

การตรวจวัดโปรตีนในตัวอย่างคราบเลือดมนุษย์ที่ติดบนพื้นผิวชนิดต่างๆ
ด้วยเทคนิค FTIR เพื่อประเมินระยะเวลาหลังเกิดเหตุ

INVESTIGATION OF PROTEIN IN HUMAN BLOODSTAIN SAMPLE
ON VARIOUS SURFACE TYPES USING FTIR TECHNIQUE
TO ASSESS THE POST-INCIDENT TIME

ปาไลตา มิ่งแก้ว และ ปริญญญา สีลานันท์*

Palita Mingkaew, and Parinya Seelanan*

คณะนิติวิทยาศาสตร์ โรงเรียนนายร้อยตำรวจ

Faculty of Forensic Science, Royal Police Cadet Academy

*corresponding author e-mail: parinya.se@rpca.ac.th

(Received: 29 February 2024; Revised: 18 July 2024; Accepted: 19 July 2024)

บทคัดย่อ

การประมาณระยะเวลาหลังเกิดเหตุในทางนิติวิทยาศาสตร์สามารถวิเคราะห์จากสภาพแวดล้อมร่วมกับวัตถุพยานที่มีการเปลี่ยนแปลงตามเวลา วัตถุพยานทางชีววิทยาเป็นสิ่งที่พบได้ในสถานที่เกิดเหตุ งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการตรวจวัดโปรตีนในตัวอย่างคราบเลือดมนุษย์ที่ติดบนพื้นผิวชนิดต่างๆ เพื่อประเมินระยะเวลาหลังเกิดเหตุโดยใช้เทคนิคฟูเรียร์ทรานส์ฟอร์มอินฟราเรดสเปกโตรสโกปี (FTIR) เป็นการวิจัยเชิงทดลองโดยวิเคราะห์ตัวอย่างเลือดของอาสาสมัครที่ปราศจากสารป้องกันการแข็งตัวมาหยดบนพื้นผิววัตถุ ได้แก่ ผ้าฝ้าย ไม้อัด และถุงพลาสติกดำ จากนั้นตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงโปรตีนจากพื้นผิวโดยตรงที่ระยะเวลา 0 2 4 6 9 12 24 48 72 และ 96 ชั่วโมง หลังจากการหยดเลือดลงไป ผลการวิจัย พบว่า หมู่เอไมด์ที่ตรวจวัดได้จะแสดงถึงโปรตีนในคราบเลือด พบแนวโน้มการลดลงของโปรตีนอย่างเห็นได้ชัดเมื่อเวลาผ่านไป โดยโปรตีนมีแนวโน้มลดลงที่สอดคล้องกันในทุกพื้นผิว ยกเว้นผ้าฝ้าย เนื่องจากลักษณะรูพรุนของผ้ามีผลต่อความหนาแน่นของปริมาณโปรตีนต่อพื้นที่ผิว จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณโปรตีนกับระยะเวลา พบว่า ในช่วง 0–2 ชั่วโมง ปริมาณโปรตีนแปรผกผันกับเวลาอย่างชัดเจน เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างระดับทุติยภูมิของโปรตีน หลังจาก 9 ชั่วโมงพบการเปลี่ยนแปลงของปริมาณโปรตีนที่คงที่ ดังนั้นการตรวจวัดโปรตีนในคราบเลือดตามช่วงเวลาทดสอบนี้ สามารถใช้เป็นแนวทางในการประเมินระยะเวลาหลังเกิดเหตุจากคราบเลือด

ที่ตรวจพบในสถานที่เกิดเหตุได้ มีข้อดีในการตรวจวัดจากพื้นผิวโดยตรงและไม่ทำลายตัวอย่างเลือดบนพื้นผิว

คำสำคัญ: ระยะเวลาหลังเกิดเหตุ คราบเลือด โปรตีน พื้นผิว

Abstract

Estimation of the time after an incident in forensic science can be done by analysis of biological evidence at the crime scene that change over time. Biological evidence can be found in the crime scene. This research aims to study the age of blood stains from changes of protein within the blood using the Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) in human bloodstains on various types of surfaces. The experimental research was carried out by using blood samples from volunteers without anticoagulants. The blood was dropped on different surfaces, cotton, plywood, and black plastic bags. Protein changes were then monitored directly from the sample surface at 0, 2, 4, 6, 9, 12, 24, 48, 72, and 96 hours after blood dropping down. It was found that the amide peaks represented as observed protein in bloodstain were detected. The amount of protein showed a significant downward trend over times. Consistent trends of protein decrease were observed among tested surfaces, except on the cotton. This is because the porosity of the fabric affects the protein content density per surface area. The linear relationship between protein versus times was found to be inverse variation during 0–2 hours. This is due to changes in the secondary structure of the protein. After 9 hours, the protein changes were found to be stabilized in all tested surfaces. Hence, the measured protein from real bloodstain under the observed time frame can be used to estimate the age of bloodstain at the crime scene. Advantages of this technique include direct measurement from the surface and non-destructive method.

Keywords: Post-incident time, Bloodstain, Protein, Surface

บทนำ

เหตุการณ์อาชญากรรม โดยเฉพาะเหตุที่มีผู้เสียชีวิตในสถานที่เกิดเหตุเจ้าหน้าที่จะต้องปฏิบัติงานด้วยความรอบคอบถูกต้องและมีความรวดเร็ว ร่องรอยหลักฐานหรือวัตถุพยานต่างๆ ไม่ว่าจะเป็นเส้นผม เส้นขน รอยนิ้วมือ เส้นใยผ้า อสุจิ รวมถึงคราบเลือด วัตถุพยานเหล่านี้สามารถใช้เป็นพยานหลักฐานเพื่อนำไปสู่การจับกุมคนร้ายได้ (Thongpagde & Saksiri, 2022)

คราบเลือดเป็นวัตถุพยานสำคัญชิ้นหนึ่งในสถานที่เกิดเหตุสามารถนำไปพิสูจน์เอกลักษณ์บุคคลได้ โดยการตรวจยืนยัน DNA (Panta et al., 2022) ใช้ประกอบการสืบสวน พุทธิกรรมกรก่อเหตุ หรือมีการเสียชีวิตด้วยลักษณะใด อาวุธที่ใช้ก่อเหตุเป็นอาวุธประเภทไหน โดยอาจสังเกตจาก ลักษณะคราบเลือด ทิศทางการหยดของเลือด การกระเซ็นของเลือด เป็นต้น สิ่งเหล่านี้สามารถที่จะระบุตัวผู้ที่เกี่ยวข้องและตัวผู้กระทำผิดได้ การประมาณเวลาที่เกิดเหตุสามารถคาดเดาได้ยาก ต้องอาศัยผู้ที่เห็นเหตุการณ์ หรืออาศัยสภาพแวดล้อมโดยรอบในการคาดคะเนเวลาที่เกิด แต่วิธีเหล่านี้ยังมีความคลาดเคลื่อน เนื่องจากผู้ที่เห็นเหตุการณ์อาจให้ข้อมูลได้ไม่เที่ยงตรงหรือการตีความของแต่ละบุคคลที่แตกต่างกัน ทำให้การคาดคะเนเวลาบิดเบือน ฉะนั้นการใช้คราบเลือดที่มักพบในสถานที่เกิดเหตุมาตรวจสอบด้วยเทคนิค และเครื่องมือทางวิทยาศาสตร์ (จิณห์นิภา และศิริรัตน์, 2566) เพื่อประมาณระยะเวลาในการเกิดเหตุอีกทางเลือกหนึ่ง และสนับสนุนให้เกิดความเที่ยงตรง แม่นยำ และมีความน่าเชื่อถือมากยิ่งขึ้น

