รายงานสัมมนา

Raman spectroscopic signature of semen and its potential application to forensic body fluid identification

สัญญาณบ่งชี้จำเพาะของคราบอสุจิที่ตรวจพบด้วยเครื่องรามานสเปคโตโฟโตมิเตอร์ และการประยุกต์ใช้ที่เป็นไปได้ในการตรวจสอบทางนิติวิทยาศาสตร์ของของเหลวที่หลั่งจากร่างกาย

อาจารย์ที่ปรึกษา

อาจารย์ ดร. พัลลภ คันธิยงค์

จัดทำโดย

นางสาวศศิธร พรหมวัลย์

รหัสประจำตัว 52312334

รายงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของรายวิชา 510701 สัมมนานิติวิทยาศาสตร์ 1

ภาคต้น ปีการศึกษา 2553

หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขานิติวิทยาศาสตร์

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร

คำนำ

ในการตรวจสถานที่เกิดเหตุ การที่จะได้มาซึ่งวัตถุพยานและผลการวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการนั้น ต้องมีผู้ปฏิบัติงานที่มีความรู้รวมถึงเครื่องมือวิเคราะห์และเทคนิคในการวิเคราะห์ที่ดีประกอบกัน ซึ่งเทค นิคที่ใช้ในการวิเคราะห์วัตถุพยานก็มีหลายเทคนิค ซึ่งในรายงานฉบับนี้ได้นำเสนอ งานวิจัยที่ใช้เทคนิคการวิเคราะห์วัตถุพยานที่เป็นสารคัดหลั่งจากร่างกายวิธีหนึ่ง เรียกเทคนิคนี้ว่า “รามานสเปคโตรสโคปี” ซึ่งข้อดีของเทคนิคนี้คือ การไม่ทำลายตัวอย่างตรวจ และถูกรบกวนจาก น้ำได้น้อย นอกจากนี้ในปัจจุบันเทคนิคนี้ได้ถูกนำมาใช้วิเคราะห์สารต่างๆ เช่น น้ำหมึก เส้นใย ทางนิติวิทยาศาสตร์เพิ่มขึ้นด้วย

ผู้จัดทำหวังเป้นอย่างยิ่งว่า รายงานฉบับนี้ จะเป็นประโยชน์ต่อผู้ที่มีความสนใจได้ไม่มากก็น้อย และถ้ามีข้อผิดพลาดประการใด ก็ขออภัยมา ณ ที่นี้ด้วย

นางสาวศศิธร พรหมวัลย์ 52312334

สารบัญ

	หน้า
คำนำ	ข
สารบัญ	ค
บทคัดย่อ	ง
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรม	4
บทที่ 3 วิธีการทดลอง	8
บทที่ 4 ผลการทดลอง	10
บทที่ 5 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง	18
บรรณานุกรม	20
ภาคผนวก	

สัญญาณบ่งชี้จำเพาะของคราบอสุจิที่ตรวจพบด้วยเครื่องรามานสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ และการประยุกต์ใช้ที่เป็นไปได้ในการตรวจสอบทางนิติวิทยาศาสตร์ของของเหลวที่หลั่งจากร่างกาย

Raman spectroscopic signature of semen and its potential application to forensic body fluid identification

510 701 **สัมมนาสำหรับนิติวิทยาศาสตร์1 ภาคต้น ปีการศึกษา** 2553

ผู้ให้สัมมนา นางสาวศศิธร พรหมวัลย์ รหัส 52312334

อาจารย์ที่ปรึกษา อาจารย์ดร. พัลลภ คันธิยงค์

วันที่ 21 **สิงหาคม** 2553 **เวลา** 9.00-12.00 **น.**

บทคัดย่อ

เมื่อเร็วๆ นี้ได้มีการรายงานถึงการใช้เครื่องรามานส เปคโตรโฟโตมิเตอร์ ซึ่งเป็นเครื่องมือที่ไม่ทำให้เกิดความเสียหายต่อหลักฐาน โดยสามารถยืนยันการแยกสารคัดหลั่งจากร่างกายในสถานที่เกิดเหตุ (Virkler and Lednev, Forensic Sci. Int. 2008) อย่างไรก็ตาม ผลการวิเคราะห์นั้น สามารถคัดแยกสารคัดหลั่งได้เพียงชนิดเดียวเท่ านั้น ไม่สามารถแยกความแตกต่างของน้ำคัดหลั่งชนิดเดียวกันจากหลายบุคคลได้ สิ่งตีพิมพ์ฉบับนี้จึงได้รายงานถึงความแตกต่างของเซลล์สืบพันธุ์ ภายในตัวอย่างเดียวกัน ที่ได้จากน้ำอสุจิของหลายบุคคล เครื่องตรวจวัดสเปกตรัม – Raman (Near-Infrared Raman Spectrum) เป็นเครื่องที่ใช้วัดสเปกตรัม ของตัวอย่างคราบอสุจิแห้งจากผู้บริจาคหลายคน ที่นำมาเตรียมตัวอย่างขึ้นในห้องทดลองที่ควบคุมสภาพแวดล้อม ส่วนประกอบหลักทางเคมีของน้ำอสุจิ ที่มีการสะท้อนสเปกตรัม - Raman ถูกใช้เพื่อบ่งชี้และจำแนกโดยการใช้ส่วนประกอบสเปกตรัมหลัก เส้นสเปกตรัมที่ได้มีความแตกต่างกันในน้ำอสุจิจากแต่ละบุคคล

การวิเคราะห์สถิติขั้นสูงของผลสเปกตรัมได้มาจากหลายจุดบนตัวอย่างที่แห้งตรวจพบว่า คราบอสุจิแต่ละจุดมีความแตกต่างกัน และผลสเปกตรัมแฝงอาจแสดงผลได้เป็นกราฟเส้นตรงระหว่าง พื้นหลังฟลูออเรสเซนต์และส่วนประกอบ 3 สเปกตรัม ความสัมพันธ์ในแต่ละอันของ 3 ส่วนประกอบนั้น ผันแปรตามบุคคล ดังนั้นจึงทำให้ไม่มีผลของเส้นสเปกตรัมเดี่ยวแสดงให้เห็นในการทดลองหาสเปกตรัม-Raman ของคราบอสุจิในเชิงปริมาณ การใช้ 3 สเปกตรัมประกอบกันสามารถนำมาใช้ในการจำแนกน้ำอสุจิ บทความนี้แสดงให้เห็นว่าเครื่องตรวจวัดสเปกตรัม –Raman สามารถใช้ในการตรวจสอบสาร unknown ว่าเป็นน้ำอสุจิในการตรวจพิสูจน์ทางนิติวิทยาศาสตร์ได้

เอกสารอ้างอิง

1. K. Virkler, I.K. Lednev, 2009, *Forensic Science Int*, 193, 56–62

2. K. Virkler, I.K. Lednev, 2008, *Forensic Sci, Int,* 181, e1–e5.

3. J. Thomas, P. Buzzini, G. Massonnet, B. Reedy, C. Roux, 2005 *Forensic Sci. Int*, 152, 189–197.

บทที่ 1

บทนำ

ความสามารถในการจำแนกร่องรอยสารคัดหลั่งจากร่างกายที่ตรวจพบในสถานที่เกิดเหตุ มีความสำคัญเป็นอย่างมากในการสืบสวนทางนิติวิทยาศาสตร์ ด้วยวิธีการวิเคราะห์ทางนิติวิทยาศาสตร์ DNA เป็นที่นิยมและให้ข้อมูลมาก จึงต้องให้แน่ใจว่าตัวอย่างร่องรอยสารคัดหลั่งใดๆ จะต้ องถูกเก็บรักษาไม่ให้ถูกทำลายขณะที่ผ่านกระบวนการต่างๆ สารคัดหลั่งอาทิเช่น เลือด น้ำ อสุจิ น้ำลาย หรือน้ำจากช่องคลอด สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการระบุตั วเหยื่อหรือผู้ต้องหาได้ ทั้งยังสามารถลำดับการเกิดอาชญากรรมได้ เครื่องมือเชิงวิเคราะห์ที่สามารถแยกแยะสารคัดหลั่งได้อย่างรวดเร็ว ง่ายและไม่ทำให้ตัวอย่างเสียหายก็จะเป็นเครื่องมือที่ทรงคุณค่าในงานสืบสวนทางนิติวิทยาศาสตร์

ผู้วิจัยมีรายงานเมื่อเร็วๆนี้ว่า เทคนิครามานสเปคโตรสโคปี สามารถใช้ในการจำแนกความแตกต่างของสารคัดหลั่งได้ดีโดยไม่มีการทำลายหลักฐาน ยืนยันการจำแนกสารคัดหลั่งจากร่างกายในสถานที่เกิดเหตุ อย่างไรก็ตาม การวิเคราะห์นี้ทำสำเร็จเฉพาะตัวอย่างตรวจเดียวของแต่ละสารคัดหลั่งเท่านั้น และไม่สามารถพิจารณา ความหลากหลายบางอย่างที่ปรากฏขึ้นระหว่างตัวอย่างของตัวบุคคล ที่มีความแตกต่างกันภายในตัวมันเอง เนื่องจากส่วนประกอบทางเคมีที่ต่างกัน ผู้วิจัยพยายามที่จะสำรวจผลขององค์ประกอบทางเคมีที่มีผลกับองค์ประกอบสเปคตรัมรามานของสารคัดหลั่ง วารสารตีพิมพ์ฉบับนี้เป็นการสืบหาบทบาทของสภาพเซลล์สืบพันธุ์ที่ต่างกันภายในตัวอย่างเดียวได้ดีพอๆ กับหลายๆ ตัวอย่างจากหลายๆ บุคคลสำหรับน้ำอสุจิมนุษย์

