12/0147/41

นิพนธ์ต้นฉบับ

การวิเคราะห์หาปริมาณแอลกอฮอล์ในซีรัมโดยวิธีสเปคโตรโฟโตเมทรี

Serum Alcohol Quantitation by Spectrophotometry

ชนิดา พลานุเวช[1], สมชาย อิสระวาณิชย์, วิไล ชินเวชกิจวานิชย์

Abstract : Chanida Palanuvej, Somchai Issaravanich and Vilai Chinveschakitvanich. 1998. Serum alcohol quantitation by spectrophotometry. Thai J Hlth Resch 12(1) : 29-42

By using enzyme alcohol dehydrogenase and coenzyme NAD^+, we quantitated alcohol concentration in serum in term of absorbance unit of $NADH+H^+$ at 340 nm or absorbance unit of formazan compound at 505 nm, following the further reaction of $NADH+H^+$, tetrazolium and phenazine methosulphate. Comparing alcohol concentration in serum by these spectrophotometric methods (y) with the headspace gas chromatographic method (x) showed the linear correlation ($p<0.001$) with correlation coefficients of 0.975 and 0.976 respectively. The correlation equations were $y = 9.7+0.95x$ ($\lambda = 340$ nm, $n = 76$) and $y = 4.2+0.94x$ ($\lambda = 505$ nm, $n = 170$). Serum alcohol concentration (SAC) could be converted to blood alcohol concentration (BAC) by the ratio SAC:BAC = 1.16. The stability of alcohol in serum at -15 °c was at least 1 month.

Key words : alcohol, serum, analysis, alcohol dehydrogenase, spectrophotometry, headspace gas chromatography.

[1] ศูนย์วิจัยยาเสพติด สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Drug dependence Research Center, Institute of Health Research, Chulalongkorn University.

บทคัดย่อ : ชนิดา พลานุเวช สมชาย อิสระวาณิชย์ และ วิไล ชินเวชกิจวานิชย์. 2541. การวิเคราะห์หาปริมาณแอลกอฮอล์ในซีรัมโดยวิธีสเปคโตรโฟโตเมทรี. วารสารวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ 12(1) : 29-42

วิเคราะห์หาปริมาณแอลกอฮอล์ในซีรัมโดยใช้เอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส และโคเอนไซม์ NAD^+ วัดค่าการดูดแสงของ $NADH+H^+$ ที่เกิดขึ้นที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร หรือให้ $NADH+H^+$ ทำปฏิกิริยาต่อกับ tetrazolium และ phenazine methosulphate ได้สารประกอบ formazan วัดค่าการดูดกลืนแสงของ formazan ที่ความยาวคลื่น 505 นาโนเมตร เปรียบเทียบปริมาณแอลกอฮอล์ในซีรัมโดยวิธีทั้งสอง (y) กับวิธีเฮคสเปซแก๊สโครมาโตกราฟี (x) พบว่ามีความสัมพันธ์กันเป็นเส้นตรง ($p<0.001$) มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เท่ากับ 0.975 และ 0.976 มีสมการความสัมพันธ์เป็น $y = 9.7+0.95x$ และ $y = 4.2+0.94x$ จากตัวอย่างที่ศึกษาจำนวน 76 และ 170 ตัวอย่างตามลำดับ ปริมาณแอลกอฮอล์ในซีรัมสามารถคำนวณเป็นปริมาณแอลกอฮอล์ในเลือดได้โดยหารด้วย 1.16 ความเสถียร (stability) ของแอลกอฮอล์ในซีรัมที่อุณหภูมิ -15 °ซ อย่างน้อย 1 เดือน

คำสำคัญ : แอลกอฮอล์, ซีรัม, การวิเคราะห์, แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส, สเปคโตรโฟโตเมทรี, เฮดเสปซแก๊สโครมาโตกราฟี

บทนำ

สังคมไทยมีค่านิยมที่ยอมรับการดื่มเครื่องดื่มที่มีแอลกอฮอล์ ทั้งในลักษณะของการดื่มเพื่อเข้าสังคมและการดื่มเพื่อเป็นยารักษาโรค (ยาดองเหล้า) ซึ่งเป็นผลกระทบสำคัญประการหนึ่งของประเทศ คือเป็นสาเหตุสำคัญอันหนึ่งของการเกิดอุบัติเหตุและอุบัติภัยต่างๆ นอกจากนี้ยังมีผลต่อสุขภาพอนามัย มีพิษต่อสมอง ระบบทางเดินอาหาร ระบบหัวใจและหลอดเลือด ระบบเมตาบอลิค และต่อมไร้ท่อ และระบบต้านจุลชีพ เป็นต้น (**พงษ์พิสุทธิ์** และคณะ, 2536) มีการดำเนินการต่างๆเพื่อป้องกันและแก้ไขปัญหาที่เกิดจากการดื่มสุรา ทางด้านกฎหมายได้กำหนดปริมาณแอลกอฮอล์ในเลือดของผู้ขับขี่ยานยนต์ไม่ให้เกิน 50 มก.% (นิรนาม, 2535; นิรนาม 2537) ทางด้านวิชาการมีการจัดตั้งกลุ่มศึกษาปัญหาต่างๆที่เกี่ยวข้องกับสุรา (พงษ์พิสุทธิ์ และคณะ, 2536; นิรนาม; 2536, คณะทำงานวิจัยสุรา, 2537; นิรนาม,

การตรวจวิเคราะห์หาปริมาณแอลกอฮอล์ในร่างกาย สามารถตรวจได้จาก ลมหายใจ เลือด ซีรัม และน้ำลาย วิธีที่ได้รับความเชื่อถือและยอมรับในทางกