

นิพนธ์ต้นฉบับ

การวิเคราะห์หาปริมาณเอทานอล ในเลือดโดยแก๊สโครมาโทกราฟี - เอสพีเอ็มอี

จารุวรรณ วิริยะหิรัญไพบูลย์*, จิรพรรณ บุญสูง*

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์: เพื่อพัฒนาวิธีวิเคราะห์เอทานอลในเลือดโดยใช้แก๊สโครมาโทกราฟี - เอสพีเอ็มอี โดยการศึกษาเป็นส่วนหนึ่งของการพัฒนาห้องปฏิบัติการศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์เชียงใหม่ ให้เป็นห้องปฏิบัติการอ้างอิงการตรวจแอลกอฮอล์ในเลือดของประเทศ

วิธีการ: พัฒนาวิธีวิเคราะห์เอทานอลในเลือดโดยใช้แก๊สโครมาโทกราฟี - เอสพีเอ็มอี โดยใช้ คาร์บิลลาร์คอลัมน์และระบบป้อนสารแบบใหม่คือเอสพีเอ็มอี ชนิด 65 μm Carbowax / Divinylbenzene ซึ่งทำหน้าที่เป็นระบบเตรียมตัวอย่างและทำให้ตัวอย่างเข้มข้นในเวลาเดียวกัน ทำการวิเคราะห์สารมาตรฐาน เอทานอลที่เป็นวัสดุอ้างอิงรับรองเพื่อแสดงสมรรถนะของวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้น

ผลการศึกษา: พบว่าวิธีวิเคราะห์นี้มีช่วงเส้นตรงของกราฟมาตรฐานระหว่าง 23.94 ถึง 405.41 มิลลิกรัมเปอร์เซ็นต์ มีค่าสัมประสิทธิ์ของความแปรปรวนของความเที่ยงระหว่าง 0.3 ถึง 2.4 ค่าร้อยละของการวิเคราะห์กลับคืนระหว่าง 99.5 ถึง 102.8 และค่าต่ำสุดที่วิเคราะห์ได้และค่าต่ำสุดที่วิเคราะห์ปริมาณเป็น 3.4 และ 9.5 มิลลิกรัมเปอร์เซ็นต์ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าวิธีวิเคราะห์นี้ไม่ถูกรบกวนด้วยอะเซตาดีไฮด์และแอลกอฮอล์อื่นๆ

สรุป: ผลจากการศึกษานี้บ่งชี้ว่าวิธีวิเคราะห์นี้ง่าย สะดวก ใช้เวลาน้อย มีสมรรถนะสูง และสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจยืนยันและใช้ในงานประจำทางพิษวิทยาวิเคราะห์ได้

คำรหัส : แอลกอฮอล์ในเลือด แก๊สโครมาโทกราฟี เอสพีเอ็มอี

* ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์เชียงใหม่ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข

Abstract: Determination of Ethanol in Blood by Gas Chromatograph - SPME**Viriyahirunpiboon J*, Bunsoong J***

Objective: To develop a reliable analytical method for blood alcohol determination. This study was conducted as a part of activities to improve the Regional Medical Sciences Center, Chiang Mai to be the blood alcohol reference laboratory of Thailand.

Method: The GC-SPME was developed to verify a reliable analytical method for blood alcohol determination. The study was carried out by using capillary column and a new sample inlet system, SPME: 65 μ m carbowax / divinylbenzene, which acted as sample preparation and concentration unit as well and using certified reference materials ethanol in water to verify the method.

Result: It was found that linearity was verified in the range of 23.94 to 405.41 mg%, a repeatability and a reproducibility of the test resulted in coefficient of variation range from 0.3 to 2.4% and recovery range from 99.5 to 102.8%. The limit of detection and limit of quantitation of the method were 3.4 and 9.5 mg%, respectively. There was no interference from acetaldehyde and other alcohols. Ethanol measured by this method is easy, simple, less time consumed and highly reliable.

Conclusion: The obtained result suggested that the used of gas chromatograph - SPME could be extended from confirmatory analysis to routine application in analytical toxicology.

Key words : Blood alcohol, GC, SPME

*Regional Medical Sciences Center, Chiang Mai. Department of Medical Sciences , Ministry of Public Health.