นอกเหนือจากเลือดแล้ว น้ำอสุจิเป็นหนึ่งในสารคัดหลั่งที่พบอย่างแพร่หลายในการตรวจสถานที่เกิดเหตุ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกรณีที่เกี่ยวกับการกระทำผิดทางเพศ (ข่มขืน) มีการทดลองเมื่อไม่นานมานี้ที่ทั้งการสันนิษฐานและการยืนยันผลว่าการทดลองนี้สามารถใช้ในการคัดแยกสารน้ำ unknown ที่พบในสถานที่เกิดเหตุก็คือ น้ำอสุจิ การเปลี่ยนแปลงแหล่งกำเนิดแสง (ALS) สามารถช่วยในการหาส่วนประกอบทางชีววิทยาได้แน่นอนรวมถึงน้ำอสุจิ เครื่องมือเกี่ยวกับ ALS บางอย่างถูกพัฒนาขึ้น เช่น Wood's Lamp Bluemaxx™ BM500 Polilight® และ Lumatec Superlight 400 แต่ไม่จำเพาะกับการจำแนกน้ำอสุจิ และสามารถใช้ได้เพียงการตรวจครั้งแรก การสันนิษฐานที่นิยมสำหรับการทดสอบ acid phosphatase (SAP) ของน้ำอสุจิ เป็นที่น่าเชื่อถือมากกว่า แต่มันมักจะทำลายตัวอย่าง และมีการ

เปลี่ยนแปลงบางอย่างที่เกิดผลบวกปลอม วิธีที่ใช้อย่างแพร่หลายมากที่สุดสำหรับ ยืนยันการจำแนกน้ำอสุจิ คือใช้การย้อมสีจำเพาะแล้วนำไปส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ดูตัวอสุจิ และการทดส อบทางภูมิคุ้มกันวิทยาสำหรับ prostate-specific antigen (PSA) วิธีการย้อมสีมักจะไม่ช่วยคลี่คลายถ้าบุคคลนั้นเป็นพวกไม่มีตัวอสุจิ ดังนั้นเทคนิคนี้จึงมีข้อจำกัดในการประยุกต์ใช้ในห้องปฏิบัติการ ชุดตรวจ PSA ทั่วไปที่ถูกพัฒนาขึ้นสำหรับใช้ในสถานที่เกิดเหตุ ประกอบด้วย Biosign® PSA, OneStep ABAcard, Chembio, Medpro, Onco-screen, PSA-check-1, Seratec® PSA Semiquant, และ SMITEST ในการทดสอบข้อสันนิษฐาน ชุดตรวจ PSA ให้ผลบวกปลอมและยังทำลายตัวอย่างด้วย การทดสอบ PSA ไม่สามารถใช้ยืนยันได้ เนื่องจากมีการเปลี่ยนแปลงบางอย่ างที่ให้ผลบวกปลอมที่อาจพบได้ ในกรณีของเลือดที่มาจากผู้หญิงที่พบว่าเป็นมะเร็ง

ในเคสส่วนใหญ่ที่มีปริมาณของตัวอย่าง unknown ที่มากพอสำหรับการวิเคราะห์ ดังนั้นความต้องการสำหรับการทดสอบที่ใช้คัดแยกที่ไม่เป็นการทำลายตัวอย่างจึงเป็นสิ่งจำเป็น อย่างไรก้ตาม บางค รั้งปริมาณของวัตถุพยานที่เป็นน้ำอสุจิในจำนวนน้อยๆ ก็สามารถคลี่คลายคดีได้ ถ้าตัวอย่างนั้นมีความเหมาะสม ดังนั้นมันจึงเป็นสิ่งบ่งชี้ว่า การแบ่งในระยะเวลาอันสั้นของวัตถุพยานที่เหมาะสมคือกระบวนการที่มีประสิทธิภาพ และไม่มีการทำลายหลักฐาน ในการที่จะนำไปวิเคราะห์ เพิ่มเติม รวมทั้งการทำ DNA typing ก็สามารถดำเนินการได้ การตีพิมพ์อื่นๆ คือ ความเป็นไปได้ของผลบวกปลอมกับเทคนิคการจำแนกที่แพร่หลาย การใช้ชุด kit เป็นสิ่งที่ง่ายและแพร่หลาย ไม่ได้ช่วยยืนยันผลทั้งหมดที่มีการปรากฏของน้ำอสุจิในแต่ละตัวอย่างในรูปที่บริสุทธิ์หรือในลักษณะที่มีการย้อมสี ทางกลุ่มนิติวิทยาศาสตร์ มีความต้องการวิธีการที่มีการจำลอง ไม่ทำลายตัวอย่าง และมีความสะดวกในการคัดแยกการปรากฏของน้ำอสุจิในสถานที่เกิดเหตุอย่างเฉพาะตัว และจำแนกมันออกจากสารคัดหลั่งจากร่างกายชนิดอื่นๆ ได้

รามานสเปคโตรสโคปีเป็นเทคนิคทางนิติวิทยาศาสตร์วิธีหนึ่งที่ได้รับความนิยมเพิ่มมากขึ้นเมื่อไม่นานมานี้ และมันยังถูกใช้ในการหาข้อมูลที่ก้าวหน้าเกี่ยวกับโครงสร้างและคุณสมบัติของส่วนประกอบพื้นฐานที่มีการเปลี่ยนแปลงแบบสั่น การประยุกต์ที่ถูกนำมาใช้ในปัจจุบันสามารถวิเคราะห์ เส้นใย ยา และลิปสติก ได้ดีพอๆ กับ การวิเคราะห์น้ำหมึก สี และถุงยางอนามัย ทฤษฎีขั้นสูงของรามานสเปคโตรสโคปีรวมถึงการกระเจิงแสงแบบไม่ยืดหยุ่นของความหนาแน่นต่ำ โมโนโครมาติก และแสงเลเซอร์ที่ไม่ทำลายตัวอย่างโดยตัวอย่างที่ใช้เป็นได้ทั้งของแข็ง ของเหลว หรือก๊าซ การวิเคราะห์นี้ไม่ต้ องมีการเตรียมตัวอย่างและสารเคมี สิ่งสำคัญที่สุดคือ ตัวอย่างที่ใช้ในการวิเคร าะห์ด้วยรามานนั้นใช้ในปริมาณน้อยๆ ขนาดพิโค

กรัมหรือเฟมโตลิตรได้ และตัวอย่างไม่ถูกทำลายโดยการวิเคราะห์ เส้นสเปคตรัมรามานแสดงสัญญาณการสั่นที่จำเพาะของตัวอย่างที่ถูกวัดค่าพลังงานของการกระเจิงแสง และลักษณะเฉพาะนี้เป็นประโยชน์มากมายในการจำแนกสาร unknown รามานสเปคโตรสโคปีมีความเหมาะสมในการวิเคราะห์ตัวอย่างที่มีความหลากหลายและไม่เป็นระเบียบ ซึ่งเป็นคุณสมบัติทั่วไปของสารคัดหลั่ง สุดท้าย รามานสเปคโตรสโคปี แสดงการรบกวนได้น้อย จากน้ำ ซึ่ งเทคนิคส่วนใหญ่ในการวิเคราะห์สารคัดหลั่งและวัตถุพยานอื่นๆ มักถูกรบกวนได้ เครื่องรามานสเปคโตรมิเตอร์ที่เคลื่อนย้ายได้มีความเหมาะสมและในการออกแบบด้วยซอฟต์แวร์ขั้นสูง ใช้ประยุกต์ในการจำแนกน้ำอสุจิในที่เกิดเหตุได้

