

## การตรวจหาอายุคราบโลหิตด้วย Fourier Transform Infrared Spectroscopy\*

## Determination of the age of bloodstain by Fourier Transform Infrared Spectroscopy

สรารุช แหยมศิริ และคณะ\*\*

## บทคัดย่อ

คราบโลหิตของมนุษย์เป็นหลักฐานทางนิติวิทยาศาสตร์ที่สำคัญ และมักจะพบในสถานที่เกิดเหตุ ในการศึกษานี้ใช้เทคนิค Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) ในการตรวจหาอายุของคราบโลหิต ทำการทดลองโดยนำโลหิตของมนุษย์มาหยดลงบนกระจกสไลด์แล้วปล่อยให้อุณหภูมิตั้งที่ระยะเวลาต่าง ๆ กัน จากนั้นนำมาเตรียมตัวอย่างโดยใช้วิธี KBr disc และวิเคราะห์ด้วยเทคนิค FTIR

สเปกตรัมของ IR ของคราบโลหิตแสดงองค์ประกอบของ N-H stretching ที่เลขคลื่น  $3300\text{ cm}^{-1}$  ซึ่งพีคที่เกิดขึ้นมีลักษณะกว้าง เนื่องจากเกิดการซ้อนทับกันกับพีคของ O-H stretching ที่เลขคลื่นช่วงนี้ พบพีค Amide I และพีค Amide II ที่เลขคลื่น  $1656\text{ cm}^{-1}$  และ  $1538\text{ cm}^{-1}$  ตามลำดับ และพบพีคที่เลขคลื่น  $1354\text{ cm}^{-1}$  และ  $1195\text{ cm}^{-1}$  ที่เกิดจาก  $\text{PO}_4$  stretching ของกรดนิวคลีอิก เมื่อนำพื้นที่ใต้พีคในช่วงเลขคลื่น  $3700 - 3000\text{ cm}^{-1}$  ( $A_{3300}$ ) มาใช้ในการคำนวณเป็นอัตราส่วนของพื้นที่ที่วัดได้นี้กับพื้นที่ของพีคที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงเมื่อเวลาผ่านไปในช่วงเลขคลื่น  $770 - 730\text{ cm}^{-1}$  ( $A_{744}$ ) เมื่อนำอัตราส่วนของพื้นที่พีค  $A_{3300}/A_{744}$  มาพล็อตกราฟเทียบกับอายุของคราบโลหิต มีการลดลงเป็นเส้นตรงอย่างมีนัยสำคัญตามกราฟสมการเส้นตรง  $y = -2.613x + 667.2$  ( $R^2 = 1$ ) เมื่อนำตัวอย่างคราบโลหิตจากแหล่งต่างๆ มาทำการวิเคราะห์หาอายุจากสมการ พบว่าสามารถประมาณอายุของคราบโลหิตได้ใกล้เคียงกับอายุจริงของโลหิต ดังนั้นการศึกษานี้มีความเหมาะสมสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในประมาณอายุของคราบโลหิตในที่เกิดเหตุได้

**คำสำคัญ:** อายุคราบโลหิต/ นิติวิทยาศาสตร์/ FTIR

## Abstract.

The human bloodstains are important forensic evidence often found in the events 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

\*บทความนี้เป็นส่วนหนึ่งของงานวิทยานิพนธ์ 510704 ภาคการศึกษาที่ 2 ปีการศึกษา 2554 หลักสูตรนิติวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร

\*\* นายสรารุช แหยมศิริ สาขาวิชานิติวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร นางสาวศิริรัตน์ ชูสกุลเกรียง, นางสาวนรพรรณ วัฒนพร ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร เจ้าพนักงานวิทยาศาสตร์ รพ.สมเด็จพระยุพราชจอมบึง จ.ราชบุรี E-mail address : sf4000@hotmail.com อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ อาจารย์ ดร. ศุภชัย ศุภลักษณ์นารี ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร

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  $3300\text{ cm}^{-1}$ . 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  $1656\text{ cm}^{-1}$  and  $1538\text{ cm}^{-1}$  respectively. The band between  $1354\text{ cm}^{-1}$  and  $1195\text{ cm}^{-1}$  can be ascribed to the stretching of phosphate group in nucleic acid. The integrated area of the bands between  $3700\text{ cm}^{-1}$  -  $3000\text{ cm}^{-1}$  ( $A_{3300}$ ) was used to calculate the ratio of the area to the area of the peak in the range of  $770 - 730\text{ cm}^{-1}$  ( $A_{744}$ ). 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,  $y = -2.613 + 667.2$  ( $R^2 = 1$ ). 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.