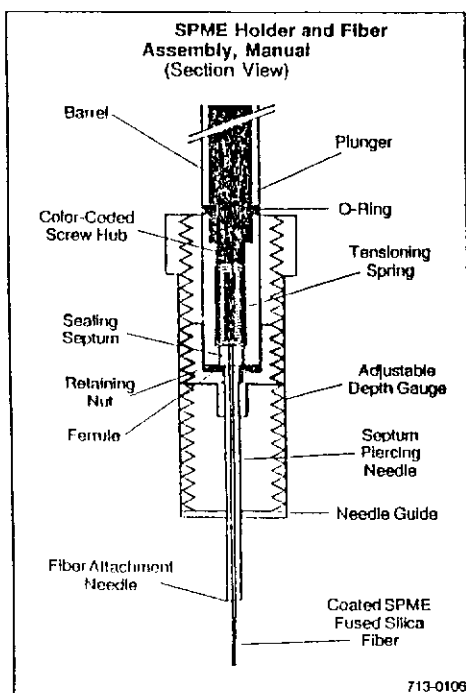
บทนำ

เทคนิคที่นิยมใช้ในการตรวจแอลกอฮอล์ในเลือดมีหลายเทคนิคเช่น เทคนิคที่อาศัยหลักการของ Chemical reduction หรือ Oxidation^{1,2,3} และแก๊สโครมาโทกราฟี^{4,5,6} ในส่วนของแก๊สโครมาโทกราฟีซึ่งจัดเป็นวิธีที่ยอมรับ (Official Recognized Method)⁷ นั้น ได้มีการพัฒนาประสิทธิภาพโดย

เฉพาะในส่วนของระบบป้อนสารเข้าสู่เครื่องมาเป็นลำดับ จนถึงปัจจุบันได้นำ Solid Phase Micro Extraction (SPME) มาใช้^{8,9,10}

SPME เป็นอุปกรณ์ที่ประกอบด้วย Fused silica fiber ที่มี Stationary phase ชนิดต่างๆ อยู่ทีปลายเข็มของ SPME ดังแสดงในภาพที่ 1 โดย Fiber นี้จะทำหน้าที่ดูดซับ (Absorb) สารที่

ต้องการวิเคราะห์ไว้ เมื่อนำสารเข้าสู่ระบบก็ทำได้โดยการทำให้สารนั้นถูกปล่อยออกมา (Desorb) โดยใช้ความร้อน ดังนั้นนอกจาก SPME จะทำหน้าที่เป็นระบบนำสารเข้าสู่เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟแล้ว ยังทำหน้าที่เป็นตัวเตรียมตัวอย่างและทำให้ตัวอย่างเข้มข้นขึ้นในขณะเดียวกัน^{9,10} นับเป็นเทคโนโลยีที่ได้รับความสนใจอย่างสูงในหมู่นักวิเคราะห์ เนื่องจากใช้เวลาน้อย สะดวก ไม่จำเป็นต้องใช้ตัวทำละลาย ราคาไม่แพง สามารถทำเป็นระบบอัตโนมัติได้ ใช้ได้กับตัวอย่างที่เป็นแก๊สและของเหลวได้ดี มีค่า Linear dynamic range กว้างและมี Detection limit ดี¹⁰ จนอาจกล่าวได้ว่า SPME เป็นระบบป้อนสารเข้าเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟตามอุดมคติ



ภาพที่ 1 แสดงองค์ประกอบของ SPME

ด้วยเทคโนโลยีที่ทันสมัยในปัจจุบัน โครมาโทกราฟก็สามารถเพิ่มสมรรถนะการแยกของสารที่สนใจได้หลายวิธี เช่น การเพิ่มความยาวของคอลัมน์ซึ่งอาจยาวถึง 100 ม. หรือการเลือกกลีควิดเฟส

ซึ่งทำหน้าที่เป็น Stationary phase ที่มีประจุ (Polarity) แตกต่างกันในการผลิตคอลัมน์ ทั้งที่เป็นแพคคอลัมน์ (Packed column) และคาพิลลารีคอลัมน์¹¹ ซึ่งผู้สนใจสามารถเลือกใช้ได้อย่างกว้างขวาง