องค์ความรู้ของคณะผู้วิจัยไม่มีการประกาศการทดลองรวมถึงวิธีการแยกน้ำอสุจิโดยใช้รามานสเปคโตสโคปี ซึ่งจุดประสงค์ของการศึกษานี้คือ เพื่อศึกษาความแตกต่างของสภาพเซลล์ในตัวอย่างคราบอสุจิจากคนๆเดียว พร้อมกับการวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงคุณภาพของตัวอย่างที่ได้จากบุคคลที่แตกต่างกันโดยใช้ NIR รามานสเปคโตรสโคปี สิ่งสำคัญที่เน้นคือตัวอย่างที่ถูกวัดอยู่ในรูปที่บริสุทธิ์และไม่แสดงสภาพที่ตั้งสถานที่เกิดเหตุรวมถึง การผสมกัน การลด ความเข้มข้น หรือการปนเปื้อนสารอื่นๆ สิ่งเหล่านี้คือขอบเขตของการศึกษา และค้นหามากขึ้นในการศึกษาระดับของการประยุกต์ใช้ได้ของเทคนิคนี้ สมมติฐานของผู้วิจัยคือ น้ำอสุจิมนุษย์ที่แตกต่างกันทั้งสารเคมีและสเปคตรัม เป็นสาเหตุให้การตรวจวัดสเปคตรัมจากจุดที่ต่างกันในตัวอย่างที่เหมือนกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ค่ากลางการเปลี่ยนแปลงนี้ไม่ใช่สเปคตรัมเดียวที่มีอยู่ในน้ำอสุจิมนุษย์ สัญญาณสเป คโตรสโครปีกถูกพัฒนาเป็นความสัมพันธ์แบบเส้นตรงของส่วนประกอบสเปคตรัมที่หลากหลายในน้ำอสุจิ กับองค์ประกอบที่ถูกแยกได้จากสารเคมีที่มีอยู่ในน้ำอสุจิ ลักษณะขององค์ประกอบหลักนั้นถูกใช้ใน “mulit-dimensional analysis” ของคราบอสุจิที่ตรงข้ามกับ “Single-dimensional analysis” ที่รวมถึงการเปรียบเทียบของสเปคตรัมค่าเฉลี่ยเดียว องค์ประกอบหลักที่พบได้จากตัวอย่างอสุจิพื้นฐานที่ถูกทำให้พอดีกับค่าเฉลี่ยสเปคตรัมของคราบอสุจิได้มาจากหลายๆ บุคคลแสดงประสิทธิภาพของสัญญาณสเปคโตรสโครปิกที่จำเพาะ ที่ถูกประยุกต์ในทุกๆตัวอย่างอสุจิ ผู้วิจัยรายงานส่วนประกอบ NIR รามานสเปคตรัมคราบอสุจิ พบโดยการวิเคราะห์ตัวอย่างคราบอสุจิเดียวได้ดีเท่ากับสเปคตรัมที่ได้จากการวิเคราะห์ตัวอย่างคราบอสุจิจากหลายๆ บุคคล งานเบื้องต้น ของพีครามานหลักและการจำแนกที่เป็นไปได้ขององค์ประกอบน้ำอสุจิถูกนำมาใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานของข้อมูลรายงาน

บทที่ 2

ทบทวนวรรณกรรม

1.น้ำอสุจิ (Semen)

น้ำอสุจิ (Semen) เป็นน้ำที่หลั่งจากอวัยวะเพศชาย จากการร่วมประเวณี หรือถูกกระตุ้นให้เคลื่อนออกมามีลักษณะเป็นน้ำเหนียวสีขาวขุ่น หลั่งออกมาครั้งละ 1.5-6.0 มิลลิลิตร ประกอบด้วยตัวอสุจิ (Sperm) และส่วนที่เป็นน้ำ มีจำนวนตัวอสุจิเฉลี่ยประมาณ 300-500 ล้านตัว

ส่วนประกอบของน้ำอสุจิ

1. ของเหลวและตัวอสุจิที่ออกมาจาก Vas deferens ~ 10%

2. ของเหลวจาก Seminal vesicles ~ 60%

3. ของเหลวจาก Prostate Gland (ต่อมลูกหมาก) ~30%

4. ของเหลวจาก Mucus gland อีกนิดหน่อย

ค่าความเป็นกรดด่างของน้ำอสุจิ อยู่ที่ประมาณ 7.5 คือเป็นด่างเล็กน้อย หากอยู่ในที่ๆ เป็นด่างมากกว่านี้ จะทำให้ตัวอสุจิตาย หากอยู่ในที่ๆ มีอุณหภูมิสูง จะทำให้เคลื่อนที่ได้เร็วขึ้น ภายในมี Metabolic rate สูงขึ้น แต่ก็ทำให้ตัวอสุจิมีอายุน้อยลงด้วยเช่นกัน

เพศชายจะเริ่มสร้างตัวอสุจิ ที่ ผลิตจาก อัณฑะ ในท่อที่เรียกว่า Seminiferus Tubules เมื่ออายุประมาณ 12 ปี และจะสร้างไปจนตลอดชีวิต

2.การตรวจหาคราบอสุจิ

2.1. การเก็บหลักฐานทำได้โดยการใช้สำลีป้ายจากภายในช่องคลอด

2.2. การตรวจหาตำแหน่งของคราบ คราบที่ปรากฏบริเวณเสื้อผ้าที่มีสีดำหรือสีเข้มอาจมองด้วยตาเปล่าไม่เห็นว่าอยู่ที่ตำแหน่งใด การตรวจหาตำแหน่งของคราบในกรณีนี้ต้องใช้แสงอุลตร้าไวโอเลท (Ultraviolet lamp) ส่องในห้องมืด จะทำให้มองเห็นบริเวณที่มีคราบติดอยู่ปรากฏชัดเจนต่างจากบริเวณอื่น

2.3. การตรวจคราบอสุจิโดยหาตัวอสุจิ จากการส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์

2.4. การตรวจทางเคมี เนื่องจากส่วนประกอบของน้ำอสุจิ มีสารเคมีหลายชนิด จึงทำการตรวจหา ถ้าพบสารเหล่านั้นก็แสดงว่า คราบนั้ นน่าจะเป็นอสุจิ การตรวจสารเคมีนี้ไม่อาจยืนยันได้แน่นอนเหมือนกรณีที่ตรวจพบตัวอสุจิ เพราะสารเคมีดังกล่าวมิได้มีอยู่เฉพาะแต่ในน้ำอสุจิเท่านั้น

2.4.1 การตรวจโคลีน คือ การตรวจหาสารโคลีน (Choline) ซึ่งมีอยู่ในน้ำอสุจิ วิธีนี้เป็นวิธีเก่าเรียกว่า การทดสอบฟลอเรนซ์ (Florence test) วิธีนี้ใช้วิธีเคมีร่วมกับการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์

ในปัจจุบันวิธีนี้ใช้กันน้อย เพราะมีความไม่แน่นอนอยู่มากและการตรวจก็ไม่ไวพอ การตรวจวิธีนี้ ถ้าให้ผลบวกก็แสดงเพียงว่าคราบนั้นน่าจะเป็นน้ำอสุจิได้

2.4.2 การตรวจหาสารแอสิดฟอสฟาเตส (Acid phosphatase test) สารนี้เป็นเอ็นไซม์ที่มาจากต่อมลูกหมาก (Prostate gland) และมีอยู่ในน้ำอสุจิในปริมาณสูง ได้มีผู้พยายามดัดแปลงวิธีการตรวจสารนี้อย่างง่ายๆ โดยใช้น้ำยาหยดลงไปในสิ่งที่สงสัยว่าจะเป็นคราบอสุจิ ถ้ามี acid phosphatase ปริมาณมากพอจะทำให้เกิดสีขึ้นภายในเวลาที่กำหนด ซึ่งการทดสอบดังกล่าวนี้ให้ผลบวก แสดงว่าสิ่งนั้นน่าจะเป็นคราบอสุจิ

สำหรับคราบที่ติดตามเสื้อผ้าหรือตามที่ต่างๆ เวลานำมาตรวจต้องใช้ก้อนสำลีชื้นป้ายเอามาหรือถ้าเป็นคราบเก่าที่แห้งมาก เวลานำมาตรวจอาจใช้กระดาษกรองสีขาวชุบน้ำกลั้นแล้วนำไปกดทับบริเวณคราบ เพื่อให้คราบละลายติดมาที่กระดาษแล้วจึงตัดกระดาษออกเป็นเศษเล็กๆ นำไปตรวจอีกทีหนึ่ง ในกรณีเช่นนี้ เมื่อหยดน้ำยาลงบนกระดาษ ถ้ามีสาร acid phosphatase ที่กระดาษจะปรากฏสี (สีแดงหรือม่วงแล้วแต่น้ำยาที่ใช้) ให้เห็นที่กระดาษ

3. รามานสเปคโตรสโคปี (Raman Spectroscopy)

3.1 ทฤษฎีว่าด้วยรามาน สเปคโตรสโคปี (Theory of Raman Spectroscopy)

Raman scattering เกิดขึ้นได้โดยใช้ลำแสงโมโนโครมาติกที่มีความเข้มสูง เช่น ลำแสงลำเลเซอร์ (laser beam) ผ่านเข้าไปยังตัวกลางโปร่งแสง แสงส่วนใหญ่จะผ่านทะลุไปได้ แต่จะมีแสงส่ วนน้อยบางส่วนเกิดการกระเจิงไปทุกทิศทางด้วยการชนแบบยืดหยุ่น (elastic collision) แต่มีการชนส่วนน้อยอีกส่วนหนึ่งคือ การชนแบบไม่ยืดหยุ่น (inelastic scattering) ซึ่งมีการเปลี่ยนแปลงความถี่ไปเล็กน้อย เรียกว่า การกระเจิงแบบรามาน (raman scattering)

เมื่อกล่าวถึงปรากฏการณ์ของการเกิดกระเจิง ในกระบวนการกระเจิงนั้น สิ่งที่สำคัญที่จะต้องเน้นคือ การดูดกลืนแสงหรือโฟตอนเริ่มต้น และการให้อิมิสชันของการกระเจิงแบบไม่ยืดหยุ่น เป็นกระบวนการเกิดอย่างต่อเนื่อง ประสิทธิภาพของการเกิดอันตรกิริยานี้ขึ้นอยู่กับอิเล็กตรอนในโมเลกุลถูก รบกวน หรือ distorted ได้ง่ายเพียงใด คุณสมบัติอันนี้เรียกว่า polarizability ถ้า polarizability ของโมเลกุลเปลี่ยนไปในระหว่างการสั่นของโมเลกุล จะมีผลต่อการเกิด raman shifted ของโฟตอนจากการเกิดอันตรกิริยาหรือโฟตอนเริ่มต้นด้วยพลังงาน $h\nu_L$