**Keyword:** Age of bloodstain/ Forensic/ FTIR

## บทนำ

คราบโลหิตหรือหยดเลือดนั้นเป็นวัตถุพยานที่มักพบได้บ่อยในสถานที่เกิดเหตุ และมีความสำคัญสามารถนำไปใช้ในการสืบสวนได้ ใช้ตรวจยืนยันตัวบุคคลหรือพิสูจน์เอกลักษณ์บุคคล และที่สำคัญช่วยในการประมาณระยะเวลาการเกิดเหตุได้ สำหรับการประมาณอายุของคราบโลหิตยังคงเป็นที่น่าสนใจอย่างยิ่งในทางนิติวิทยาศาสตร์ เป้าหมายในการทำการวิจัยครั้งนี้โดยศึกษาถึงความเป็นไปได้ในการตรวจหาอายุคราบโลหิตที่พบในสถานที่เกิดเหตุ โดยนำเทคนิค Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) มาใช้ ก่อนที่แนวคิดนี้จะถูกนำไปใช้จำเป็นอย่างยิ่งจะต้องศึกษาคุณสมบัติของสเปกตรัมของคราบโลหิตในช่วงเวลาต่างๆ และการเปลี่ยนแปลงของสเปกตรัมเพื่อใช้ในการประมาณอายุคราบโลหิตได้

โลหิตของร่างกายมีเพียง 8 % จากน้ำหนักทั้งหมดของร่างกาย โดยมีปริมาณโลหิตเฉลี่ยในเพศหญิง 5 L โลหิตปริมาณเฉลี่ยในเพศชาย 5.5 L โลหิตเป็นตัวกลางในการขนส่งสารละลาย หรือสารแขวนลอย ขนส่งจากหัวใจสู่เนื้อเยื่อและเซลล์ของร่างกายทั้งหมด ในโลหิตมีเม็ดโลหิตแดงหรือ (Erythrocyte) มีคุณสมบัติหลักคือการขนส่ง  $O_2$  ในโลหิต ในเม็ดโลหิตแดงจะถูกอัดแน่นไปด้วยฮีโมโกลบิน ซึ่งเป็นโมเลกุลที่มีธาตุเหล็กที่สามารถปล่อยและจับกับ  $O_2$  อิสระได้ ฮีโมโกลบินจึงเป็นสิ่งจำเป็นในการขนส่ง  $O_2$  ฮีโมโกลบินประกอบด้วยสายโพลีเปปไทด์ที่ม้วนพับกันจำนวน 4 สาย (The

globin portion ) และเหล็ก 4 ตัวที่ถูกบรรจุอยู่กลุ่มของฮีม (Protoporphyrin molecule) แต่ละพันธะจะถูกเชื่อมด้วยโพลีเปปไทด์ เหล็กทั้ง 4 อะตอมสามารถจับและรวมกับ 1 โมเลกุลของ  $O_2$  ได้ ดังนั้น ฮีโมโกลบินแต่ละโมเลกุลจะสามารถบรรจุ  $O_2$  ได้ 4 โมเลกุล  $O_2$  จะถูกจับอย่างหลวมๆ กับ 1 ใน 6 ของพันธะโคออดิเนชันของอะตอมของเหล็ก สีของฮีโมโกลบินที่พบในธรรมชาติมีเม็ดสี เนื่องจากมีธาตุเหล็กบรรจุอยู่ และจะปรากฏสีแดงเมื่อรวมกับ  $O_2$  เม็ดโลหิตแดงมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ  $8 \mu m$  ยังมีฮีโมโกลบินนับล้านโมเลกุลที่อยู่ในเม็ดโลหิตแดง 1 เซลล์ (สุวรรณ ธีระวีรพันธ์ :2539)