เนื่องจากเอทานอลเกิดจากการหมักธัญพืช มีคุณสมบัติละลายน้ำได้ดี¹² ไม่สะสมในร่างกายสิ่งมีชีวิต ดังนั้นองค์ประกอบทางเคมีต่างๆ ในชีวิตวัตถุไม่ว่าจะเป็นในเลือด ในปัสสาวะหรือในเนื้อเยื่อต่างๆ จึงไม่มีผลกระทบต่อการทำงานของวิเคราะห์หาปริมาณเอทานอลที่บริโภค ดังนั้นการพัฒนายวิธีวิเคราะห์แอลกอฮอล์ในเลือดโดยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟซึ่งมีระบบป้อนสารแบบ SPME นี้ จึงศึกษาโดยการตรวจวิเคราะห์เอทานอลซึ่งจัดเตรียมเป็น Certified Reference Materials (CRM) ในการแสดงสมรรถนะของวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้น¹³ ทั้งนี้กลุ่มงานพิษวิทยา ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์เชียงใหม่ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ มีวัตถุประสงค์หลักในการพัฒนาห้องปฏิบัติการตรวจแอลกอฮอล์ของศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์เชียงใหม่ให้ได้มาตรฐานสากลเพื่อเป็นห้องปฏิบัติการอ้างอิง และเพื่อขยายและพัฒนาเครือข่ายห้องปฏิบัติการตรวจแอลกอฮอล์ในเลือดให้มีคุณภาพและประสิทธิภาพให้ครอบคลุมทั่วประเทศ เป็นการสนับสนุนการป้องกันและแก้ไขปัญหายาเสพติดที่เกี่ยวข้องกับสุรา ซึ่งมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นและทวีความรุนแรงขึ้น¹⁴ จนกลายมาเป็นปัญหาสาธารณสุขและปัญหาสังคมที่สำคัญปัญหาหนึ่งที่มีผลกระทบต่อคุณภาพชีวิตของคนไทยในปัจจุบัน

วัสดุและวิธีการ

สารเคมีและสารมาตรฐาน

2.5% v/v Isopropanol ซึ่งใช้เป็น Internal

standard เตรียมโดยปิเปต Isopropanol (AR, Merck Co.) จำนวน 5 มล. ใส่ใน Volumetric flask แล้วปรับปริมาตรเป็น 2000 มล. ด้วยน้ำ Milli Q จากนั้นนำสารละลายที่ได้แบ่งใส่ขวดขนาด 10 มล. ปิดด้วยจุกยางและครอบด้วยฝาอะลูมิเนียมพร้อมติดฉลากแสดงรายละเอียดต่างๆ เช่น ชนิดและความเข้มข้นของสารและวันที่เตรียม เป็นต้น

สารมาตรฐานเอทานอลใช้ Certified Reference Material ของ College of American Pathologist, Catalogue No. ST 002, ST010, ST011, ST017, ST018 และ ST019 ความเข้มข้น 23.94, 40.18, 49.81, 100.723, 196.87 และ 303.97 มิลลิกรัมเปอร์เซ็นต์ตามลำดับ และของ National Institute of Standards and Technology, Catalogue No. SRM 1828a โดยนำความเข้มข้น 2,003 มิลลิกรัมเปอร์เซ็นต์มาเจือจางแล้วหาค่าที่แน่นอนเทียบกับสารมาตรฐานของ College of American Pathologist ซึ่งได้ค่าความเข้มข้นของเอทานอลเท่ากับ 405.41 มิลลิกรัมเปอร์เซ็นต์

เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟีชนิด Capillary column ซึ่งมีหน่วยตรวจวัดชนิด Flame Ionization Detector (FID) รุ่น Star 3400CX พร้อม Autosampler รุ่น 8200CX ซึ่งควบคุมการทำงานด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป Star Workstation Version 4.5 ของบริษัท Varian สำหรับ SPME fiber ใช้ Stationary phase ชนิด 65 μm Carbowax / divinylbenzene ของบริษัท Supelco ส่วน Sample vial ใช้ขนาด 2 มิลลิลิตร ของบริษัท Varian และใช้ Micropipette ขนาด 100 ไมโครลิตร รุ่น Micro / Pette ของบริษัท SMI ส่วน Column ใช้ Rtx® Volatile ขนาด 30 ม. x 0.53 มม. ซึ่งมีความหนา

ของฟิล์มที่เคลือบ 2 μm ของบริษัท Restek

ภาวะของเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี

ภาวะของเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟีที่นำมาใช้สำหรับตรวจวิเคราะห์คืออุณหภูมิของ Injector oven และ Detector เท่ากับ 210, 65 และ 220 องศาเซลเซียสตามลำดับ โดยใช้อัตราไหลของแก๊สไนโตรเจน ไฮโดรเจนและอากาศเป็น 40, 25 และ 250 มิลลิลิตรต่อนาที ตามลำดับ ตั้ง Split ratio เป็น 20 ต่อ 1 ส่วน Autosampler ตั้งเวลาในการ Absorb และ Desorb เป็น 3 และ 1.3 นาที ตามลำดับ และเลือกการเตรียมตัวอย่างของ SPME แบบ Headspace / Agitate

วิธีเตรียมตัวอย่าง

การศึกษานี้ใช้สารมาตรฐานเอทานอลหรือสารมาตรฐานแอลกอฮอล์ชนิดอื่นๆ หรือเลือดที่ปราศจากแอลกอฮอล์เป็นตัวอย่าง ตามลักษณะของพารามิเตอร์ต่างๆ ของการตรวจวิเคราะห์ การเตรียมตัวอย่างทำโดยการปิเปตสารมาตรฐานหรือเลือด และ Internal standard อย่างละ 100 ไมโครลิตรใส่ Sample vial ปิดฝาให้สนิท ก่อนนำไปตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี

การศึกษาสมรรถนะของวิธีวิเคราะห์

โดยการศึกษาพารามิเตอร์ต่างๆ ดังต่อไปนี้
ความถูกต้อง (Accuracy) ศึกษาโดยการตรวจหาค่าวิเคราะห์ที่กลับคืน (% Recovery) ของสารมาตรฐานเอทานอลที่มีความเข้มข้นต่างๆ ความเข้มข้นละ 10 ครั้ง

ความเที่ยง (Precision) ศึกษาความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์ในสองลักษณะ คือ Within run precision โดยการตรวจวิเคราะห์สารมาตรฐานเอทานอลที่มีความเข้มข้นต่างๆ ความเข้มข้นละ 10

ครั้ง และ Between run precision โดยการตรวจวิเคราะห์สารมาตรฐานเอทานอลที่ความเข้มข้นเดียวกัน จำนวน 8 ครั้ง ต่อเนื่องกัน

ความจำเพาะ (Specificity) ศึกษาโดยการตรวจวิเคราะห์สารละลายผสมของแอลกอฮอล์ชนิดต่าง ๆ ดังนี้ Methanol, Ethanol, Acetaldehyde, Isopropanol, 2-butanol, Tert-butanol, i-butanol และ n-butanol ซึ่งมีความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมเปอร์เซ็นต์

ความเป็นเส้นตรง (Linear range) ศึกษาโดยการตรวจวิเคราะห์สารมาตรฐานเอทานอลความเข้มข้นระหว่าง 23.94 ถึง 405.41 มิลลิกรัมเปอร์เซ็นต์ โดยตรวจวิเคราะห์ความเข้มข้นละสองครั้งแล้วนำมาสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างสัญญาณที่ตอบสนองจากเครื่องและความเข้มข้นของสารมาตรฐาน โดยให้โปรแกรมสำเร็จรูปที่ควบคุมการทำงานคำนวณแบบใช้ Internal standard และสร้างกราฟมาตรฐานแบบผ่านจุดกำเนิด

ค่าต่ำสุดที่วิเคราะห์ได้ (Limit of detection, LOD) และปริมาณต่ำสุดที่วิเคราะห์ได้ (Limit of quantitation, LOQ) หารตามนิยามของ American Chemical Society(15) โดยการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างเลือดที่ไม่มีแอลกอฮอล์อยู่ จำนวน 10 ครั้ง แล้วนำมาคำนวณหาค่า LOD และ LOQ โดยนำค่าเฉลี่ยของ สัญญาณที่ตรวจวัดได้บวกด้วย 3 และ 10 เท่าของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าที่ตรวจวัดได้ตามลำดับ

การควบคุมคุณภาพ

ตรวจสอบระบบโดยการตรวจวิเคราะห์ Blank และ QC sample ทุก ๆ 10 ครั้งของการฉีดป้อนสารเข้าสู่ระบบ (10 injections) และเมื่อสิ้นสุดการตรวจวิเคราะห์ ซึ่งตัวอย่าง Blank จะต้องพบค่าเอทานอลน้อยกว่า 2 มิลลิกรัมเปอร์เซ็นต์ และ QC

sample จะต้องพบค่าไม่เกิน $\pm 5\%$ ของค่าที่ระบุ และห้องปฏิบัติการยังเข้าร่วมกิจกรรมการทดสอบความชำนาญการตรวจแอลกอฮอล์ในเลือดกับ Department of Transportation ของสหรัฐอเมริกา มาตั้งแต่ พ.ศ. 2539

ผลการทดลอง

วิธีวิเคราะห์เอทานอลในเลือดโดยแก๊สโครมาโทกราฟแบบคาพิลลารีคอลัมน์ ซึ่งมีระบบป้อนสารเป็น SPME ชนิด 65 μm Carbowax/Divinylbenzene นี้ เอทานอลมี Retention time ประมาณ 1 นาที มีค่าร้อยละของการวิเคราะห์กลับคืนระหว่าง 99.5 ถึง 102.8 ดังแสดงในตารางที่ 1 และสัมประสิทธิ์ของความแปรปรวนระหว่าง 0.3 ถึง 2.4 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในตารางที่ 2 วิธีการนี้ไม่ถูกรบกวนโดยอะเซตาลดีไฮด์และแอลกอฮอล์อื่นๆ แต่ไม่สามารถแยกอะเซตาลดีไฮด์กับเมทานอลได้ เนื่องจากทั้งเมทานอลและอะเซตาลดีไฮด์มี Retention time ประมาณ 0.9 นาที ดังแสดงในภาพที่ 2 ช่วงเส้นตรงของกราฟมาตรฐานของเอทานอลมีค่าระหว่าง 23.94 ถึง 405.41 มิลลิกรัมเปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในภาพที่ 3 และมีค่าต่ำสุดที่วิเคราะห์ได้ (LOD) และปริมาณต่ำสุดที่วิเคราะห์ได้ (LOQ) เป็น 3.4 และ 9.5 มิลลิกรัมเปอร์เซ็นต์ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าการตรวจวิเคราะห์เอทานอลโดยวิธีการนี้ใช้เวลาเพียง 5 นาทีต่อตัวอย่าง และสามารถวิเคราะห์ตัวอย่างแบบต่อเนื่อง (Continuously) ได้อีกด้วย