ดังนั้น โมเลกุลที่ทำ ให้แสงโมโนโครมาติกเกิดการกระเจิงแล้วเกิด Raman shifted lines ได้ โมเลกุลนั้นจะต้องเกิดการสั่นแล้วทำให้ polarizability ของสารนั้นเปลี่ยนไป

3.2 เครื่องรามานสเปคโตรสโคปี (Raman Spectrometer)

องค์ประกอบของเครื่องรามานสเปคโตรมิเตอร์นั้น ส่วนที่สำคัญก็คือ ต้อง มีเครื่องที่จะสามารถวัดแสงที่กระเจิงได้ ซึ่งโดยปกติแล้วเป็นแสงที่มีน้อย ดังนั้นจึงจำเป็นจะต้องหาแหล่งกำเนิดแสงที่ให้ความเข้มสูงๆ อย่างไรก็ตาม เครื่องรามานสเปคโตรมิเตอร์ก็ประกอบด้วยอุปกรณ์หลัก 3 ส่วน คือ

1. แหล่งกำเนิดแสงที่ให้ความเข้มสูง
2. ระบบใส่สารตัวอย่าง (sample illumination system)
3. เครื่องสเปคโตรมิเตอร์ที่เหมาะสม

3.3 ประโยชน์ของการใช้เทคนิครามานสเปคโตรสโคปี

ประโยชน์ของการนำเทคนิคนี้ไปใช้ทางเคมีคือ ใช้เป็นวิวิเคราะห์ทั้งในเชิงคุณภาพและปริมาณ วิเคราะห์สารต่างๆ ทั้งสารอินทรีย์ สารอนินทรีย์ และชีวสาร (biological substances) ซึ่งการวิเคราะห์นี้จะได้ผลออกมาคล้ายกับเทคนิคทางอินฟราเรดสเปคโตรสโคปี ดังนั้น เทคนิคที่ใช้ในการวิเคราะห์จึงสามารถทำได้ในทำนองเดียวกัน คือ ใช้หลักการเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานเพื่อการพิสูจน์ตรวจสอบชนิดของสาร โดยสเปคตรัมจะต้องเหมือนกันถ้าเป็นสารเดียวกัน แต่ถ้าลักษณะของสเปคตรัมไม่เหมือนกัน ก็อาจใช้หาพวกฟังก์ชันนัลกรุ๊ปของโมเลกุลได้โดยเทียบตำแหน่งของแบนด์ในสารตัวอย่างกับ correlation chart หรือตำแหน่งของฟังก์ชันนัลกรุ๊ป

4.งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Raman spectroscopy offers great potential for the nondestructive confirmatory identification of body fluids. ตีพิมพ์ในวารสาร Forensic Science International 181 (2008) e1–e5 โดย Kelly Virkler, Igor K. Lednev

บทคัดย่อ

รามานสเปคโตรสโคปี ถูกใช้ในการเปรียบเทียบสารคัดหลั่งจากร่างกายทั่วๆ ไป ที่พบได้ในสถานที่เกิดเหตุ ที่ไม่ถูกทำลายหลักฐาน วัตถุพยานชนิดแห้งของน้ำอสุจิ น้ำจากช่องคลอด เหงื่อ น้ำลาย และน้ำเลือด ถูกนำไปวิเคราะห์โดยใช้ confocal Raman spectroscopy ที่การกระตุ้น 785 nm. ผลที่แสดงว่า สารคัดหลั่ง 5 ชนิด สามารถแยกจากตัวอื่นๆ โดยการเปลี่ยนแปลงการดูเส้นสเปคตรัมรามาน และแสงเลเซอร์ที่ใช้ไม่ทำลายตัวอย่าง สัญญาณรามานของสารคัดหลั่งแต่ละชนิด มีความจำเพาะและสัมพันธ์กับองค์ประกอบที่รู้ของสารคัดหลั่ง วัตถุพยานแห้งของน้ำอสุจิมนุษย์และสุนัข มีความแตกต่างกันอย่างชัดเจนของสัญญาณรามาน การศึกษาเบื้องต้นนี้ แสดงถึง ประสิทธิภาพ ที่ดีของรามานสเปคโตรสโคปี ที่ไม่ทำลายหลักฐาน ยืนยันการคัดแยกสารคัดหลั่งจากร่างกายตามจุดประสงค์ทางนิติวิทยาศาสตร์ได้

บทที่ 3

วิธีการทดลอง

1.ตัวอย่าง

ชุดตัวอย่าง 50 ตัวอย่างน้ำอสุจิที่ได้มาจากผู้บริจาคที่ไม่ระบุชื่อในคลินิกการทำตัวอ่อน หนึ่งตัวอย่างถูกเลือกโดยการสุ่มนำมาเป็นตัวอย่างพื้นฐานที่ให้ผลสัญญาณสเปคโตรสโคปิก และสัญญาณนี้ต้องพอดีกับตัวอย่างที่มีอยู่เพื่อการเปรียบเทียบ หยดตัวอย่าง 10 µl ลงบนกระจกสไลด์วงกลมที่ถูกออกแบบสำหรับใช้กับ automatic mapping stage และเพื่อให้แห้งอย่างสมบูรณ์ ตัวอย่างถูกวิเคราะห์โดยใช้ automatic mappimg ที่สแกนลงบนตัวอย่าง 75x75 µm และวัดสเปคตรัมรามานจากการสุ่ม 36 จุด จำนวน 6 ครั้งๆละ 10 วินาที สเปคตรัมที่ได้จากตัวอย่างนี้ถูกใช้กำหนดตัวเลขและการแยกที่เป็นไปได้ขององค์ประกอบหลักของน้ำอสุจิ และพัฒนาสัญญาณสเปคโตรสโคปิก ตัวอย่างคราบอสุจิ 50 ตัวอย่างทุกตัวกับตัวอย่างที่ถูกเลือกเป็นพื้นฐานให้ผลที่เหมือนกับที่คาดไว้ ตัวอย่างที่เหลือถูกวัดโดยใช้ automatic mapping ในลักษณะเดียวกัน

2.Raman microscope

ใช้ Renishaw inVia confocal Raman spectrometer ติดตั้งด้วย research-grade Leica microscope, 20x long-range objective (ช่องตัวเลข 0.35) และใช้ WiRE 2.0 software สำหรับ automatic mapping ใช้ lower plate ของ Nanonics AFM MultiView 1000 system ติดตั้งใต้กล้อง และการวัดจะใช้ Quartz II และ QuartzSpec software แสงเลเซอร์ที่ช่วงคลื่น 785 nm. สำหรับการกระตุ้นพลังงานเลเซอร์บนคราบตัวอย่างประมาณ 115 mW. และขนากจุดของลำแสงกระตุ้นกว้างประมาณ 5 µm. ใช้ standard confocality mode เส้นสเปคตรัมประมาณ 3.5 cm^{-1} และเพื่อความเที่ยงตรงแน่นอนของพีค ทำการ calibration ด้วย ซิลิกอนมาตรฐาน

3.Data treatment

ทุกสเปคตรัมได้มาจาก automatic mapping ของตัวอย่างคราบอสุจิ ถูกนำมาใช้กับ GRAMS/AI 7.,01 software ก่อนเพื่อกำจัด cosmic ray ที่รบกวน จากนั้นสเปคตรัมถูกนำเข้าไปใน MATLAB 7.4.0 เพื่อวิเคราะห์สถิติและวิเคราะห์ทั่วไปที่ปรับตัวกับจำนวนที่หลากหลายของการรบกวนจาก background ของแต่ละสเปคตรัม ตัวเลขขององค์ประกอบหลักในตัวอย่างพื้นฐาน ถูกกำหนดโดยใช้ significant factor

analysis (SFA) และ สเปคตรัมองค์ประกอบเฉพาะถูกสกัดโดยใช้ฟังค์ชั่น alternate least squares (ALS) องค์ประกอบที่พบในตัวอย่างพื้นฐานดั้งเดิมถูกใช้ออกแบบสัญญาณสเปคโตรสโคปิก และสัญญาณนี้ถูกทำให้พอดีกับสเปคตรัมเฉลี่ยที่พบจากตัวอย่างน้ำอสุจิที่เหลืออยู่ Curve Fitting Toolbox ใน MATLAB ถูกใช้สำหรับการวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างสเปคตรัมพื้นฐานกับสเปคตรัมจากตัวอย่างและสถิติ “good-of-fit” ถูกนำมาใช้คำนวณความสอดคล้องกันของสัญญาณสเปคตรัมที่ทดลอง