เลือดมนุษย์แบ่งเป็นส่วนประกอบหลักคือส่วนเซลล์เม็ดเลือด ประกอบด้วยเม็ดเลือดแดง เม็ดเลือดขาว และเกล็ดเลือด ส่วนของเหลวเรียกว่า พลาสมา ซึ่งประกอบไปด้วย น้ำ 97% โปรตีน 7% และอื่นๆ 1% โดยโปรตีนที่สำคัญภายในเลือด ได้แก่ Albumin 58% Globulins 37% Fibrinogens 4% และ Regulatory protein 1% (Schaller et al., 2008) มีรายงานการประมาณอายุของคราบเลือด เช่น ศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย (พรวิณัส, 2553) โดยวิธี UV-Visible spectrometer (ปาเลวี และชิตติ, 2561) และเทคนิค HPLC (กฤษณะ, 2561) แต่มีค่าใช้จ่ายสูง อีกทั้งตัวอย่างเลือดอาจปนเปื้อน หรือเสื่อมสภาพหลังการตรวจวิเคราะห์ มีรายงานว่า เทคนิคฟูเรียร์ทรานส์ฟอร์มอินฟราเรดสเปกโตรสโคปี (FTIR) เป็นวิธีที่มีความละเอียดสูง สามารถวิเคราะห์ได้อย่างรวดเร็วโดยการตรวจวัดที่ความถี่ต่างๆ อย่างต่อเนื่องและไม่ทำลายตัวอย่าง (Chonant, Jearanaikoon & Tippayawat, 2017) ทำให้สามารถรักษาคุณค่าของวัตถุพยานเอาไว้ได้

ดังนั้นงานวิจัยนี้สนใจการศึกษาคราบเลือดบนพื้นผิวชนิดต่างๆ ที่ระยะเวลาแตกต่างกัน จากการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนภายในเลือดโดยเทคนิค FTIR เพื่อประเมินเวลาหลังเกิดเหตุ เป็นประโยชน์ในการสืบสวนทางนิติวิทยาศาสตร์กรณีพบวัตถุพยานทางชีวภาพที่สามารถศึกษาการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบภายในและใช้เป็นข้อเท็จจริงในการพิจารณาคดีที่เกี่ยวข้อง

วิธีดำเนินการวิจัย

1. ประชากรและกลุ่มตัวอย่าง

ใช้ตัวอย่างเลือดจากอาสาสมัคร 1 ราย สุขภาพแข็งแรง ไม่มีโรคประจำตัวทางเลือดและไม่ได้รับยาที่เกี่ยวข้องกับโรคเลือดในช่วงเวลาที่ทดลอง ทำการเจาะเลือดโดยพยาบาลวิชาชีพ

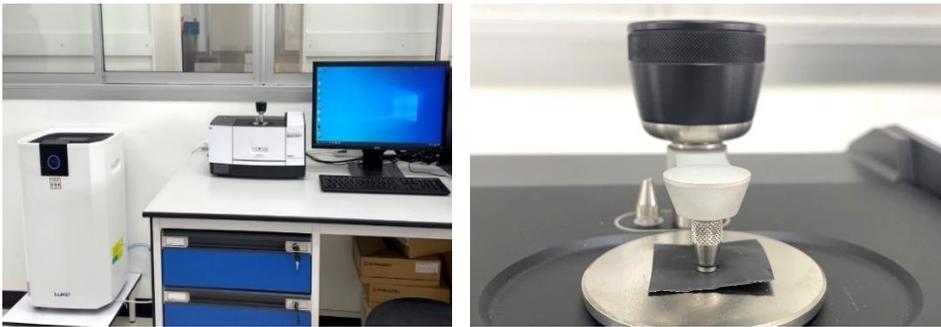
ประจำกองแพทย์ โรงเรียนนายร้อยตำรวจ ได้รับการรับรองจาก คณะกรรมการจริยธรรมการวิจัย
ในมนุษย์ คณะนิติวิทยาศาสตร์ โรงเรียนนายร้อยตำรวจ เอกสารการรับรองเลขที่ 641125-002

2. การเก็บรวบรวมข้อมูล

นำตัวอย่างเลือดปริมาตร 0.50 มิลลิลิตร ที่ไม่ใส่สารป้องกันการแข็งตัวของเลือด
มาหยดลงบนวัตถุต่างๆ ที่เตรียมไว้ คือ ผ้าฝ้าย แผ่นไม้อัด และถุงพลาสติกดำ ซึ่งมีขนาด กว้างยาว
ประมาณ 3x3 เซนติเมตร เก็บรักษาไว้ในอุณหภูมิห้องที่ระยะเวลาต่างๆ คือ 0 2 4 6 9 12 24 48
72 และ 96 ชั่วโมง แล้วนำมาวิเคราะห์ด้วยเครื่อง FTIR ที่ช่วงเลขคลื่น 400–4000 cm^{-1} ทำการทดลอง
ซ้ำ จำนวน 4 ครั้ง โดยการควบคุม วิเคราะห์และแสดงผลจากโปรแกรม Lab Solution IR ที่ติดตั้ง
มากับเครื่องมือ

3. เครื่องมือการวิจัย

วิเคราะห์ตัวอย่างคราบเลือดมนุษย์ที่เตรียมบนพื้นผิวชนิดต่างๆ โดยนำชิ้นตัวอย่างไป
วิเคราะห์โดยตรงด้วยเครื่อง FTIR (รุ่น IRSprit+QATR-S system, Shimadzu) ดังภาพที่ 1



ภาพที่ 1 เครื่อง FTIR (ซ้าย) และวิธีการวิเคราะห์สารตัวอย่างด้วย Diamond prob (ขวา)

4. การวิเคราะห์ข้อมูล

ศึกษาลักษณะสเปกตรัมที่ได้ (IR-Spectrum) บนพื้นผิววัตถุที่ระยะเวลาแตกต่างกัน
โดยวิธี Attenuated Total Reflectance-Fourier Transform Infrared Spectroscopy; ATR-FTIR ที่
ช่วงเลขคลื่น 400–4000 cm^{-1} จำนวนสแกน 20 รอบ/ครั้ง และ resolution 4 cm^{-1} โดยโปรแกรม
Lab Solution IR บันทึกและทำการวิเคราะห์ผลจากรูปแบบและพื้นที่ใต้พีคที่ปรากฏ