วิจารณ์

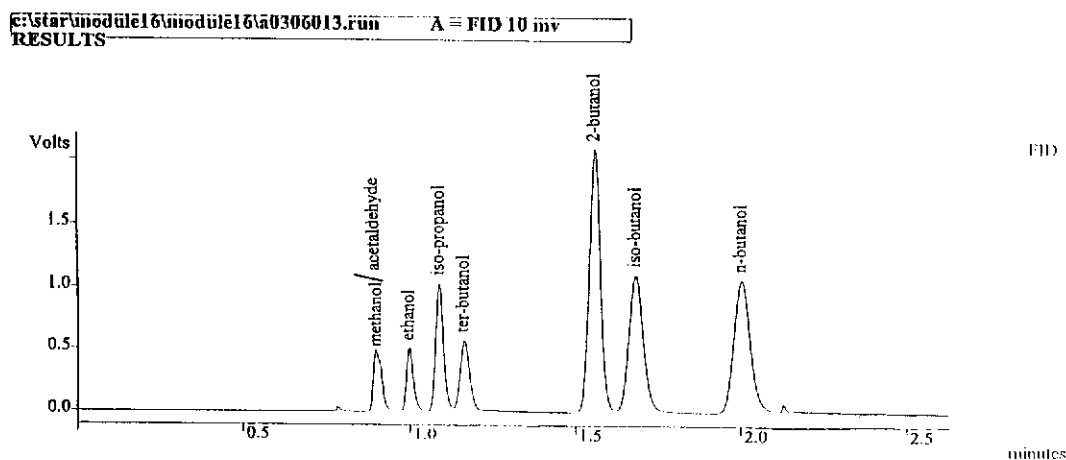
ผลการทดสอบสมรรถนะของวิธีวิเคราะห์นี้ ซึ่งศึกษาโดยใช้ Certified Reference Material ของเอทานอลพบว่าให้ร้อยละของการวิเคราะห์กลับคืนระหว่าง 99.5 ถึง 102.8 แสดงว่าวิธี

ตารางที่ 1 แสดงค่าร้อยละของการวิเคราะห์ที่กลับคืนของการตรวจวิเคราะห์เอทานอลด้วย GC - SPME

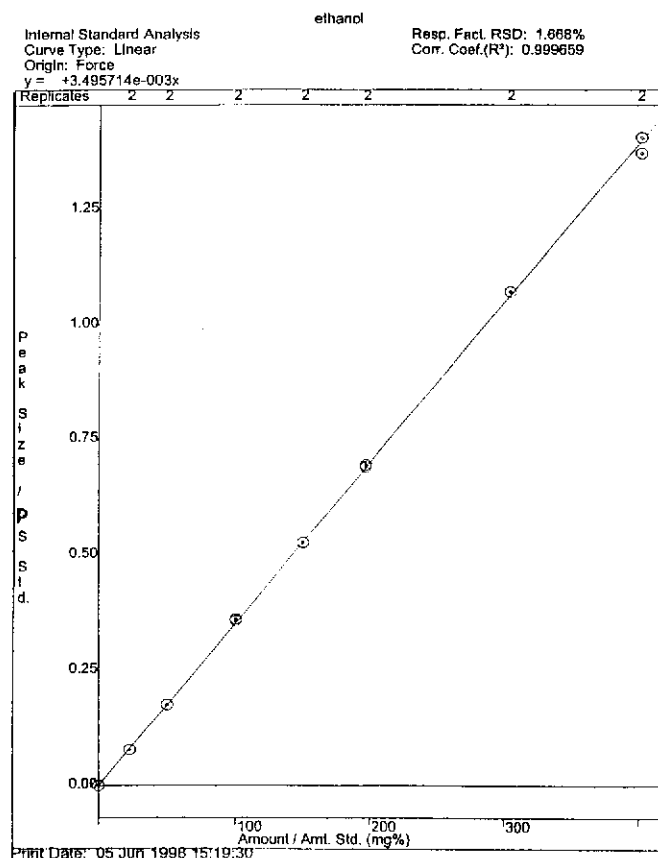
Ethanol mg%	Quantity measured (n=10) $\bar{x} \pm SD$ (mg%)	% Recovery
40.18	41.30 $\pm$ 1.00	102.8
49.81	49.58 $\pm$ 0.18	99.5
100.723	102.55 $\pm$ 1.25	101.8
196.87	195.61 $\pm$ 3.44	99.4
303.97	309.09 $\pm$ 1.08	101.7
405.41	406.48 $\pm$ 2.04	100.3

