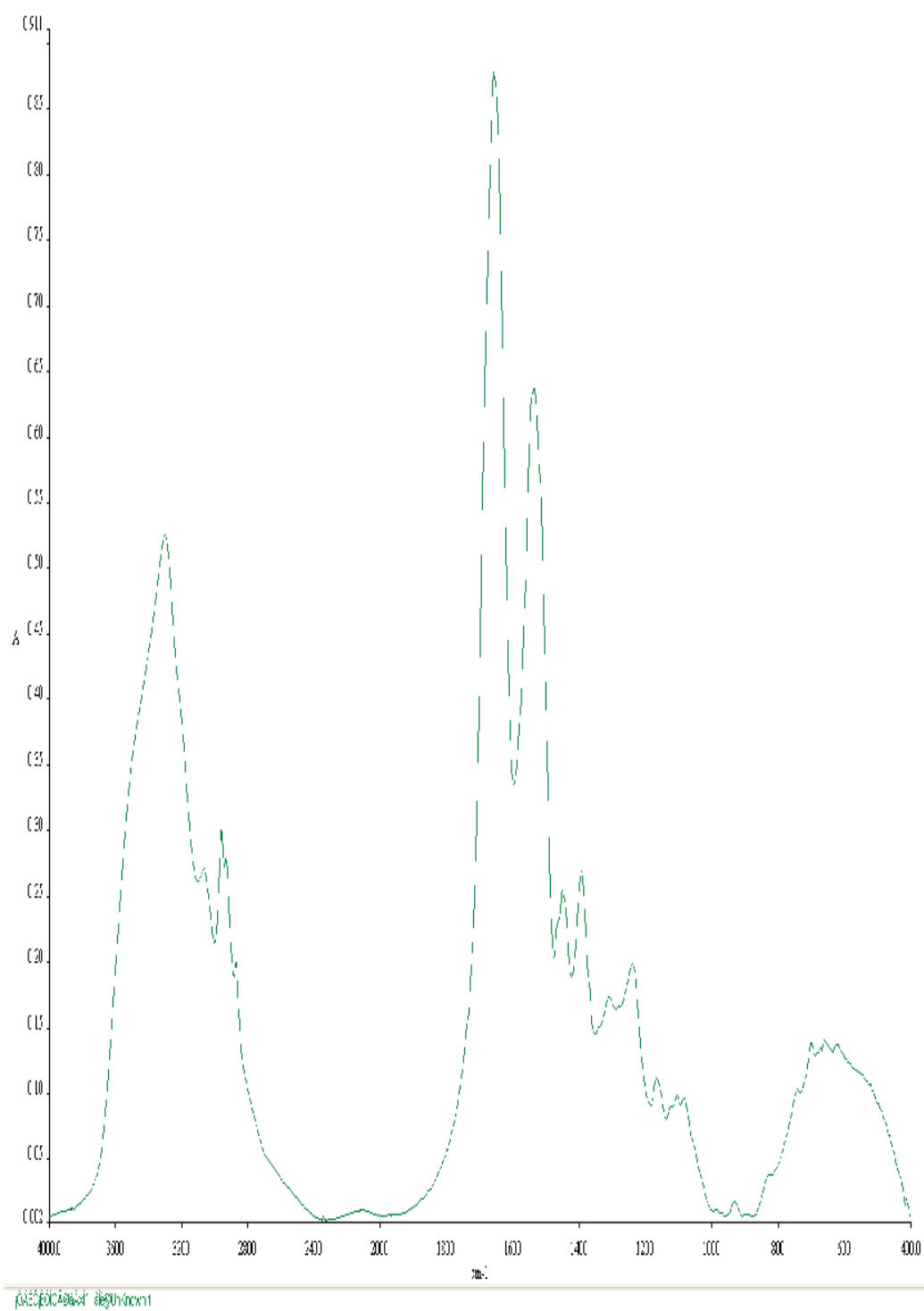
ภาพที่ 23 สเปกตรัมของกราบไลต์ตัวอย่างอาสาสมัครคนที่ 10



ภาพที่ 24 สเปกตรัมของกราบโลहितตัวอย่างอาสาสมัครคนที่ 11



ภาพที่ 25 สเปกตรัมของกราบไลต์ตัวอย่างอาสาสมัครคนที่ 12



ภาพที่ 26 สเปกตรัมของกราบโลहितตัวอย่างอาสาสมัครคนที่ 13

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ-ชื่อสกุล	นายสราวุธ แหยมศิริ
ที่อยู่	85 หมู่ 7 ตำบลคอนทราย อำเภอโศกร จังหวัดราชบุรี 70120
ที่ทำงาน	งานชั้นสูตรสาธารณสุข โรงพยาบาลสมเด็จพระยุพราช จอมบึง อำเภोजอมบึง จังหวัดราชบุรี
ประวัติการศึกษา	
พ.ศ. 2546	ประกาศนียบัตรวิทยาศาสตร์การแพทย์ สาขาพยาบาลคลินิก วิทยาลัยเทคโนโลยีทางการแพทย์และสาธารณสุขกาญจนาภิเษก สังกัดพระบรมราชชนก กระทรวงสาธารณสุข
พ.ศ. 2549	ปริญญาตรี เอกรัฐประศาสนศาสตรบัณฑิต สาขาบริหารรัฐกิจ มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมมาธิราช
พ.ศ. 2552	ศึกษาต่อระดับปริญญาโท สาขาบริหารรัฐกิจ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร
.	.
ประวัติการทำงาน	
พ.ศ. 2546-ปัจจุบัน	รับราชการตำแหน่ง เจ้าพนักงานวิทยาศาสตร์การแพทย์ โรงพยาบาลสมเด็จพระยุพราชจอมบึง อำเภोजอมบึง จังหวัดราชบุรี