เมื่อโลหิตออกนอกร่างกายและเวลาผ่านไปโลหิตมีอายุมากขึ้นโลหิตจะเกิดการ เปลี่ยนสีจากสีแดงเป็นสีน้ำตาล เนื่องจากฮีโมโกลบินถูกออกซิไดซ์ระหว่างการสลายตัว เกิดการออกซิเดชันจาก  $Fe^{2+}$  เป็น  $Fe^{3+}$  และสร้างเมทฮีโมโกลบิน เมื่อเกิดการออกซิไดซ์ทำให้เหล็กฮีโมโกลบิน ขาดอิเล็กตรอนที่จะจับกับ  $O_2$  ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

สำหรับการประมาณอายุคราบโลหิตนั้นยังคงเป็นปัญหาสำคัญในงานด้านนิติวิทยาศาสตร์ วิธีการต่างๆทางวิทยาศาสตร์ถูกนำมาใช้เช่น วิธีการวัดค่าอิเล็กตรอนสปินเรโซแนนซ์สามารถ ตรวจสอบอายุคราบโลหิตซึ่งขึ้นกับความเข้มของสัญญาณของเมทฮีโมโกลบิน (Stacey et al:2005) หรือแม้แต่การใช้โครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงเพื่อหาปริมาณองค์ประกอบของสายโซ่โกลบินของฮีโมโกลบินของเม็ดโลหิตแดง โดยพบการลดลงของอัตราส่วนระหว่างสายโซ่อัลฟา กับฮีม เมื่อคราบโลหิตมีอายุมากขึ้น (กฤษณะ พวงระย้า:2552) และวิธีการประมาณอายุโลหิตโดย Atomic Force Microscopy (AFM) เป็นการถ่ายภาพเม็ดโลหิตแดงที่มีความละเอียดระดับ nanometer เพื่อหาค่าความยืดหยุ่น (Elasticity pattern) ของเซลล์เม็ดโลหิตแดง ที่ลดลงเมื่ออายุโลหิต เพิ่มมากขึ้น (Strasser et al:2007) แต่วิธีการดังกล่าวข้างต้นยังมีข้อจำกัดในเรื่องความละเอียด มีความผิดพลาดสูง ค่าใช้จ่ายสูง ใช้เวลานานและเป็นวิธีการที่ทำให้ตัวอย่างเสียหาย และเป็นการทำให้วัตถุพยานเสื่อมคุณค่า

การใช้แสงอินฟราเรดซึ่งเป็นคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้า (Electromagnetic Radiation) ที่แบ่งตามความยาวคลื่นในช่วงต่างๆ เช่น แสงอินฟราเรดช่วงกลาง (MIR) ที่เหมาะสำหรับศึกษาคุณภาพวิเคราะห์และการศึกษาโครงสร้างโมเลกุลที่มีความซับซ้อนที่ให้ลักษณะที่มีความจำเพาะเจาะจงแบบ (Fingerprint) และแสงอินฟราเรดช่วงใกล้ Near Infrared Region (NIR) เป็นการวัดเชิงปริมาณวิเคราะห์สามารถวัดค่าความเข้มข้นสารเคมีที่มีองค์ประกอบของหมู่ฟังก์ชัน N-H, O-H เป็นต้น มีการนำ FTIR มาประยุกต์ใช้ในงานด้านนิติวิทยาศาสตร์สำหรับการประมาณอายุคราบโลหิต โดยใช้เครื่องมือสเปกโตรสโกปีอินฟราเรดช่วงใกล้ (Near infrared spectroscopy ) เพื่อศึกษาหาปริมาณพื้นที่ได้ฟิคของน้ำ ( $H_2O$ ) ที่ความยาวคลื่น  $1400 \text{ nm}$  และที่ความยาวคลื่น  $1900 \text{ nm}$  ในคราบโลหิตโดยพบการลดลงของปริมาณพื้นที่ได้ฟิคของน้ำ ( $H_2O$ ) เมื่อคราบโลหิตมีอายุมากขึ้นตามระยะเวลา และในขณะเดียวกันพบฟิคของเมทฮีโมโกลบิน (Methemoglobin) ที่มีพื้นที่ได้ฟิคช่วงความยาวคลื่น  $1480-1860 \text{ nm}$  เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาเมื่อคราบโลหิตมีอายุมากขึ้น (Edita et al: 2009) อย่างไรก็ตาม งานวิจัยของเขามีวัตถุประสงค์เพื่อใช้ข้อมูลที่ได้พัฒนาเครื่องมือตรวจอายุโลหิตด้วยแสงอินฟราเรดชนิดพกพาเท่านั้น และสำหรับประเทศไทยยังไม่ได้มีการวิจัยการประมาณอายุคราบโลหิต

ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้นำเทคนิค Fourier Transform Infrared Spectroscopy ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบในคราบโลหิตในแต่ละช่วงเวลาต่างกันเพื่อหาความสัมพันธ์เพื่อใช้สำหรับการประมาณอายุคราบโลหิต ในการศึกษาครั้งนี้ได้ใช้เทคนิค FTIR เตรียมตัวอย่างโดยวิธี KBr disc ทำการทดลองโดยนำโลหิตของมนุษย์มาหยดลงบนกระจกสไลด์แล้วปล่อยให้ที่อุณหภูมิห้องที่ระยะเวลาต่างกัน เป็นระยะเวลา 4 วัน จากนั้นสร้างกราฟมาตรฐานเพื่อใช้ประมาณอายุของคราบโลหิตจากอาสาสมัครต่อไป

### วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาวิธีการประมาณอายุของคราบโลหิตโดยศึกษาการเปลี่ยนแปลงโปรตีนในคราบโลหิตในระยะเวลาต่างๆ กันหลังการหลั่งโลหิตด้วยเทคนิค Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR)

### อุปกรณ์และสารเคมี

Potassium Bromide (KBr) เกรด FTIR ของบริษัท Sigma-Aldrich ตัวอย่างคราบโลหิตจากอาสาสมัครจำนวน 13 ตัวอย่าง เครื่อง FTIR รุ่น Spectrum 100 FTIR system ของบริษัท Perkin Elmer ในการวิเคราะห์ที่ใช้ Resolution  $4\text{ cm}^{-1}$  จำนวนสแกน 256 รอบ/ครั้ง