บทที่ 4

ผลการทดลอง

1.วิธีการหลัก

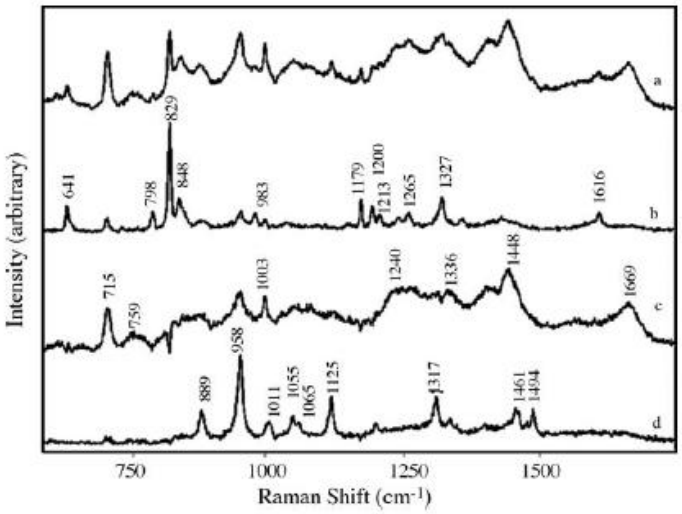
จุดประสงค์หลักของการศึกษานี้เพื่อกำหนดระดับความแตกต่างของสเปคตรัมจากน้ำอสุจิบนพื้นฐานขององค์ประกอบหลัก และค้นหาว่ามีความแตกต่างกันเท่าไหร่ใน สเปคตรัมจากหลายๆ บุคคล ถ้ามีการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อยในสเปคตรัมจากคนหนึ่งไปยังผู้อื่น เมื่อรามานสเปคโตรสโคปี สามารถตัดสินวิธีการเพื่อการคัดแยกตัวอย่างที่เหมือนน้ำอสุจิบนพื้นฐานการประยุกต์การคำนวณสัญญาณสเปคโตรสโคปิกสัญญาณนี้มันจะสอดคล้องกับการเก็บตัวอย่างน้ำอสุจิจากทุกคน องค์ประกอบสเปคตรัมทั่วไปที่พบในอสุจิมันจะแสดงออกมาอย่างหลากหลายตามองค์ประกอบทางเคมีที่หลากหลายในน้ำอสุจิ สัญญาณที่จำเพาะสามารถประมาณการ การพัฒนาสำหรับสารคัดหลั่งชนิดอื่นๆ ที่ถูกพบได้ในการทีเกิดเหตุที่เราไม่รู้ซึ่งจะสามารถคัดแยกและยืนยันได้

2. ตัวอย่างเดียวที่มีความแตกต่างกัน

ตัวอย่างน้ำอสุจิเดียวจากนี้จะเรียกว่า “พื้นฐาน” ถูกใช้พัฒนาสัญญาณสเปคโตรสโคปิกที่ประยุกต์ใช้กับทุกตัวอย่าง สเปคตรัมรามานได้จากการสุ่ม 36 จุกบนตัวอย่างพื้นฐานที่ถูกนำเข้าใน MATLAB และ การวิเคราะห์ SFA ถูกดำเนินการในการกำหนดตัวเลขขององค์ประกอบหลักที่แสดงออกมาผลการวิเคราะห์นี้ (ไม่ได้แสดงข้อมูล) บ่งชี้ 6 องค์ประกอบหลัก ฟังก์ชั่น ALS ถูกประยุกต์ในการสกัดสเปคตรัมของแต่ละองค์ประกอบ และการเพิ่มการทดสอบนี้แสดงผลตามจริงมีเพียง 3 องค์ประกอบจำเพาะที่สเปคตรัมแสดงถึงชนิดของสารเคมีที่อยู่ในตัวอย่างน้ำอสุจิ ส่วนประกอบอื่นๆ อาจจะเป็น background fluorescence องค์ประกอบเทียมของ 1 ใน 3 องค์ประกอบจริง และสัญญาณรบกวน รูป 1 แสดงสเปคตรัมเฉลี่ยของตัวอย่างพื้นฐาน ตาม 3 องค์ประกอบหลัก ช่วงของเลขคลื่นคือ 670-1750 cm^{-1} ถูกแสดงในรูปและจะใช้ออกแบบสัญญาณสเปคโตรสโคปิก เนื่องจากมีบริเวณที่มีลักษณะพีคที่สำคัญที่สุด พีครามานหลักที่อธิบายถึงแต่ละองค์ประกอบถูกรายงานลงในตาราง 1 เป็นข้อมูลรายงานพื้นฐาน

องค์ประกอบสเปคตรัมของน้ำอสุจิที่ซับซ้อนและมีความหลากหลายจากสารเคมีหลายชนิด ตามแหล่งข้อมูล องค์ประก อบทางเคมีบางชนิดของน้ำอสุจิที่แสดงความเข้มข้นสูงสุดคือ fructose, choline, spermine, citric acid, acid phosphatase และ albumin องค์ประกอบสารเคมีอื่นๆ ที่มีจำนวนน้อยคือ

glucose, inositol, lactic acid และ urea ยังมีสารเคมีอีกหลายชนิดในน้ำอสุจิ แต่สำหรับจุด ประสงค์ขององค์ประกอบหลักที่ได้รับมานั้นไม่มีความสำคัญเมื่อความสามารถในการกระเจิงแสงรามานต่ำ มันเป็นสิ่งสำคัญที่กล่าวถึงความจริงที่มีการเปลี่ยนแปลงสารเคมีอย่างไรหลังจาก กระบวนการพุ่งออกอย่างรวดเร็ว ดังนั้นการศึกษาถึงองค์ประกอบยังไม่เป็นที่แน่นอน



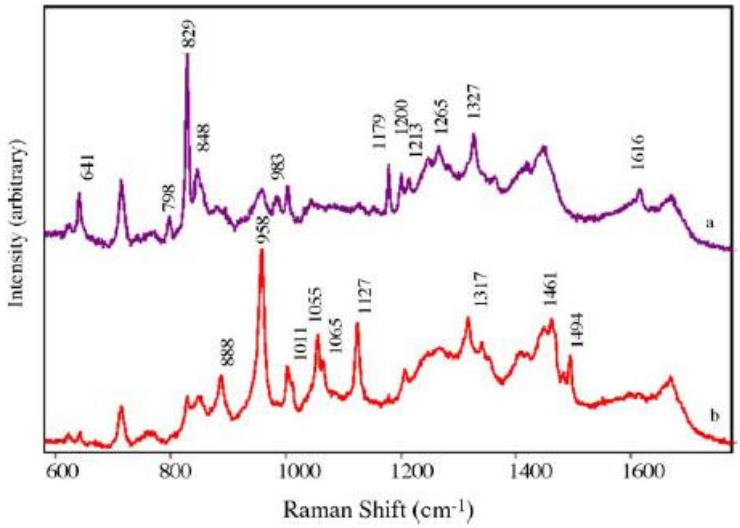
รูปที่ 1 สเปคตรัมรามานเฉลี่ยของตัวอย่างคราบอสุจิพื้นฐาน (a) และสเปคตรัมรามานของสเปคตรัมองค์ประกอบ 1(b) 2 (c) และ 3(d) ของคราบอสุจิที่ระบุพีคหลัก

ตาราง 1 รายละเอียดรามาน ของคราบอสุจิ

Raman shift (cm^{-1})	Spectral component	Vibrational mode
641	1	Ring deformation [62]
715	2	CN stretching [50]
759	2	Ring vibrations (Trp) [63]
798	1	CH_2 deformations in ring [62]
829	1	Ring breathing [39,62]
848	1	Ring bending [62,64]
888	3	Phosphate mode [52]
958	3	PO_4^{3-} sym. stretching [53,65]
983	1	CH_2 wagging [62]
1003	2	Aromatic ring breathing (Phe) [47]
1011	3	CC stretching [52,62]
1055	3	CN sym. stretching [52]
1065	3	PO_4^{3-} asym. stretching [53,65]
1125	3	CN asym. stretching [52]
1179	1	CH_2/NH_3 rocking [62]
1200	1	CC stretching [64]
1213	1	CH_2 twist and rock [62]
1240	2	Amid III [48]
1265	1	Sym. ring deformation [66]
1317	3	CH vibration [62]
1327	1	Ring stretching [62]
1336	2	CH bending (Trp) [40,48]
1448	2	CH_2, CH_3 bend (Trp) [31]
1461	3	CH_2 bending [31]
1494	3	NH_3 sym. bending [53]
1616	1	CC stretching [64]
1668	2	Amid I [48]