ตารางที่ 2 แสดงค่าความเที่ยงของการตรวจวิเคราะห์เอทานอลด้วย GC - SPME

Ethanol mg%	Within Run Precision (n=10)		Between Run Precision (n=8)	
	$\bar{x} \pm SD$ (mg%)	%CV	$\bar{x} \pm SD$ (mg%)	%CV
40.18	41.30 $\pm$ 1.00	2.4	41.48 $\pm$ 0.88	2.1
100.723	102.55 $\pm$ 1.25	1.2	101.94 $\pm$ 1.15	1.1
196.87	195.61 $\pm$ 3.44	1.8	200.12 $\pm$ 2.14	1.1
303.97	309.09 $\pm$ 1.08	0.3	308.72 $\pm$ 2.70	0.9
405.41	406.48 $\pm$ 2.04	0.5	410.18 $\pm$ 2.84	0.7



ภาพที่ 2 แสดงรายละเอียดต่างๆของโครมาโทแกรมของอะเซตัลดีไฮด์และแอลกอฮอล์อื่นๆ



ภาพที่ 3 กราฟมาตรฐานของการตรวจวิเคราะห์เอทานอลด้วย GC - SPME

วิเคราะห์นี้มีความแม่นยำและความถูกต้องสูง โดยเฉพาะหากนำผลวิเคราะห์ที่ได้จากการวิเคราะห์สารมาตรฐานเอทานอลความเข้มข้น 49.81 มิลลิกรัมเปอร์เซ็นต์มาทดสอบทางสถิติโดยใช้ Student-t-test พบว่า ผลที่ได้ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 99.7 เปอร์เซ็นต์ จึงอาจกล่าวได้ว่า วิธีวิเคราะห์นี้ไม่มีอคติของการตรวจวิเคราะห์ปริมาณเอทานอลที่ 50 มิลลิกรัมเปอร์เซ็นต์ ซึ่งกฎหมายกำหนดว่า หากตรวจพบเอทานอลในเลือดเกินกว่าปริมาณนี้ถือว่าเมาสุรา¹⁶

วิธีวิเคราะห์เอทานอลที่พัฒนานี้ให้ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของ Within run precision และ

Between run precision ไม่เกิน 3.44 ซึ่งแสดงว่าวิธีวิเคราะห์นี้มี Repeatability และ Reproducibility ดี จึงกล่าวได้ว่าวิธีการนี้มี Random error ต่ำ หรือหากพิจารณาจากค่าสัมประสิทธิ์ของความแปรปรวน ซึ่งพบว่าที่ความเข้มข้นเอทานอลต่ำจะมีค่าสัมประสิทธิ์ของความแปรปรวนสูงกว่าที่ความเข้มข้นสูง ซึ่งแสดงว่าหากใช้วิธีวิเคราะห์นี้ตรวจวิเคราะห์ปริมาณเอทานอลที่มีปริมาณยิ่งใกล้เคียงกับค่าต่ำสุดที่ตรวจได้และค่าต่ำสุดที่วิเคราะห์ได้จะยังมี Relative error มากขึ้น ทั้งนี้เนื่องจากธรรมชาติของวิธีวิเคราะห์ทางเคมีทั่วไปที่หากปริมาณสารที่สนใจมีปริมาณน้อยจะยังมีความคลาดเคลื่อนในการตรวจวิเคราะห์ปริมาณมากขึ้น