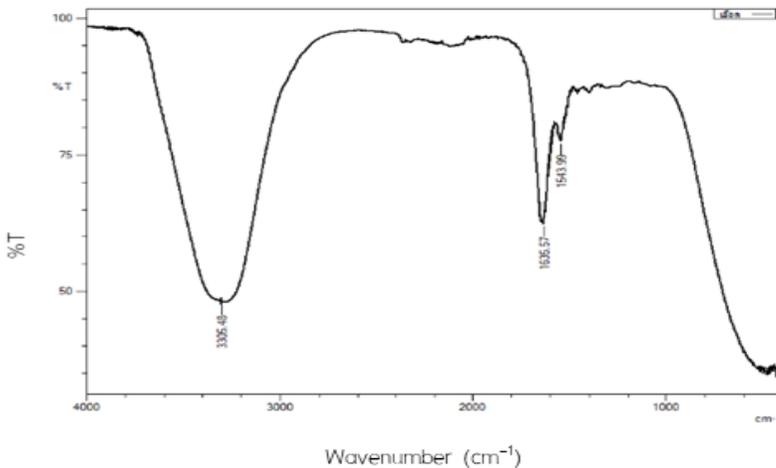
ผลการวิจัย

1. ผลการวิเคราะห์ตัวอย่างหยดเลือด

ทำการวิเคราะห์ตัวอย่างเลือดที่ได้จากอาสาสมัคร โดยการหยดเลือดลงส่วนบรรจุสารตัวอย่างของเครื่อง FTIR โดยตรง เพื่อดูรูปแบบสเปกตรัมของคราบเลือด ที่แสดงพีคของโปรตีนในเลือด ผลของการวิเคราะห์ ดังภาพที่ 2 และตารางที่ 1 โดยพบพันธะ N–H stretch C=O stretch และ N–H bending ที่ช่วงเลขคลื่น 3308.34 1644.16 และ 1542.56 cm^{-1} ตามลำดับ

ตารางที่ 1 ช่วงเลขคลื่นที่สัมพันธ์กับหมู่ฟังก์ชันที่พบในสเปกตรัมที่ได้จากการวิเคราะห์เลือดตัวอย่างของอาสาสมัครที่ไม่หยดลงบนพื้นผิวชนิดใดและทำการวิเคราะห์ทันทีหลังจากการเจาะเลือด ช่วงเลขคลื่น 400–4000 cm^{-1}

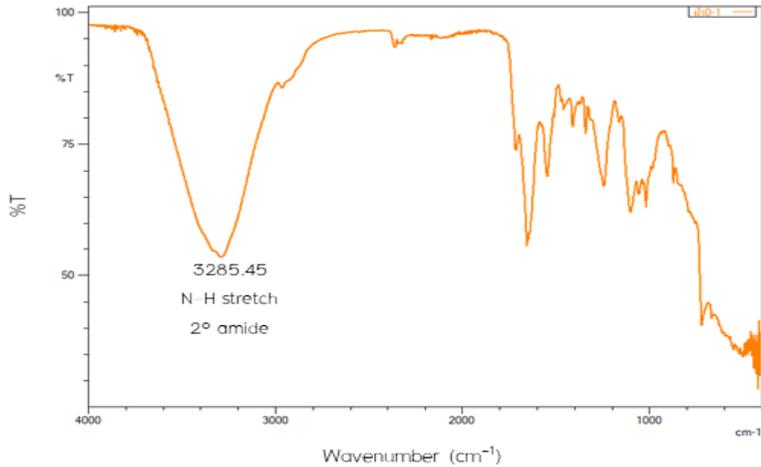
ช่วงเลขคลื่น (cm^{-1})	พันธะ	หมู่ฟังก์ชัน
3308.34	N–H stretch	2° amide
1644.16	C=O stretch	1° amide
1542.56	N–H bending	amide



ภาพที่ 2 IR สเปกตรัมจากหยดเลือดตัวอย่างของอาสาสมัครที่ไม่หยดลงบนพื้นผิวชนิดใดและวิเคราะห์ทันทีหลังจากการเจาะเลือด ช่วงเลขคลื่น 400–4000 cm^{-1}

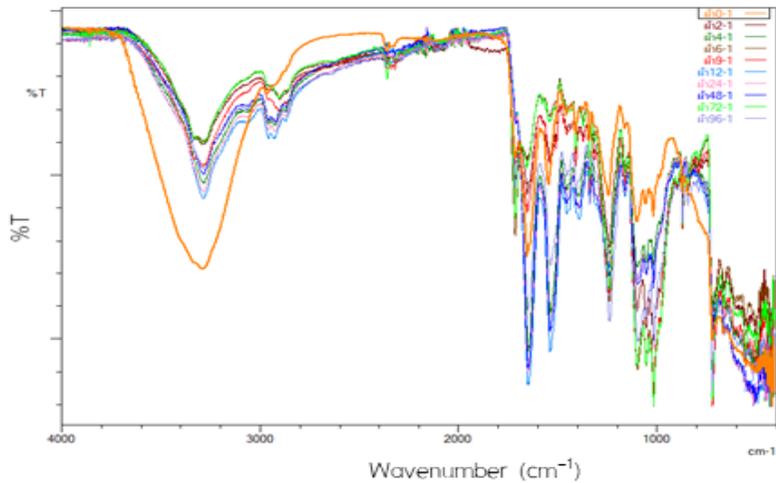
2. ผลการวิเคราะห์คราบเลือดจากตัวอย่างผ้าฝ้ายที่มีระยะเวลาต่างกัน

ทำการวิเคราะห์คราบเลือดตัวอย่างบนผ้าฝ้าย ที่ระยะเวลาหลังจากหยดเลือดทันที (0 ชั่วโมง) ด้วยเครื่อง FTIR จากการสแกนช่วงเลขคลื่น 400–4000 cm^{-1} ดังภาพที่ 3



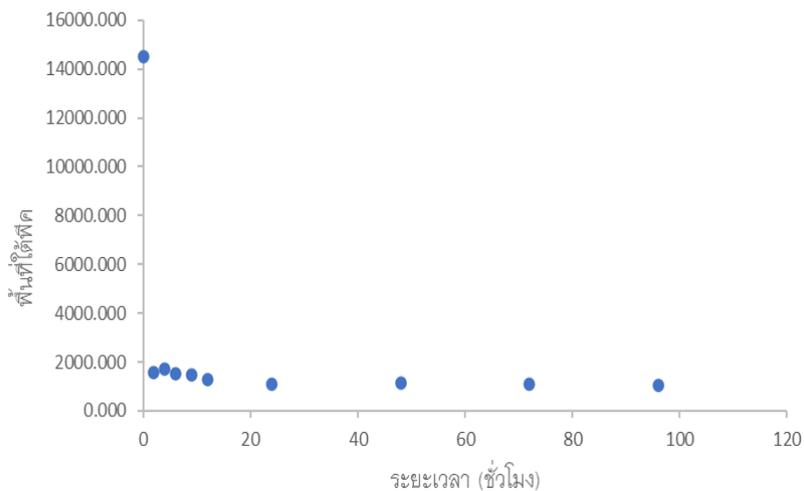
ภาพที่ 3 IR สเปกตรัมของคราบเลือดบนผ้าฝ้าย หลังจากหยุดเลือดที่เวลาทันที (0 ชั่วโมง)