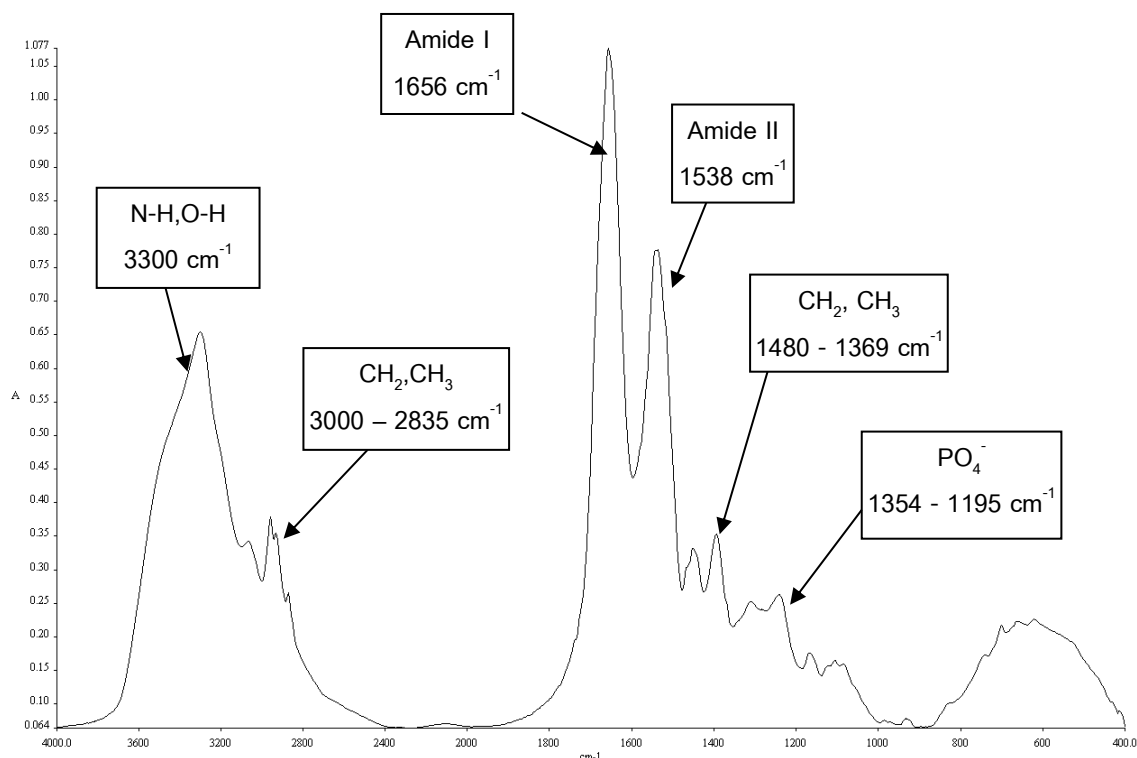
### วิธีการดำเนินการวิจัย

นำตัวอย่างโลหิตมาหยดบนกระจกสไลด์จำนวน 10 แผ่น ปล่อยให้ที่อุณหภูมิห้องที่ระยะเวลาต่างๆ นำตัวอย่างคราบโลหิตที่ขูดมาจากกระจกสไลด์นำมาชั่งน้ำหนักผสมกับ KBr ในอัตราส่วน 1 : 99 โดยน้ำหนัก ที่ระยะเวลาต่างกัน นำมาเตรียมโดยวิธี KBr disc ทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง FTIR ที่ช่วงเลขคลื่น  $4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$  โดยทำการวิเคราะห์ชั่วโมงที่ 2,4,6,12,24,36,48,60,72,84 ผู้วิจัยวัดพื้นที่ใต้พีคที่ช่วงเลขคลื่น  $3700\text{--}3000\text{ cm}^{-1}$  ( $A_{3300}$ ) จากนั้นได้คำนวณเป็นอัตราส่วนของพื้นที่ที่วัดได้นี้กับพื้นที่ของพีคที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงเมื่อเวลาผ่านไป ในช่วงเลขคลื่น  $770\text{--}730\text{ cm}^{-1}$  ( $A_{744}$ ) เมื่อนำอัตราส่วนของพื้นที่ที่พีค ( $A_{3300}/A_{744}$ ) มาพล็อตเป็นกราฟเทียบกับอายุของคราบโลหิตเพื่อใช้เป็นกราฟมาตรฐานในการคำนวณอายุของตัวอย่างคราบโลหิต

นำตัวอย่างคราบโลหิต 13 ตัวอย่างหยดลงบนแผ่นสไลด์ และปล่อยให้แห้งที่อุณหภูมิ ห้องที่ระยะเวลาต่างๆ กัน นำตัวอย่างคราบโลหิตตัวอย่างมาเตรียมตัวอย่างด้วยวิธี KBr disc นำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค FTIR และหาอัตราส่วนของพื้นที่ใต้พีค ( $A_{3300}/A_{744}$ ) เพื่อนำไปเทียบกับกราฟมาตรฐานที่ได้เพื่อคำนวณหาอายุของตัวอย่างคราบโลหิตต่อไป

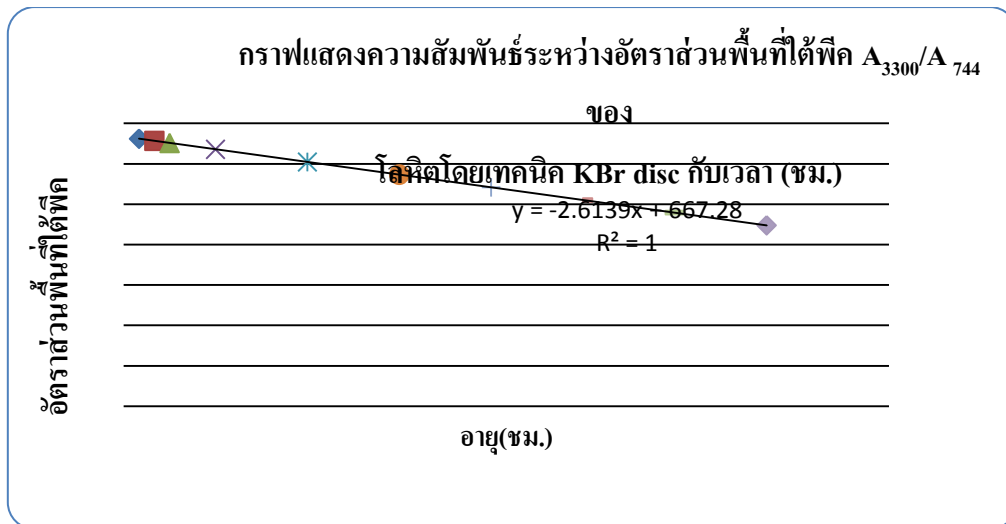
## ผลการทดลอง

การศึกษาการตรวจประมาณอายุของคราบโลหิตของมนุษย์ ที่นำมาเตรียมตัวอย่างด้วยวิธี KBr disc มาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) ในช่วงเลขคลื่น 4000-400  $\text{cm}^{-1}$  พบพิกที่เหมาะสมในการทำปริมาณวิเคราะห์ ได้สเปกตรัม ดังภาพที่ 1