ถึงอย่างไรก็ตามรายการที่อ้างถึงของชนิดสารเคมีที่เด่นๆ องค์ประกอบ 1 ถูกแสดงในรูปที่ 1 ซึ่งเกี่ยวข้องกับ amino acid tyrosine พีคแสดงที่ 640, 798, 829, 848, 983, 1179, 1200, 1213, 1265, 1327, และ 1616 cm^{-1} คือพีคที่ชัดเจนที่สุดคล้ายกับพีคที่อธิบายในแหล่งข้อมูลตีพิมพ์ของสเปคตรัมรามานของ tyrosine มีพีคที่เหลือจากสารเคมีชนิดอื่น แต่มี ความเด่นมากในอีก 2 องค์ประกอบที่เหลือ มันน่าประหลาดใจที่ amino acid ตัวเดียว ถูกพบเป็น 1 ในส่วนประกอบสเปคตรัมหลักของคราบอสุจิ แทนที่สารประกอบเคมีซับซ้อน แต่ของ free amino acid ที่รู้ค่าที่มีในน้ำอสุจิ tyrosine เป็น 1 ในสารที่สำคัญและความเข้มข้นของมันจะแสดงเพิ่มขึ้นเมื่อน้ำอสุจิแห้ง วงอะโรมาติก ในพันธะของ tyrosine เป็นส่วนที่ให้สเปคตรัมรามานที่สูง ถึงกระนั้น phosphorylated tyrosine ที่เหลือ ถูกรายงานว่ามีผลในการป้องกันบนเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์อสุจิ และช่วยให้ไขมันเสถียร ดังนั้นความสมบูรณ์ของ tyrosine กับ free amino acid ในน้ำอสุจิเป็นประโยชน์ ท้ ายที่สุด tyrosine phosphorylation เกิดขึ้นเมื่ออสุจิได้รับสิ่งที่จำเป็นก่อนการปฏิสนธิ รายละเอียดนี้เป็นเพียงเบื้องต้นและยังไม่ใช่ข้อสรุป และมันยังต้องการการค้นคว้าเพิ่มเติม

มันเป็นสิ่งที่เด่นชัดเมื่อมองครั้งแรกที่องค์ประกอบที่ 2 คือความเด่นชัดจาก polypeptide backbone ของโปรตีน เนื่องจากการแสดงของ amid I และ amid III มีพีคที่ 1668 และ 1240 cm^{-1} มีรายงานว่าโปรตีนอัลบูมินมีอยู่ประมาณ 1/3 ของโปรตีนทั้งหมดในน้ำอสุจิ อย่างไรก็ตามมีรายละเอียดที่เป็นไปได้ขององค์ประกอบที่ 2 การเปรียบเทียบกับข้อมูลรายงานของสเปคตรัมรามานของอัลบูมินช่วยสนับสนุนข้อสรุปนี้ ซึ่งพีคที่ตรงกันเกิดขึ้นช่วง 759, 1003, 1336 และ 1448 cm^{-1} ซึ่งพีค amid I และ III อ้างถึงไปแล้ว เป็นไปได้ว่าเอนไซม์ acid phosphatase ที่สนับสนุนองค์ประกอบนี้เป็นโปรตีนคุณภาพและมีความสมบูรณ์มากในน้ำอสุจิ แต่ไม่มีข้ อมูลข้อมูลตีพิมพ์มากพอที่จะเปรียบเทียบกัน ดังนั้นรายละเอียดนี้ยังไม่เป็นที่แน่ชัด ในการสืบหาถึงขั้นนี้ การสนับสนุนขององค์ประกอบนี้อาจจะอ้างถึงโปรตีน ท้ายที่สุด choline ที่เกิดขึ้นถูกนำเสนอในองค์ประกอบที่ 2 โดยพีคใหญ่ที่ 715 cm^{-1} เป็นองค์ประกอบของ C-N symmetric stretch ที่พบใน choline ซึ่งเคยมีรายงาน มันเหมือนกับการที่เกิด CH_2 scissoring ใน choline เห็นได้จากพีคที่ 1448 cm^{-1} พีคนี้มีขนาดใหญ่มากในองค์ประกอบที่ 2 ดังนั้นจึงเป้นไปได้ว่าอาจมีสารเคมีมากกว่า 1 ชนิดในองค์ประกอบนี้ เช่นเดียวกับองค์ประกอบที่ 1 ที่มีพีคอื่นๆ แสดงออกอย่างชัดเจนในอีก 2 องค์ประกอบที่เหลือ ดังนั้นพวกเขาไม่พิจารณาความเด่นในองค์ประกอบ 2

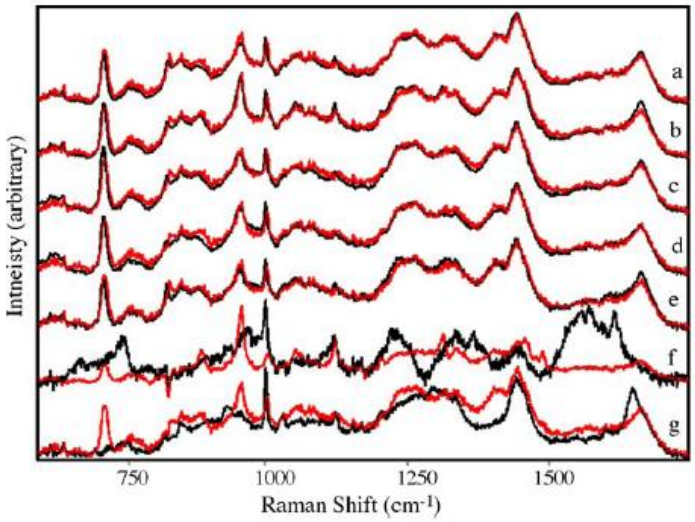


รูปที่ 2 คราบอสุจิที่แตกต่างกันอย่างชัดเจน โดยสเปคตรัมรามานที่เด่นชัดที่ได้จากจุดที่ต่างกันในตัวอย่างเดียวกันของคราบอสุจิ ซึ่งองค์ประกอบ 1 (a) และองค์ประกอบ 3 (b)

องค์ประกอบ 3 ปรากฏตรงข้ามกับองค์ประกอบที่ 1 เมื่อเปรียบเทียบสเปคตรัมจากการเก็บจากบุคคลเดียวกันในตำแหน่งที่ต่างกัน เมื่อพีคที่แสดงในองค์ประกอบ 1 ชัดเจน (ค่าสูง) พีคในองค์ประกอบ 3 จะอ่อน (ค่าต่ำ) (ตามรูปที่ 2) ตัวสนับสนุนทางเคมีขององค์ประกอบ 3 ปรากฏทั่วไปเหมือนกับกรณีขององค์ประกอบ 1 (รูปที่ 1) สเนสเปคตรัมขององค์ประกอบ 3 คือ ส่วนประกอบของ spermine phosphate hexahydrate (SPH) ที่เคยมีรายงานมาแล้ว พีคที่พบในองค์ประกอบ 3 คือ 888, 958, 1011, 1055, 1065, 1125, 1317, 1461 และ 1494 cm^{-1} ทุกค่าที่ปรากฏเป็นสเปคตรัมที่ทราบค่าของ SPH และในรายการตามตาราง 1 ที่ได้จากการสั่น การอ้างถึงในสมัยก่อน spermine พบในความเข้มข้นที่สูงในน้ำอสุจิมนุษย์ และ มันเคยใช้เพื่อการจำแนกน้ำอสุจิทางนิติวิทยาศาสตร์ขั้นพื้นฐานในอดีตด้วย ธรรมชาติพื้นฐานของ spermine มาจากการทำปฏิกิริยากับกลุ่ม phosphoric acid ของ กรดนิวคลิอิก แล้วจับกันด้วยพันธะที่แข็งแรง ซึ่งการจับกันนี้เป็ นตัวนำให้มีการตกตะกอนของ SPH ในน้ำอสุจิ โดยผู้ค้นพบผลึกนี้คนแรกคือ van Leeuwenhoek และพวกเขายังสังเกตในน้ำอสุจิที่เริ่มจากของเหลวไปจนถึงแห้ง คุณสมบัติที่เกี่ยวกับการมีอยู่ของ SPH ในน้ำอสุจิ ทำให้เข้าใจองค์ประกอบที่ 3 แต่ข้อมูลนี้ยังไม่เป็นที่แน่นอนและยังต้องการการศึกษาเพิ่ม เหมือนกับในองค์ประกอบหลักอื่นอีก 2 องค์ประกอบของคราบอสุจิ

3.หลาย ๆ บุคคล

จุดประสงค์ที่ 2 ของการวิจัยในครั้งนี้เป็นการดูความแตกต่างของเส้นสเปกตรัมของน้ำอสุจิจากหลายๆบุคคล ขั้นตอนแรกคือ เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของแต่ละตัวอย่างน้ำอสุจิ ทุกสเปกตรัมที่ตรวจพบมีความคล้ายคลึงกันและพบพีคหลักที่จุดเดียวกัน มีความแตกต่างของความหนาแน่นของพีคในแต่ละตัวอย่าง แต่นั่นก็ได้มีการคาดการณ์ไว้ล่วงหน้าแล้วเนื่อง จากความแตกต่างของสารเคมีจากแต่ละบุคคลแม้จะมาจากบุคคลคนเดียวกันก็ตาม ในภาพที่ 3 แสดงให้เห็นถึง ค่าเฉลี่ยสเปกตรัมของตัวอย่างน้ำอสุจิ 5 ตัวอย่าง (เส้นสีดำ) จากต่างบุคคลกัน เป็นตัวอย่างของความคล้ายคลึงกัน เพื่อแสดงให้เห็นถึงความแตกต่างกันของสเปกตรัมจากสารคัดหลั่งจากร่างกาย สเปกตรัมของเลือดและน้ำลายได้มีการรายงานไว้แล้วดังภาพ มีความแตกต่างกันเพียงเล็กน้อยระหว่างตัวอย่างน้ำอสุจิ แต่ในเลือดและน้ำลายมีพีคหลักที่แตกต่างกันซึ่งสามารถใช้จำแนกได้ รายละเอียดอื่นๆในภาพที่ 3 จะมีการอธิบายในย่อหน้าต่อๆไป