ทำการวิเคราะห์คราบเลือดตัวอย่างบนผ้าฝ้ายด้วยเครื่อง FTIR ที่ช่วงเลขคลื่น 400–4000 cm^{-1} สามารถแสดงการเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ที่ระยะเวลาต่างกัน ได้แก่ 2 4 6 9 12 24 48 72 และ 96 ชั่วโมง ดังภาพที่ 4



ภาพที่ 4 สเปกตรัมของคราบเลือดบนผ้าฝ้าย จากการสแกนช่วงเลขคลื่น 400–4000 cm^{-1} ที่ระยะเวลา 0 (สีส้ม) 2 (สีเลือดหมู) 4 (สีเขียวเข้ม) 6 (สีน้ำตาล) 9 (สีแดง) 12 (สีฟ้า) 24 (สีชมพู) 48 (สีน้ำเงิน) 72 (สีเขียวอ่อน) และ 96 (สีม่วง) ชั่วโมง

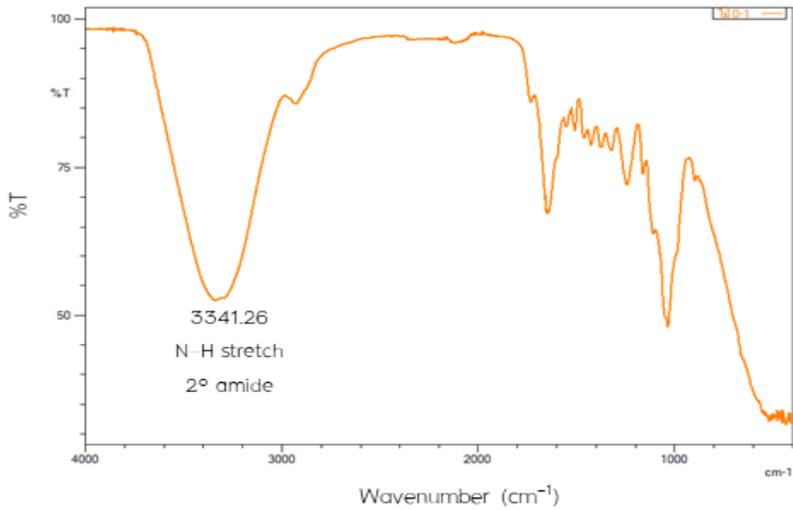
จากการนำตัวอย่างผ้าฝ้ายที่มีคราบเลือดมาวิเคราะห์ด้วยเครื่อง FTIR โดยการสแกนช่วงเลขคลื่น 400–4000 cm^{-1} ในช่วงระยะเวลาต่างๆ พบพีคของ 2° amide ของโปรตีนภายในเลือดซึ่งเกิดจาก N–H stretching ของ 2° amide ที่เลขคลื่นประมาณ 3100–3400 cm^{-1} สอดคล้องกับ สเปกตรัมที่เป็นหมู่ฟังก์ชันของสารชีวโมเลกุลประเภทโปรตีน (Chononant, Jearanaikoon & Tippayawat, 2017) ซึ่งจากการทดลองพบสัญญาณพีคสูงสุดที่เลขคลื่น 3300 มีการลดลงของพื้นที่ใต้พีคอย่างมีนัยสำคัญ โดยการทดสอบด้วยสถิติ T-test ที่ระดับทางสถิติ 0.05 ทำการทดลองซ้ำ จำนวน 4 ครั้ง พบว่า ในช่วงระยะเวลา 0–2 ชั่วโมง มีการลดลงของพื้นที่ใต้พีคของโปรตีน (A_{3300}/A_{744}) ซึ่งพิจารณาโดยนำพื้นที่ใต้พีคที่ช่วงเลขคลื่น 3700–3000 cm^{-1} (A_{3300}) มาคำนวณอัตราส่วนของพื้นที่กับพื้นที่ของพีคที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงในช่วงเลขคลื่น 770 – 730 cm^{-1} (A_{744}) และเมื่อนำอัตราส่วนของพื้นที่ที่พีค A_{3300}/A_{744} มาเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์เทียบกับระยะเวลาต่างๆ พบว่า มีการลดลงอย่างมีนัยสำคัญอย่างชัดเจนคิดเป็น 89.07% และเมื่อเวลามากกว่า 2 ชั่วโมง พื้นที่ใต้พีคมีการลดลงเล็กน้อยจนคงที่ ดังภาพที่ 5



ภาพที่ 5 พื้นที่ใต้พีคของโปรตีน (A_{3300}/A_{744}) ในคราบเลือดบนผ้าฝ้าย ที่ระยะเวลาต่างๆ

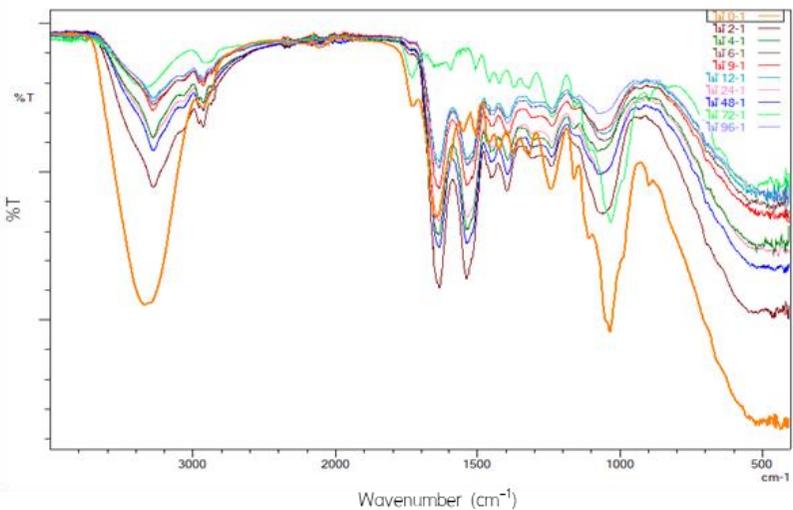
3. ผลการวิเคราะห์คราบเลือดจากตัวอย่างแผ่นไม้อัดที่มีระยะเวลาต่างกัน