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

จากสเปกตรัมของคราบโลหิตพบพิกลักษณะกว้างมีเลขคลื่นประมาณ 3700-2400  $\text{cm}^{-1}$  ซึ่งคาดว่าเกิดจากการซ้อนทับกันของพิกที่เกิดจาก N-H stretching ที่เลขคลื่น 3300  $\text{cm}^{-1}$ , พิกของ O-H stretching ที่เลขคลื่นในช่วง 2500 – 3300  $\text{cm}^{-1}$  และพิกของ C-H stretching ที่ช่วงเลขคลื่น 2835 – 3000  $\text{cm}^{-1}$ , พิก Amide I ที่เกิดจาก C=O stretching ที่เลขคลื่น 1656  $\text{cm}^{-1}$ , พิก Amide II ที่เกิดจาก N-H bending ที่เลขคลื่น 1538  $\text{cm}^{-1}$ , พิกที่ช่วงเลขคลื่น 1480 – 1369  $\text{cm}^{-1}$  เกิดจาก C-H bending ของหมู่ Methyl( $\text{CH}_3$ ) ของกรดไขมัน และพบพิกที่ช่วงเลขคลื่น 1354 – 1195  $\text{cm}^{-1}$  เกิดจาก  $\text{PO}_4^-$  stretching ของกรดนิวคลีอิก จากการทดลองเมื่อนำอัตราส่วนระหว่างพื้นที่ใต้พิกที่ช่วงเลขคลื่น 3700 – 3000  $\text{cm}^{-1}$  กับพิกที่ช่วงเลขคลื่น 770 – 730  $\text{cm}^{-1}$  ซึ่งเป็นพิกที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงเมื่อระยะเวลาผ่านไป มาพล็อตกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนของพื้นที่ใต้พิกกับอายุของคราบโลหิต พบว่าอัตราส่วนพื้นที่ใต้พิกของ ( $A_{3300}/A_{744}$ ) มีการลดลงเป็นเส้นตรงอย่างมีนัยสำคัญ ได้สมการเส้นตรง  $y = -2.613x + 667.2$  มีค่าสหสัมพันธ์เท่ากับ 1 โดยมีค่าเบี่ยงเบนสัมพัทธ์อยู่ในช่วง 1.25-5.92% ดังภาพที่ 2



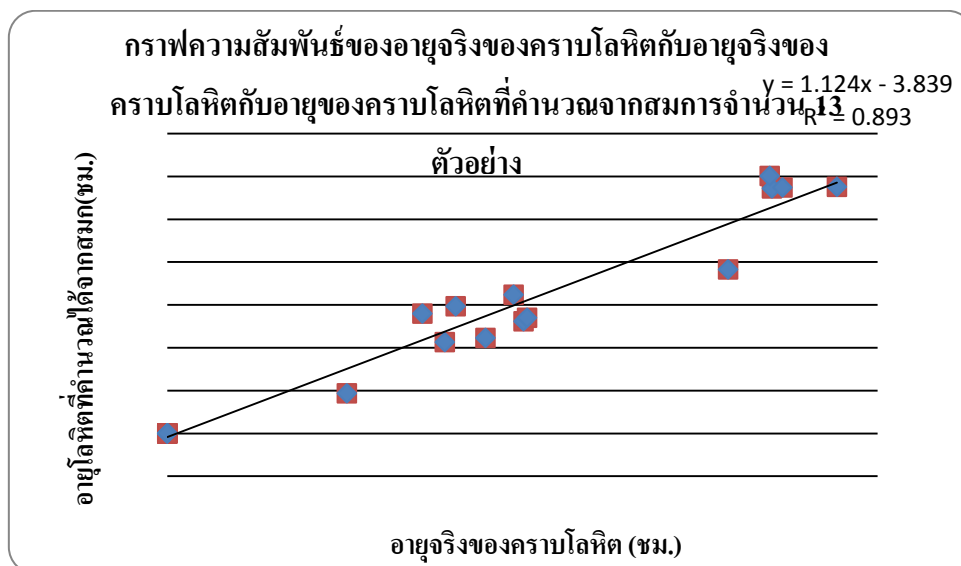
ภาพที่ 2 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนพื้นที่ได้ฟิค  $A_{3300}/A_{744}$  ของอายุของคราบโลหิต กับเวลา