รูปที่ 3 สเปคตรัมรามานเฉลี่ยของตัวอย่างคราบอสุจิ 5 ตัวอย่าง (เส้นสีดำ) กับสัญญาณสเปคโตรสโคปิกที่สอดคล้องกัน (a-e) และสเปคตรัมรามานของเลือด (f) และน้ำลาย (g) กับสัญญาณสเปคโตรสโคปิกที่สอดคล้องกัน

หลังจากการรวบรวมข้อมูลมีความสอดคล้องกันจากสเปคตรัมจของตัวอย่างน้ำอสุจิต่างบุคคลกัน a more quantitative approach was developed สัญญาณสเปคตรัมได้ถูกสร้างขึ้นจากการรวมกันของ 3 องค์ประกอบหลัก จากตัวอย่างน้ำอสุจิพื้นฐาน ในแกนนอนและมีการขีดเส้นที่มีความชันเท่ากับฟลูออกเรสเซนต์แบล็คกราวน์ สเปคตรัม 5 สเปคตรัมเหล่านี้เกือบจะซ้อนทับกันพอดีกับสเปคตรัมของน้ำอสุจิพื้นฐาน และมีสเปคตรัมอีก 2 สเปคตรัมที่ซ้อนทับกันพอดี สัญญาณสเปคโตรสโคปิก ได้ถูกนำมาเปรียบเทียบกับตัวอย่างน้ำอสุจิอีก 49 ตัวอย่าง เพื่อที่จะยืนยันว่าสามารถใช้ได้กับตัวอย่างทั่วไปได้

รูปที่3 แสดงถึงการซ้อนกันของสเปกตรัมอย่างดีของตัวอย่างและตัวอย่างมาตรฐาน และ 2 เส้นที่แสดงด้านท้าย แสดงถึงการซ้อ นกันของสเปกตรัมจากเลือดและน้ำลาย ซึ่งสังเกตได้ว่าซ้อนกันได้ไม่สมบูรณ์เท่าไรนัก จากผลการทดลองเหล่านี้แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพในจำแนกน้ำอสุจิโดยใช้ technique raman

การวิเคราะห์ทางสถิติเชิงปริมาณได้ถูกนำมาใช้เป็นตัวชี้วัดว่าค่าสเปคโตรสโคปิกที่ได้ว่ามีความสอดคล้องกับสัญญาณสเปกตรัมมากเพียงใดโดยใช้ฟังก์ชั่น Curve Fitting Toolbox จากโปรแกรม MATLAB ค่าสเปกตรัมที่ได้และส่วนที่ซ้อนทับกันได้ถูกนำมาวาดลงบนเส้นแกน X Y ตามลำดับ ค่าสเปกตรัมทั้งหมดจะถูกปรับค่าให้อยู่ในช่วงไม่เกิน 1 ทั้งในแกน x และ y ค่าสเปกตรัมที่เหมือนกัน 2 ค่าจะถูกวาดลงบนเส้นตรงแกนกลางที่ x=y ซึ่งจะใช้เส้นกลางนี้ในการเปรียบเทียบความเหมือน / ต่างกันของข้อมูลว่ามากน้อยเพียงใด ผลทางสถิติพบว่ามีค่าเชิงปริมาณ 3 ค่ามีความเกี่ยวเนื่องกันในส่วนของการทดลองและส่วนที่ซ้อนทับกัน (ดังในตารางที่ 2)

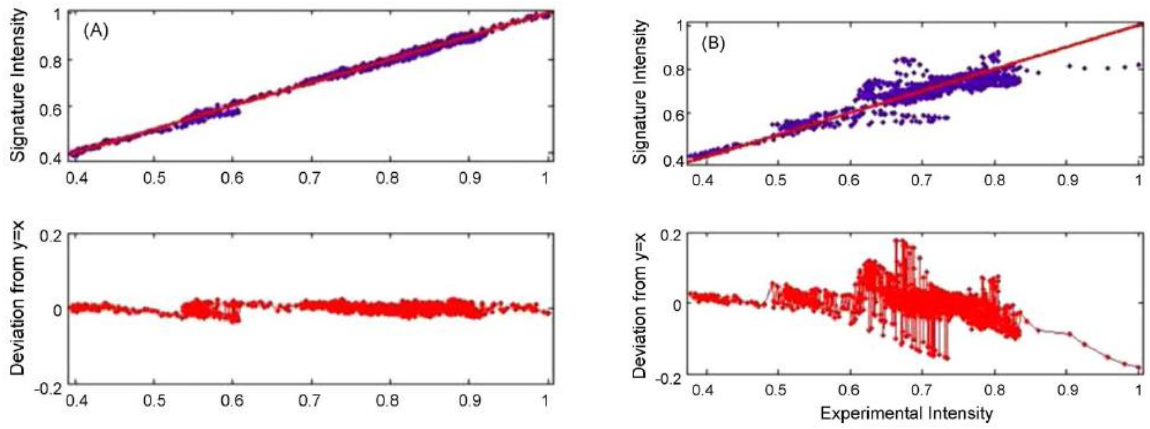
ตารางที่ 2 ผลสถิติ “Goodness-of-fit” สำหรับสัญญาณรามาน

Sample	SSE	*R*-square	RMSE
Semen basis	0.0556	0.998	0.00630
1	0.299	0.990	0.0146
2	0.379	0.982	0.0164
3	0.450	0.979	0.0179
4	0.311	0.981	0.0149
5	0.319	0.979	0.0151
6	0.200	0.992	0.0119
7	0.324	0.987	0.0152
8	0.164	0.996	0.0108
9	0.161	0.992	0.0107
10	0.189	0.989	0.0116
11	0.107	0.996	0.00875
12	0.111	0.995	0.00888
13	0.122	0.995	0.00932
14	0.107	0.996	0.00875
15	0.281	0.987	0.0142
16	0.191	0.991	0.0117
17	0.460	0.984	0.0181
18	0.0645	0.999	0.00678
19	0.251	0.990	0.0134
20	0.0736	0.998	0.00725
21	0.118	0.996	0.00919
22	0.220	0.991	0.0125
23	0.0853	0.998	0.00780
24	0.174	0.993	0.0112
25	0.177	0.993	0.0112
Blood	1.38	0.967	0.0313
Saliva	2.25	0.822	0.0401

ตัวเลขเหล่านี้คือค่า SSE, R-sqaure และ RMES ค่า SSE เป็นตัววัดผลรวมของค่าการเบี่ยงเบนของข้อมูลจากเส้น x=y ยิ่งค่านี้มีค่าใกล้ 0 มากแปลว่ามีค่า random error ยิ่งน้อย ค่า R-sqaure บ่งถึงค่าที่อยู่ใกล้แกน x=y ว่าสามารถบอกถึงความแปรผันได้ดีมากน้อยเพียงใด ยิ่งค่าที่ห่างจาก 0 มากเท่าไร ก็

ยิ่งมีค่าความแปรผันมากเท่านั้น ซึ่งหมายความว่าค่าสเปกตรัมที่ได้จากการทดลองมีความสอดคล้อง กับสัญญาณสเปกตรัม สุดท้ายค่า RMSE เป็นค่าที่ใช้ประมาณส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานจาก random data components ซึ่งค่าที่เข้าใกล้ 0 มากเพียงใดแสดงถึงความเข้ากันของค่าสเปกตรัมที่ได้จากการทดลองกับค่าสัญญาณสเปกตรัม

ดำเนินกระบวนการวิเคราะห์เช่นเดียวกันใน 49 ตัวอย่างที่เหลือผลเชิงกราฟพบว่า 22 ตัวอย่างสามารถซ้อนกันได้สมบูรณ์ดังในภาพที่ 4A กราฟครึ่งบนแสดงถึงความพอดีกับเส้นกลาง x=y เพื่อเปรียบเทียบตัวอย่างกับสัญญาณสเปกตรัม และครึ่งล่างคือ ส่วนที่เหลือเมื่อแยกส่วนของกราฟที่พอดีกันที่สุดออกไปแล้ว ส่วนที่เหลือวาดกราฟจาก ค่ารอบๆ 0 ที่แสดงว่าไม่พอดีกันนักผลของ SSE, R-sqaure และ RMES ของ 25 ตัวอย่างจาก 50 ตัวอย่างแสดงในตารางที่ 2 ตามที่คาดผลพื้นฐานแสดงว่าพอดีกันอย่างมากเนื่องจากมีผลจากสัญญาณสเปกตรัม แต่ผลทางสถิติของตัวอย่างทั้งหมดมีค่าใกล้เคียงกันมากและมีค่าอยู่ในช่วงเดียวกัน เพื่อให้ยืนยันว่ามีการซ้อนทับของกราฟมากขึ้น จะมีการวิเคราะห์ในสเปกตรัมของเลือดและน้ำลายมนุษย์ซึ่งได้มีการรายงานไว้ก่อนหน้านี้แล้ว ผลทางสถิติได้แสดงผลที่ด้านล่างของตารางที่ 2 และเห็นได้ชัดว่าน้ำอสุจิมีความแตกต่างกันอย่างมากกับตัวอย่างที่ทำการวิเคราะห์ทั้ง 2 เมื่อนำมาวิเคราะห์รวมกัน ค่า R-square ของเลือดและน้ำอสุจิมีความแตกต่างกันไม่มาก แต่ค่า SSE และ RMSE กลับมีความแตกต่างกันมาก ผลที่สังเกตได้ของน้ำลายดังแสดงในภาพที่ 4 มีความสม่ำเสมอสอดคล้องกันอย่างมากมายของเส้นและจุดกระจายตรงส่วนบนของกราฟ และเห็นได้ชัดว่ามีค่ากระจายออกจาก 0 มาก