วิเคราะห์คราบเลือดตัวอย่างที่หยดลงบนแผ่นไม้อัด ที่ระยะเวลาหลังจากหยดเลือดทันที (0 ชั่วโมง) โดยการวางแผ่นไม้อัดที่มีคราบเลือดติดอยู่โดยตรงด้วยเครื่อง FTIR จากการสแกนช่วงเลขคลื่น 400–4000 cm^{-1} ดังภาพที่ 6



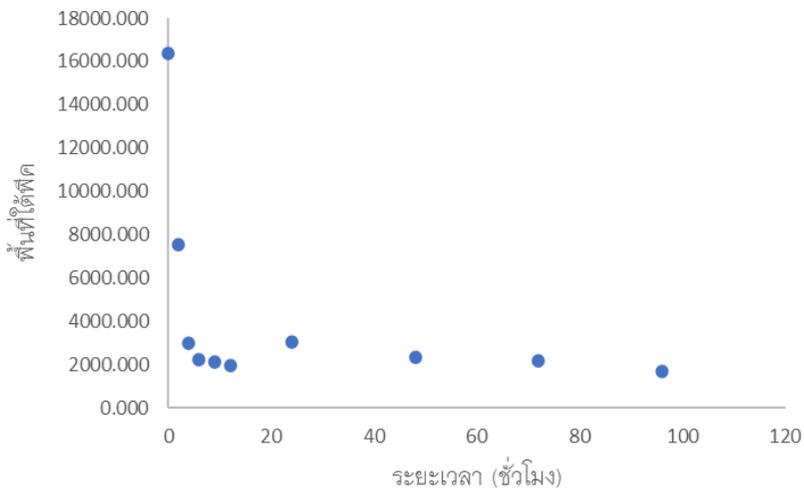
ภาพที่ 6 IR สเปกตรัมของคราบเลือดบนแผ่นไม้อัด หลังจากหยดเลือดที่เวลาทันที (0 ชั่วโมง)

ทำการวิเคราะห์คราบเลือดตัวอย่างบนแผ่นไม้อัดด้วยเครื่อง FTIR ที่ช่วงเลขคลื่น 400–4000 cm^{-1} สามารถแสดงการเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ที่ระยะเวลาต่างกัน ได้แก่ 2 4 6 9 12 24 48 72 และ 96 ชั่วโมง ดังภาพที่ 7



ภาพที่ 7 สเปกตรัมของคราบเลือดบนแผ่นไม้อัด จากการสแกนช่วงเลขคลื่น 400–4,000 cm^{-1} ที่ระยะเวลา 0 (สีส้ม) 2 (สีเลือดหมู) 4 (สีเขียวเข้ม) 6 (สีน้ำตาล) 9 (สีแดง) 12 (สีฟ้า) 24 (สีชมพู) 48 (สีน้ำเงิน) 72 (สีเขียวอ่อน) และ 96 (สีม่วง) ชั่วโมง

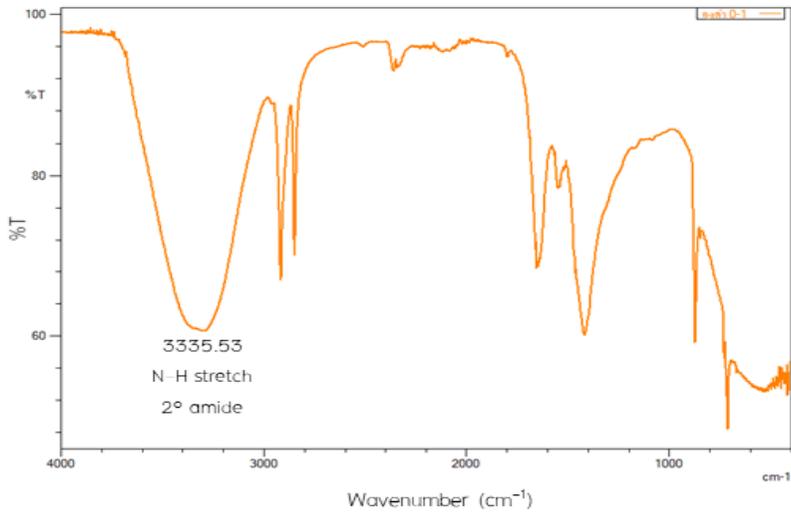
จากการนำตัวอย่างแผ่นไม้อัดที่มีคราบเลือดมาวิเคราะห์ด้วย FTIR โดยการสแกนช่วงเลขคลื่น 400–4,000 cm^{-1} ในช่วงระยะเวลาต่างๆ พบพีคของ 2° amide ของโปรตีนภายในเลือดซึ่งเกิดจาก N–H stretching ของ 2° amide ที่เลขคลื่นประมาณ 3100–3400 cm^{-1} สอดคล้องกับสเปกตรัมที่เป็นหมู่ฟังก์ชันของสารชีวโมเลกุลประเภทโปรตีน (Chonant, Jearanaikoon & Tippayawat, 2017) ซึ่งจากการทดลองพบสัญญาณพีคสูงสุดที่เลขคลื่น 3300 มีการลดลงของพื้นที่ใต้พีคอย่างมีนัยสำคัญ โดยการทดสอบด้วยสถิติ T-test ที่ระดับทางสถิติ 0.05 ทำการทดลองซ้ำ จำนวน 4 ครั้ง การเปลี่ยนแปลงของพื้นที่ใต้พีค ดังภาพที่ 8



ภาพที่ 8 พื้นที่ใต้พีคของโปรตีน (A_{3300}/A_{744}) ในคราบเลือดบนแผ่นไม้อัด

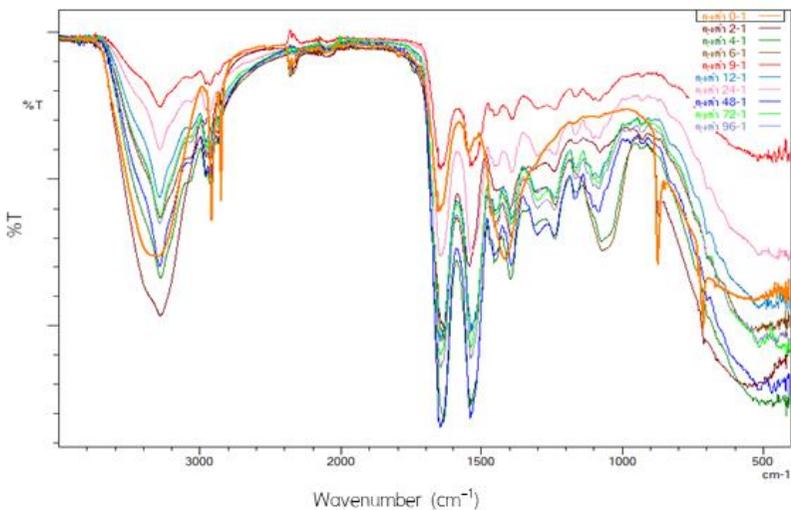
4. ผลการวิเคราะห์คราบเลือดจากตัวอย่างถุงพลาสติกดำที่มีระยะเวลาต่างกัน