จากความสัมพันธ์ที่ได้จากกราฟ สามารถนำมาประมาณอายุของคราบโลหิตได้โดยการ นำ ตัวอย่างคราบโลหิตจากแหล่งต่างๆ ที่มีเพศ อายุ และระยะเวลาที่แตกต่างกัน มาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค FTIR และนำอัตราส่วนพื้นที่ได้ฟิค  $A_{3300}/A_{744}$  ของตัวอย่างมาใช้ในการคำนวณอายุจากกราฟมาตรฐานที่ได้ ได้ผลแสดงดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงอายุของคราบโลหิตอัตราส่วนระหว่างพื้นที่ได้ฟิคในช่วงเลขคลื่น  $3700 - 3000 \text{ cm}^{-1}$  ( $A_{3300}$ ) กับพื้นที่ได้ฟิคของฟิคที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงเมื่อระยะเวลาผ่านไปในช่วงเลขคลื่น  $770 - 730 \text{ cm}^{-1}$  ( $A_{744}$ ) ของตัวอย่างคราบโลหิตจำนวน 13 ตัวอย่าง

ตัวอย่างที่	อัตราส่วนพื้นที่ได้ฟิค $A_{3300}/A_{744}$ ของตัวอย่าง	เวลาจริง (ชั่วโมง)	เวลาที่คำนวณจากสมการ $y = -2.613x + 667.2$
1	608.98	26.89	22.2
2	567.21	47.38	38.26
3	516.91	56.58	57.51
4	517.87	51.08	57.14
5	517.17	51.99	57.41
6	510.30	50.89	60.05
7	642.79	15.18	9.34
8	594.13	21.55	27.96
9	611.69	23.45	21.24
10	589.76	24.37	29.63
11	582.76	29.28	32.31
12	598.93	30.10	26.13
13	596.75	30.40	26.96

จากตารางแสดงอายุของคราบโลहितที่คำนวณได้จากสมการเส้นตรง และอายุจริงของคราบโลहितจากตัวอย่างจำนวน 13 ตัวอย่าง เมื่อนำมาพล็อตกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอายุของคราบโลहितจริงกับอายุของคราบโลहितที่คำนวณได้จากสมการได้กราฟดังภาพที่ 3



ภาพที่ 3 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอายุจริงของคราบโลहितกับอายุของคราบโลहितที่คำนวณจากสมการจำนวน 13 ตัวอย่าง

จากภาพที่ 3 แสดงให้เห็นว่าเมื่อนำอายุของคราบโลहितที่ได้จากการประมาณอายุจากสมการมาพล็อตกับอายุจริงของคราบโลहितจะได้รับความสัมพันธ์เป็นเส้นตรง ได้ค่าสหสัมพันธ์มีค่า  $R^2 = 0.893$

### สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาการตรวจประมาณหาอายุของคราบโลहितมนุษย์ ที่เตรียมตัวอย่างด้วยวิธี KBr disc และนำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) ในช่วงเลขคลื่น  $4000-400 \text{ cm}^{-1}$  จากสเปกตรัมพบที่เกิดจาก N-H stretching ที่เลขคลื่น  $3300 \text{ cm}^{-1}$  ซึ่งพิกที่ เกิดขึ้นมีลักษณะกว้าง เนื่องจากเกิดการซ้อนทับกันกับพิกของ O-H stretching ที่เลขคลื่นช่วง  $2500 - 3300 \text{ cm}^{-1}$  และซ้อนทับกับพิกของ C-H stretching ที่ช่วงเลขคลื่นช่วง  $3000 - 2835 \text{ cm}^{-1}$  พบพิก Amide I ที่เกิดจาก C=O stretching ของพันธะเปปไทด์ที่เลขคลื่น  $1656 \text{ cm}^{-1}$  พิก Amide II ที่เกิดจาก N-H bending ที่เลขคลื่น  $1538 \text{ cm}^{-1}$  พิกที่ช่วงเลขคลื่น  $1480 - 1369 \text{ cm}^{-1}$  เกิดจาก C-H bending ของหมู่ Methyl(CH<sub>3</sub>) ของกรดไขมัน และพบพิกที่ช่วงเลขคลื่น  $1354 - 1195 \text{ cm}^{-1}$  เกิดจาก PO<sub>4</sub><sup>-</sup> stretching ของกรดนิวคลีอิก