เท่านั้น¹⁷

วิธีการนี้สามารถแยกอะเซตาลดีไฮด์ซึ่งเป็นเมตาโบไลต์ของเอทานอล และแอลกอฮอล์ที่มีจำนวนคาร์บอนในสูตรโครงสร้างหนึ่งถึงสี่ได้อย่างสมบูรณ์ จึงกล่าวได้ว่าวิธีวิเคราะห์นี้มีความจำเพาะสูงกับการตรวจเอทานอล อย่างไรก็ตามวิธีวิเคราะห์นี้ไม่สามารถแยกอะเซตาลดีไฮด์จากเมทานอลได้เนื่องจากเกิด Coelution ซึ่งสามารถสังเกตได้จากโครมาโทแกรม ดังนั้นหากต้องการแยกสารทั้งสองอาจทำได้โดยการเพิ่มความยาวของคอลัมน์หรือเพิ่มความหนาของฟิล์มเฟสที่เคลือบผิวของคาพิลลารี คอลัมน์หรือเลือกใช้คอลัมน์ที่มีประจุ (Polarity) สูงขึ้น เช่น Rt^x-1 และ DB-1 เป็นต้น นอกจากนี้แล้ววิธีการที่พัฒนาขึ้นนี้ยังใช้ระยะเวลาในการตรวจวิเคราะห์เพียง 5 นาทีต่อตัวอย่าง ซึ่งใช้เวลาน้อยกว่าระบบป้อนสารแบบ Static headspace ซึ่งจำเป็นต้องใช้ระยะเวลาพอสมควรในการทำให้เกิดสมดุลระหว่างส่วนที่เป็นของเหลวและแก๊สก่อนนำสารตัวอย่างเข้าสู่ระบบ นอกจากนี้การ Absorb สารที่สนใจไม่จำเป็นต้องรอให้ถึงสมดุล^{18,19} และสามารถ Adsorb ขณะที่เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟีกำลังตรวจแยกสารที่สนใจ (Prep ahead) ได้อีกด้วย ทำให้สามารถทำการตรวจวิเคราะห์ได้อย่างต่อเนื่อง ทำให้ประหยัดเวลาในการตรวจวิเคราะห์ยิ่งขึ้น จึงเหมาะกับห้องปฏิบัติการที่มีจำนวนตัวอย่างมากๆ อีกทั้งยังสามารถนำไปประยุกต์ใช้กับการตรวจวิเคราะห์สารอื่นๆ โดยการเลือกใช้ SPME fiber ที่มี Stationary phase ที่เหมาะสมกับสารที่นำสนใจ ซึ่งแสดงว่าวิธีวิเคราะห์นี้มีสมรรถนะสูง

Linear range ของวิธีการนี้ ซึ่งนำเสนอในรูปแบบของกราฟมาตรฐานแสดงให้เห็นว่าวิธีการนี้สามารถตรวจหาปริมาณเอทานอลได้สูงสุดถึง 405.41 มิลลิกรัมเปอร์เซ็นต์ โดยมีค่าสัมประสิทธิ์

สหสัมพันธ์เท่ากับ 0.999657 ซึ่งครอบคลุมช่วงการตรวจวิเคราะห์ปริมาณเอทานอลในเลือดทั้งทางคลินิกและนิติเวชทั่วไป ซึ่งปกติแล้วหากผู้ป่วยโรคมีปริมาณเอทานอลในเลือดมากกว่า 400 มิลลิกรัมเปอร์เซ็นต์มักจะหมดสติมีอาการโคม่าหรือเสียชีวิตได้¹²

ปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อประสิทธิภาพของ SPME ซึ่งทำหน้าที่เป็นทั้งระบบป้อนสารเข้าสู่เครื่องมือวิเคราะห์และเป็นระบบเตรียมตัวอย่างได้แก่ การเลือกชนิด Stationary phase ที่ปลายเข็ม SPME ให้เหมาะสมกับสารที่ต้องการจะตรวจวิเคราะห์ ซึ่งสามารถศึกษาข้อมูลจากคู่มือการใช้ทั่วไป การใช้ระยะเวลาในการ Adsorb น้อยเกินไปจะทำให้ความไวของการตรวจวิเคราะห์ต่ำ ส่วนการใช้เวลาในการ Desorb น้อยเกินไป จะทำให้สารที่สนใจตกค้างอยู่ที่ Fiber ทำให้ผลวิเคราะห์ผิดพลาด แต่หากใช้เวลาในการ Desorb นานเกินไปก็จะทำให้ Stationary phase ของ Fiber ถูกทำลายทำให้อายุการใช้งานของ Fiber สั้นลง นอกจากนี้แล้ว ปริมาณสารที่สนใจในตัวอย่อย่างก็มีผลต่อประสิทธิภาพ กล่าวคือ หากมีปริมาณสารที่สนใจมากเกินไปความสามารถของ Stationary phase ของ Fiber จะ Adsorb ได้ จะทำให้ Fiber ไม่สามารถ Adsorb สารไว้ได้หมด ทำให้ผลการตรวจวิเคราะห์ต่ำกว่าที่เป็นจริง^{9,10,18,19}