รูปที่ 4 การหาค่าในด้านปริมาณของคุณภาพความพอดี โดยการเปรียบเทียบของเส้น y=x กับสัญญาณที่พอดีของน้ำอสุจิกับตัวอย่างน้ำอสุจิ (A,ด้านบน) พร้อมกับจุดที่เหลือ (A,ด้านล่าง) และสัญญาณที่พอดีของน้ำอสุจิกับตัวอย่างน้ำลาย (B,ด้านบน) พร้อมกับจุดที่เหลือ (B,ด้ายล่าง)

ดังที่แสดงในภาพที่ 3 และ 4 และ ตารางที่ 2 ผลจากค่าสเปกตรัมของน้ำอสุจิแทบจะเหมือนกับสเปกตรัมของอสุจิที่ได้จากการทดลอง และชัดเจนว่าไม่ตรงกับทั้งน้ำลายและเลือด ผลแสดงว่าค่าสเปกตรัมที่ได้จากน้ำอสุจิมาตรฐานสามารถใช้จำแนกน้ำอสุจิโดยรวมได้ เทคนิคนี้จึงสามารถจำแนกน้ำอสุจิออกจากสารคัดหลั่งจากร่างกายชนิดอื่นๆได้

บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

สัญญาณสเปคโตรสโคปิกของน้ำอสุจิมนุษย์ ถูกพัฒนาบนพื้นฐานขององค์ประกอบทางเคมีที่ต่างกันของน้ำอสุจิ โดยใช้ NIR รามานสเปคโตรสโคปี การวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า สเปคตรัมของตัวอย่า ง คราบอสุจิประกอบด้วย 3 องค์ประกอบสเปคตรัมหลัก ส่วนประกอบหนึ่งคือ tyrosine โปรตีนซึ่งก็คือ Choline และ Spermine phosphate hexahydrate (SPH) ผู้วิจัยสาธิตถึงคุณภาพที่การเปลี่ยนแปลงด้วย การมองไม่มีนัยสำคัญในสเปคตรัมรามานของคราบอสุจิที่ได้จากหลายๆ บุคคล และผู้วิ จัยแสดงว่า สเปคตรัมของคราบอสุจิมีความหลากหลายค่อนข้างมากเมื่อเทียบกับ สเปคตรัมของคราบเลือดและ น้ำลาย การรวมกันของ 3 องค์ประกอบหลัก สามารุกใช้ในการบ่งชี้สัญญาณสเปคโตรสโคปีกที่จำเพาะใน การคัดแยกการแสดงของน้ำอสุจิและความเป็นไปได้ในการจำแนกคราบอสุจิออกจากสารคัด หลั่งอื่นๆ และ สารรบกวนตามธรรมชาติที่พบในที่เกิดเหตุ สัญญาณที่จำเพาะของคราบอสุจิ คือ การเพิ่มเสริมโดยการ ประเมินค่าเบื้องต้นว่า 2 ใน 3 องค์ประกอบสเปคตรัมที่ประกอบด้วย Choline และ Spermine และ องค์ประกอบสารเคมีเหล่านี้เป็นองค์ประกอบที่จำเพาะในน้ำอสุจิและมีการ ใช้ในเทคนิคการจำแนกทางนิติ วิทยาศาสตร์สำหรับน้ำอสุจิในอดีต สัญญาณสเปคโตรสโคปิกนี้ พอดีกับตัวอย่างคราบอสุจิทั้งหมดด้วยผล ค่าทางสถิติ goodness-of-fit ที่สูง และผลลัพธ์นี้แสดงความสามารถในการประยุกต์ใช้สัญญาณอย่างไร กับตัวอย่างน้ำอสุจิมนุษย์ที่มีประสิทธิภาพในการคัดแยก

ผู้วิจัยเห็นถึงความเป็นไปได้ในการใช้เทคนิคนี้ที่ไม่มีการทำลายหลักฐานในการจำแนกหาและ ยืนยันการจำแนกคราบอสุจิที่สถานที่เกิดเหตุทั้งที่ได้มาเป็นน้ำบริสุทธิ์และที่ผ่านการย้อม นักนิติ วิทยาศาสตร์ประเมินค่าการคัดแยกจริงๆ ของตัวอย่างอสุจิที่คาดคิดไว้ และมันบ ริสุทธิ์ไม่มีการปนเปื้อน รา มานสเปคโตรมิเตอร์ที่เคลื่อนย้ายได้ มันเริ่มมีการนำมาใช้คัดแยกยาและสารระเบิด มันเป็นมิตรกับผู้ใช้แ ละ การวิเคราะห์สำเร็จโดยไม่ต้องอาศัยองค์ความรู้ของรามานสเปคโตรสโคปี เครื่องมือชนิดนี้สามารถ ประยุกต์ใช้อย่างมีประสิทธิภาพกับการคัดแยกสารคัดหลั่งจากร่างกาย ความสามารถในการใช้เป็นตัวคัด แยกและการสรุปผล โดยเฉพาะอย่างยิ่งในสถานที่เกิดเหตุ ที่เป็นความก้าวหน้าหลักในพื้นที่ของการ วิเคราะห์คราบอสุจิในทางนิติวิทยาศาสตร์ ขอบเขตของการศึกษานี้รวมถึงตัวอย่างที่บริสุทธิ์ใน ห้องปฏิบัติการที่มีการออกแบบควบคุมแสดงผลที่ดี แต่หลายๆตัวอย่างกับข้อมูล demographic ที่รู้ค่า ควร จะมีการค้นคว้าเพิ่มเติม ในการศึกษาตามสภาพจริงนั้นต้องการการดำเนินการที่มีการกำหนดจุดแข็งของ

เทคนิคนี้ เช่น การลดความเข้มข้นของน้ำอสุจิ การรวมหลายๆ ตัวอย่าง และการย้อมสีของสารที่ต่างๆ กัน เทคนิคที่แนะนำในวารสารตีพิมพ์ฉบับนี้แสดงถึงประสิทธิภาพสำหรับสัญญาณรามานสเปคโตรสโคปิกของน้ำอสุจิที่ใช้ในการคัดแยกน้ำอสุจิในที่เกิดเหตุ

การค้นคว้าขั้นต่อไปของตัวอย่างน้ำอสุจิและสารคัดหลั่งชนิดอื่นๆ คือ การแทนที่เพื่อนำมาใช้ ในห้องปฏิบัติการ ผู้วิจัยหวังว่าการพัฒนาสัญญาณสเปคโตรสโคปิกที่จำเพาะของสารคัดหลั่งจากร่างกายอื่นๆ จะสนับสนุนข้อสันนิษฐานที่ว่า สารคัดหลั่งที่แตกต่างกัน สามารถรู้ถึงข้อแตกต่างจากตัวอื่นๆ เมื่อใช้รามานสเปคโตรสโคปี เนื่องจากมันคือข้อยุติขององค์ประกอบของสารเคมี ที่แตกต่างกัน

ผู้วิจัยทำการทดลองกับวิธีวิเคราะห์ทางสถิติขั้นสูง โดยใช้ preincipal component analysis (PCA) ที่ใช้หลักคณิตศาสตร์ เปรียบเทียบกับหลายๆ สเปคตรัมของสารคัดหลั่งที่ต่างกันได้ผลดีเท่ากับสเปคตรัมที่ได้จากสารคัดหลั่งชนิดเดียวกันที่มีความแตกต่างกันของสัตว์

บรรณานุกรม

1.พล.ต.อ. อรรถพล แช่มสุวรรณวงศ์ และคณะ. *นิติวิทยาศาสตร์ เพื่อการสืบสวนสอบสวน เล่ม 2* .พิมพ์ครั้งที่ 4. กรุงเทพฯ 2546

2.รศ.พ.ต.อ. อุทัย ตีระวนินทร, ผศ.พ.ต.ท. หญิง พัชรา สินลอยมา , ร.ต.อ. ธิติ มหาเจริญ. *นิติเวชศาสตร์*

3.แม้น อมรสิทธิ์. หลักการและเทคนิคการวิเคราะห์เชิงเครื่องมือ. พิมพ์ครั้งที่ 1 .กรุงเทพฯ : ห้างหุ้นส่วนจำกัด โรงพิมพ์ชวนพิมพ์, 2534

4. Kelly Virkler, Igor K. Lednev . *Raman spectroscopy offers great potential for the nondestructive confirmatory identification of body fluids*. Forensic Science International 181 (2008) e1–e5

5.J. Thomas, P. Buzzini, G. Massonnet, B. Reedy, C. Roux. *Raman spectroscopy and the forensic analysis of black/grey and blue cotton fibres: Part 1. Investigation of the effects of varying laser wavelength* .Forensic Science International, Volume 152, Issues 2-3, 10 September 2005, Pages 189-197

ภาคผนวก