เมื่อนำพื้นที่ใต้พิกของสเปกตรัมของคราบโลहितเมื่อระยะเวลาผ่านไป มาประมาณอายุของคราบโลहितโดยการพล็อตจากอัตราส่วนพื้นที่ใต้พิก  $3700 - 3000 \text{ cm}^{-1}$  (A<sub>3300</sub>) กับพิกที่ช่วงเลขคลื่น  $770 - 730 \text{ cm}^{-1}$  (A<sub>744</sub>) ซึ่งเป็นพิกที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงเมื่อระยะเวลาผ่านไปกับเวลา พบว่าอัตราส่วน

พื้นที่ใต้พีคของ  $A_{3300}/A_{744}$  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

### อภิปรายผล

การตรวจหาอายุของคราบโลหิตจะช่วยเชื่อมโยงถึงระยะเวลาการเกิดคราบโลหิต ถูกนำมาใช้เป็นวัตถุพยาน เวลาที่อาชญากรรมเกิดขึ้นได้ ซึ่งหากมีเหตุอาชญากรรมเกิดขึ้น แล้วพบวัตถุพยานที่เป็นคราบโลหิต จำเป็นต้องใช้เทคนิคหรือวิธีการทางเคมีที่เหมาะสม ซึ่งเทคนิค FTIR นั้นสามารถใช้ในการประมาณเวลาในการเกิดเหตุอาชญากรรมได้ใกล้เคียงความเป็นจริง อีกทั้งเป็นเทคนิคที่ไม่ทำลายตัวอย่าง ใช้ตัวอย่างน้อย และช่วยให้วัตถุพยานไม่เสื่อมคุณค่า หากใช้เทคนิค FTIR นี้ร่วมกับผลการประมาณอายุทางด้านนิติเวช จะทำให้การประมาณอายุคราบโลหิตมีความน่าเชื่อถือมากยิ่งขึ้น ซึ่งเป็นประโยชน์อย่างยิ่งที่ช่วยในการพิจารณาคดีทางกระบวนการยุติธรรม

### ข้อเสนอแนะ

ในการศึกษาครั้งนี้เป็นการทดสอบขั้นต้นเพื่อศึกษาวิธีการตรวจหาอายุคราบโลหิตด้วยเทคนิค Fourier Transform Infrared Spectroscopy สำหรับผู้ที่สนใจและต้องการที่จะศึกษาเพิ่มเติมเพื่อใช้ในงานด้านนิติวิทยาศาสตร์มีดังนี้

1. ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนในคราบโลหิตในช่วงเวลาที่เพิ่มมากขึ้น
2. ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของคราบโลหิตบนพื้นผิวที่แตกต่างกันเช่น กระดาษ พื้นซีเมนต์ เสื้อผ้า เป็นต้น
3. ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของคราบโลหิตที่อุณหภูมิและความชื้นและความร้อนต่างๆกัน
4. อาจนำเทคนิค UV - visible ในช่วงความยาวคลื่น 400 - 800 nm มาประยุกต์ใช้ในการวัดความเข้มสีของคราบโลหิตเพื่อใช้ในการประมาณอายุร่วมกับเทคนิค FTIR

### เอกสารอ้างอิง

#### ภาษาไทย

กฤษณะ พวงระย้า. การประมาณคราบอายุเลือด. นครปฐม:มหาวิทยาลัยศิลปากร, 2552.

สุวรรณ ธีระวีรพันธ์, วิสสุดา สิวทยาวัฒน์และเพ็ญโฉม พงวิธา. สรีรวิทยาระบบไหลเวียนโลหิต. คณะ

เภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล. กรุงเทพฯ: ไทยมิตรการพิมพ์, 2539.



**ภาษาต่างประเทศ**

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

Hiroyuki 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.

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.