ทำการวิเคราะห์คราบเลือดตัวอย่างบนถุงพลาสติกดำ ที่ระยะเวลาหลังจากหยุดเลือดทันที (0 ชั่วโมง) โดยการวางถุงพลาสติกดำที่มีคราบเลือดติดอยู่โดยตรงด้วยเครื่อง FTIR สแกนช่วงเลขคลื่น 400–4000 cm^{-1} ดังภาพที่ 9



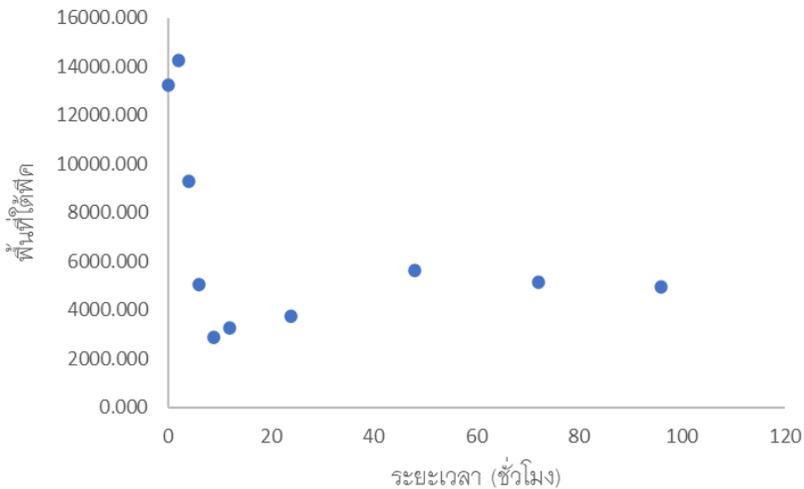
ภาพที่ 9 IR สเปกตรัมของคราบเลือดบนถุงพลาสติกดำหลังจากหยดเลือดที่เวลาทันที (0 ชั่วโมง)

ทำการวิเคราะห์คราบเลือดจากตัวอย่างบนถุงพลาสติกดำโดยตรงด้วยเครื่อง FTIR ที่ช่วงเลขคลื่น 400–4000 cm^{-1} สามารถแสดงการเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ที่ระยะเวลาต่างกันได้แก่ 2 4 6 9 12 24 48 72 และ 96 ชั่วโมง ดังภาพที่ 10



ภาพที่ 10 สเปกตรัมของคราบเลือดบนถุงพลาสติกดำ จากการสแกนช่วงเลขคลื่น 400–4000 cm^{-1} ที่ระยะเวลา 0 (สีส้ม) 2 (สีเลือดหมู) 4 (สีเขียวเข้ม) 6 (สีน้ำตาล) 9 (สีแดง) 12 (สีฟ้า) 24 (สีชมพู) 48 (สีน้ำเงิน) 72 (สีเขียวอ่อน) และ 96 (สีม่วง) ชั่วโมง

จากการวิเคราะห์ตัวอย่างถุงพลาสติกดำที่มีคราบเลือดมาวิเคราะห์ด้วย FTIR โดยการสแกนช่วงเลขคลื่น 400–4000 cm^{-1} ในช่วงระยะเวลาต่างๆ พบพีคของ 2° amide ของโปรตีนภายในเลือดซึ่งเกิดจาก N-H stretching ของ 2° amide ที่เลขคลื่นประมาณ 3100–3400 cm^{-1} สอดคล้องกับสเปกตรัมที่เป็นหมูฟังก์ชันของสารชีวโมเลกุลประเภทโปรตีน (Chonant, Jearanaikoon & Tippayawat, 2017) ซึ่งจากการทดลองพบสัญญาณพีคสูงสุดที่เลขคลื่น 3300 สเปกตรัมมีการลดลงของพื้นที่ใต้พีคอย่างมีนัยสำคัญ โดยการทดสอบด้วยสถิติ T-test ที่ระดับทางสถิติ 0.05 เมื่อทำการทดลองซ้ำ จำนวน 4 ครั้ง พบการเปลี่ยนแปลงของพื้นที่ใต้พีค ดังภาพที่ 11



ภาพที่ 11 อัตราส่วนพื้นที่ใต้พีคของโปรตีน (A_{3300}/A_{744}) ในคราบเลือดบนถุงพลาสติกดำ

อภิปรายผล

จากการศึกษาอายุของคราบเลือดบนพื้นผิวชนิดต่างๆ จากการตรวจวัดโปรตีนด้วยเทคนิค FTIR ที่ระยะเวลาที่แตกต่างกัน และบนพื้นผิวที่ต่างกัน วิเคราะห์ในช่วงเลขคลื่น 400–4000 cm^{-1} พบว่า สเปกตรัมของเลือดปรากฏพีค 2° amide ที่เกิดจากการสั่นของโมเลกุลที่มี N-H stretching ที่เลขคลื่น 3308.34 cm^{-1} พีคของ 1° amide ที่เกิดจาก C=O stretching ที่เลขคลื่น 1644.16 cm^{-1} พีคของ Amide ที่เกิดจาก N-H bending ที่เลขคลื่น 1542.56 cm^{-1} โดยพบรูปแบบของ IR สเปกตรัมที่เกิดจากโปรตีนในคราบเลือดบนพื้นผิวทุกชนิดที่ทำการทดสอบ และยังสอดคล้องกับ IR สเปกตรัมของหยดเลือดตัวอย่าง แสดงให้เห็นว่าโปรตีนในคราบเลือดสามารถตรวจวัดได้โดยตรงจากพื้นผิวที่สัมผัส จากนั้นทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนตามระยะเวลาที่เปลี่ยนแปลงไปบนพื้นผิวแต่ละชนิด โดยศึกษาจากพื้นที่ใต้พีคของ 2° amide ที่เกิดจาก N-H stretching ซึ่งเป็นรูปแบบการสั่นที่สัมพันธ์กับหมู่มูฟังก์ชันของโปรตีนในเลือด และตรวจพบชัดเจนใน IR สเปกตรัม