เนื่องจาก SPME fiber เป็น Stationary phase ที่มีราคาค่อนข้างแพงและมีอายุการใช้งานจำกัดในการใช้งานหากปฏิบัติตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิตแล้ว บริษัทรับรองว่าจะสามารถใช้งานได้ไม่น้อยกว่า 100 ครั้ง แต่จากการศึกษาของศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ เชียงใหม่ ซึ่งใช้ 65 μ m Carbowax / Divinylbenzene ในการตรวจหาแอลกอฮอล์ในเลือดตามวิธีการที่พัฒนาขึ้นนี้ พบว่าสามารถใช้งานได้มากกว่า 400 ครั้ง ทำให้

สามารถประหยัดทั้งงบประมาณและเวลาในการตรวจวิเคราะห์เมื่อเปรียบเทียบกับ การตรวจวิเคราะห์โดยใช้โครมาโทกราฟีเทคนิคอื่นๆ

สรุป

วิธีวิเคราะห์เอทานอลในเลือดโดยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟีที่มีระบบป้อนสารแบบ SPME ที่พัฒนาขึ้นนี้ เป็นวิธีวิเคราะห์ที่มีสมรรถนะสูงในการตรวจวิเคราะห์เอทานอลทั้งในด้านความถูกต้อง แม่นยำ ความเที่ยง ความไว มีความจำเพาะกับเอทานอล และใช้เวลาในการตรวจวิเคราะห์น้อยจนอาจกล่าวได้ว่า วิธีวิเคราะห์นี้เป็นวิธีตรวจวิเคราะห์เอทานอลตามอุดมคติ ทั้งยังสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในงานตรวจประจำวัน และการตรวจวิเคราะห์ทางพิษวิทยาอื่นๆ ได้อีกด้วย

เอกสารอ้างอิง

- Curry A. Poison detection in human organs. 2 nd ed. Springfield : Charles C Thomas, 1969: 35-40.
- Redetzki HM, Dees WL. Comparison of four kits for enzymatic determination of ethanol in blood. Clin Chem 1976; 22: 83-6.
- Jortani SA, Poklis A. Evaluation of the Syva ETS(r) Plus urine drug and serum ethanol analyzer. J Anal Tox 1993; 17: 31-3.
- Penton Z. Headspace measurement of ethanol in blood by gas chromatography with a modified autosampler. Clin Chem 1985; 31: 439-41.
- Tagliaro F, Lubli G, Ghielmi S *et al.* Chromatographic methods for blood alcohol determination. J Chromatogr 1992; 580: 161-90.
- Macchia T, Mancinelli R, Gentili S *et al.* Ethanol in biological fluids : headspace GC measurement. J Anal Tox 1995; 19: 241-6.
- Machata G. Determination of alcohol in blood by gas chromatographic headspace analysis. Clin Chem News 1972; 4: 29-32.
- Penton Z. Blood alcohol determination with automated solid phase microextraction (SPME) : A comparison with static headspace sampling. Can Soc Forens Sci J 1997; 30: 7-12.
- Arthur CL, Killan LM, Buchholz KD *et al.* Automation and optimization of solid - phase microextraction. Anal Chem 1992; 64: 1960-6.
- Arthur CL, Potter DW, Buchholz KD *et al.* Solid phase microextraction for the direct analysis of water : Theory and practice. LC GC 1992; 10: 656-61.
- Grob RL. Modern Practice of Gas Chromatography. 2 nd ed. New York: John Wiley & Sons, 1985.
- Gosselin RE, Smith RP, Hodge HC. Ethyl Alcohol. In: Tracy TM (ed), Clinical Toxicology of Commercial Products. 5 th ed, London : Williams & Wilkins, 1984: III - 166 - III - 179.
- Miller JC, Miller JN. Statistics for Analytical Chemistry. West Sussex : Ellis Horwood Ltd; 1984 : 52-3.
- Bureau of Health Policy and Plan. Health in Thailand 1995-1996. Bangkok : The Veterans Press; 1997 : 55-74.
- AOAC International. Intralaboratory Analytical Method Validation Short Course Manual. September 6, 1996. Florida: AOAC International. 1996.
- พระราชบัญญัติจรรยาบรรณ พ.ศ. 2522. กฎกระทรวงฉบับที่ 16 (พ.ศ.2537.) ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 111 ตอนที่ 54 ก (ลงวันที่ 8 ธันวาคม 2537).
- Taylor JK. Quality Assurance of Chemical Measurement. Michigan: Lewis Publishers Inc; 1987: 79-82.
- Ai J. Solid phase microextraction for quantitative analysis in nonequilibrium situations. Anal Chem 1997; 69: 1230-6.
- Ai J. Headspace solid phase microextraction : Dynamics and quantitative analysis before reaching a partition equilibrium. Anal Chem 1997; 69: 3260-6.