ที่ปรากฏ พบว่า เมื่อระยะเวลาผ่านไป สเปกตรัมที่พบในทุกตัวอย่างพื้นผิวมีแนวโน้มลดลงอย่างมีนัยสำคัญพีค ของ 2° amide ที่เกิดจาก N-H stretching ลดลง เนื่องจากโปรตีนภายในคราบเลือดเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างในระดับทุติยภูมิ (สราวุธ, ศิริรัตน์ และธนวรรณ, 2554) สอดคล้องกับงานวิจัยของ (Hancheng et al., 2017) ที่ตรวจพบพีคของ 1° amide และ 2° amide ลดลง แสดงถึงการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างในระดับทุติยภูมิ และการสลายตัวของโปรตีน เมื่อระยะเวลาผ่านไปเพียงไม่กี่ชั่วโมง โดยโครงสร้างทุติยภูมิของโปรตีน เกิดจากการดอะมิโนที่อยู่ภายในสายพอลิเพปไทด์เดียวกันมีแรงกระทำด้วยพันธะไฮโดรเจนจนเกิดเสถียรภาพ (Branden & Tooze, 2012) แต่เมื่อเวลาผ่านไปของเหลวในเลือดเปลี่ยนแปลงไปตามเวลา ดังจะสังเกตเห็นได้จากสภาพทางกายภาพของเลือด ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทั้งทางกายภาพและเคมีของเลือด จึงทำให้เกิดการเสถียรภาพของโปรตีนจากการชดกันเป็นเกลียว สัญญาณจาก N-H stretching จึงเปลี่ยนแปลง โดยพบว่า ในช่วง 0–2 ชั่วโมงพื้นที่ใต้พีคมีการลดลงแตกต่างกันอย่างชัดเจน แสดงให้เห็นถึงโปรตีนในคราบเลือดอาจมีการเปลี่ยนแปลงหรือสลายตัวไปอย่างรวดเร็ว ส่งผลให้สัญญาณที่วัดได้จาก N-H stretching มีค่าน้อยลง ซึ่งพบการเปลี่ยนแปลงในลักษณะเดียวกันนี้กับทุกพื้นผิว และการเปลี่ยนแปลงจะเริ่มคงที่จนเมื่อระยะเวลาผ่านไปเกินกว่า 9 ชั่วโมง IR สเปกตรัมของ N-H stretching มีค่าการเปลี่ยนแปลงลดลงจนคงที่เนื่องมาจากปริมาณโปรตีนบนพื้นผิวไม่มีการเปลี่ยนแปลง ทำให้สามารถใช้ประโยชน์จากข้อมูลนี้ในการประมาณระยะเวลาคราบเลือดที่มีอายุนานกว่า 9 ชั่วโมงได้ เมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ระหว่างการเปลี่ยนแปลงของโปรตีน และระยะเวลาในช่วง 0–9 ชั่วโมง โดยการศึกษาความสัมพันธ์เชิงเส้นจะพบว่า ปริมาณโปรตีนแปรผกผันกับระยะเวลาที่เพิ่มขึ้น ปริมาณโปรตีนในตัวอย่างถูกพลาสติกดีก้าแสดงการลดลงเป็นเส้นตรงในช่วงแรกอย่างชัดเจนมากกว่าพื้นผิวชนิดอื่นแตกต่างจากผ้าฝ้ายชัดเจน เนื่องจากผ้าเป็นวัสดุที่พื้นผิวมีรูพรุน (Porous) เลือดสามารถซึมผ่านลงเนื้อผ้า ทำให้ความหนาแน่นของโปรตีนในเลือดต่อพื้นที่ลดลง ส่งผลต่อ ATR-FTIR เพราะจะให้สัญญาณแต่ละพีคจากสารตัวอย่างเลือดที่ติดอยู่บนพื้นผิวน้อยลง ในขณะที่แผ่นไม้อัดมีลักษณะที่เป็นรูพรุนน้อยกว่าผ้า พบว่า อัดจนเป็นแผ่นละเอียดและแน่นหนา ตัวอย่างเลือดซึมผ่านได้น้อยกว่าผ้าฝ้าย ส่งผลให้ความหนาแน่นของโปรตีนภายในเลือดต่อพื้นที่มากกว่า สำหรับถูกพลาสติกดีก้ามีความสัมพันธ์โดยแปรผกผันลดลงชัดเจนมากที่สุด เนื่องจากถูกพลาสติกดีก้าเป็นวัสดุที่ไม่มีรูพรุน (Non Porous) คราบเลือดทั้งหมดจะสะสมและติดอยู่บนพื้นผิว ส่งผลให้ความหนาแน่นของโปรตีนสูงที่สุด จึงสามารถวัดปริมาณโปรตีนภายในเลือดได้สัญญาณที่ชัดเจนกว่าบนพื้นผิวชนิดอื่น แม้ความสัมพันธ์ของปริมาณโปรตีนกับระยะเวลาจะแตกต่างกันเล็กน้อย อย่างไรก็ตามแนวโน้มการลดลงของปริมาณโปรตีนที่ตรวจวัดได้ในแต่ละพื้นผิว สามารถใช้เป็นข้อมูลเพื่อกำหนดเกณฑ์ในการประเมินระยะเวลาได้จากคราบเลือดที่ตรวจเก็บ โดยการกำหนดช่วงเวลาก่อน 2 ชั่วโมงหรือหลังจาก 9 ชั่วโมง ไปแล้วหลังเกิดเหตุ เนื่องจากปริมาณโปรตีนที่ตรวจวัดในทุกพื้นผิวมีการเปลี่ยนแปลง

ในช่วงแรก และพบไม่เปลี่ยนแปลงจนคงที่แล้วหลังจากระยะเวลาที่กำหนดดังกล่าว เมื่อวิเคราะห์เปรียบเทียบผลการทดลองในครั้งนี้กับงานวิจัยที่เกี่ยวข้องที่ผ่านมา พบว่า การตรวจวัดโปรตีนในตัวอย่างคราบเลือดด้วยเทคนิค FTIR เพื่อประเมินระยะเวลาหลังเกิดเหตุมีแนวทางการศึกษาโดยวิเคราะห์โปรตีนที่อยู่ในคราบเลือดจากฮีโมโกลบินซึ่งเป็นโมเลกุลโปรตีนภายในเซลล์เม็ดเลือดแดงสำหรับการติดตามการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนในคราบเลือด พบว่า กระบวนการเตรียมตัวอย่างมีการประยุกต์ใช้ทั้งการเตรียมเป็นสารละลายของคราบเลือดที่เหมาะสมเพื่อทำการแยกและวิเคราะห์ (กฤษณะ, 2561) การชูดตัวอย่างคราบเลือดที่ติดอยู่บนพื้นผิวออกเพื่อเตรียมเป็นสารละลายสำหรับวิเคราะห์ด้วยเครื่อง UV-Visible Spectrometer (ปาเลวี และชิตติ, 2561) หรือการอัดแผ่น KBr ที่ใส่ตัวอย่างคราบเลือดเพื่อวิเคราะห์ด้วยเครื่อง FTIR (สรารูธ, ศิริรัตน์ และธรรณ, 2554) ตลอดจนการวิเคราะห์คราบเลือดโดยตรงบนพื้นผิวที่หยดเลือดลงไป (จิณห์นิภา และศิริรัตน์, 2566) เมื่อประมวลผลร่วมจากแต่ละงานวิจัย พบว่าผลการประเมินอายุของคราบเลือดเพื่อเชื่อมโยงระยะเวลาหลังเกิดเหตุ ให้แนวทางที่สอดคล้องกัน ปริมาณโปรตีนที่ตรวจวัดในคราบเลือดพบมีการเปลี่ยนแปลงน้อยมากจนคงที่เมื่อระยะเวลาผ่านไป 1 วัน นอกจากนี้การตรวจวัดโปรตีนจากคราบเลือดโดยตรงจะให้ความคลาดเคลื่อนต่ำ ในช่วงระยะเวลา 1–4 ชั่วโมง หลังการหยดคราบเลือด (จิณห์นิภา และศิริรัตน์, 2566) สอดคล้องกับผลการศึกษาในงานวิจัยนี้ซึ่งพบการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนในคราบเลือดอย่างชัดเจนในช่วง 0–2 ชั่วโมง และเริ่มคงที่เมื่อเวลาผ่านไป อีกทั้งเป็นการตรวจวัดโดยตรงจากคราบเลือดเช่นกัน อย่างไรก็ตามในงานวิจัยต่อไปควรทำการศึกษาเพิ่มเติมและทำการทดสอบความใช้ได้ของวิธีการตรวจวัดโปรตีนจากคราบเลือดโดยตรงด้วยเครื่อง FTIR เทียบกับเทคนิคอื่นๆ และวิเคราะห์ผลโดยใช้สถิติที่เกี่ยวข้อง เช่น T-test เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโปรตีนระหว่างเทคนิค เป็นต้น เพื่อความเชื่อมั่นของผลการวิเคราะห์และใช้เป็นแนวทางในการเลือกเทคนิคการตรวจพิสูจน์ที่เหมาะสมต่อไป

สรุปผลการวิจัย

การศึกษาอายุของคราบเลือดบนพื้นผิวชนิดต่างๆ จากการตรวจวัดโปรตีนด้วยเทคนิค FTIR สามารถใช้ประมาณอายุของคราบเลือดได้ โดยสามารถประมาณอายุของเลือดที่น้อยกว่า 2 ชั่วโมง หรือมากกว่า 9 ชั่วโมง แต่เทคนิคนี้ต้องพิจารณาสภาพพื้นผิวที่พบคราบเลือดประกอบ ซึ่งวัสดุแบบพื้นผิวที่ไม่มีรูพรุนจะให้สัญญาณของโปรตีนชัดเจน การตรวจวัดมีความเป็นเส้นตรงสูง โดยถุงพลาสติกทำให้ผลการเปลี่ยนแปลงโปรตีนที่ชัดเจนที่สุด นอกจากนี้ FTIR มีข้อดีที่ไม่ทำลายตัวอย่าง เนื่องจากเป็นการวัดจากพื้นผิววัตถุโดยตรง เหมาะกับงานด้านนิติวิทยาศาสตร์ ที่พยานหลักฐานมีปริมาณน้อย สะดวกต่อการตรวจวิเคราะห์ซ้ำ อย่างไรก็ตามการใช้เครื่อง FTIR เป็นเพียงการวิเคราะห์หุ้มฟังก์ชันที่อยู่โมเลกุลของสารที่สนใจ ในการประมาณอายุของคราบเลือด

จากการวิเคราะห์โปรตีนให้มีความถูกต้องแม่นยำยิ่งขึ้นควรมีการวิเคราะห์ร่วมกับเทคนิคที่สามารถวิเคราะห์หลักฐานวิทยาเพื่อเปรียบเทียบโครงสร้าง และธาตุองค์ประกอบทำให้สามารถติดตามการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนจากระยะเวลาที่เปลี่ยนแปลงไปได้อย่างมีประสิทธิภาพ เช่น ในกรณีที่พบคราบเลือดบนพื้นผิวต่างๆ ของวัตถุสิ่งของหรือสิ่งแวดลอม นักนิติวิทยาศาสตร์สามารถทำการตรวจเก็บและตรวจพิสูจน์ได้โดยตรง เพื่อนำไปประกอบกับข้อมูลและพฤติการณ์ของเหตุที่เกิดขึ้น สนับสนุนการประมาณระยะเวลาของเหตุที่เกิดกับพยานหลักฐานอื่นๆ ได้อย่างถูกต้องและแม่นยำมากยิ่งขึ้น

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ คณะนิติวิทยาศาสตร์ โรงเรียนนายร้อยตำรวจ คณาจารย์ และเจ้าหน้าที่ ตลอดจนสิ่งสนับสนุนการเรียนรู้และห้องปฏิบัติการสำหรับการวิจัย

เอกสารอ้างอิง

- กฤษณะ พวงระย้า. (2561). การประมาณอายุของคราบเลือดด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC). (วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต). มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี, สาขาวิชาเคมี.
- จิณห์นิภา ปาวะภินันท์, และศิริรัตน์ ชูสกุลเกรียง. (2566). การประเมินอายุคราบเลือดจากการวัดค่าสีด้วย Spectrophotometer และด้วยเทคนิค ATR-FTIR. (วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต). มหาวิทยาลัยศิลปากร, บัณฑิตวิทยาลัย, สาขาวิชานิติวิทยาศาสตร์.
- ปาเลวี งามซ่า, และธิดิ มหาเจริญ. (2561). การประมาณอายุของคราบเลือดด้วย UV-Visible Spectrometer Age Estimation of Bloodstain by Using UV-Visible Spectrometer. *วารสารวิชาการบัณฑิตวิทยาลัยสวนดุสิต*, 14(2), 215–230.
- พรวิณัส งามเสมอ. (2553). การประมาณอายุของคราบเลือดจากการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย. (วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต). มหาวิทยาลัยศิลปากร, สาขาวิชานิติวิทยาศาสตร์.
- สรารุช แหมยศิริ, ศิริรัตน์ ชูสกุลเกรียง, และธนวรรณ วัฒนพร. (2554). การตรวจหาอายุคราบโลหิตด้วย Fourier Transform Infrared Spectroscopy. *Veridian E-Journal, Silpakorn University (Humanities, Social Sciences and arts)*, 5(2), 721–729.
- Branden, C.I., & Tooze, J. (2012). *Introduction to protein structure*. New York: Garland Science.
- Chonant, C., Jearanaikoon, P., & Tippayawat, P. (2017). Applications of FTIR technique in Biomedical Sciences. *Thammasat Medical Journal*, 17(4), 641–652.
- Lin, H., Zhang, Y., Wang, Q., Li, B., Huang, P., & Wang, Z. (2017). Estimation of the age of human bloodstains under the simulated indoor and outdoor crime scene conditions by ATR-FTIR spectroscopy. *Scientific reports*, 7(1), 13254.

- Panta, O., Mongesvit, K., Chayothai, N., & Bunroek, P. (2022). Detection of Human Bloodstains on Natural, Synthetic and Mixed Fabrics by The BlueStar Method. **Journal of Criminology and Forensic Science**, **8**(1), 17–30.
- Schaller, J., Gerber, S., Kaempfer, U., Lejon, S., & Trachsel, C. (2008). **Human blood plasma proteins: structure and function**. U.S.A.: John Wiley & Sons.
- Thongpagde, W., & Saksiri, N. (2022). Developing the Forensic Evidence and Problem in Murder Prosecution. **Journal of Criminology and Forensic Science**, **8**(2), 186–203.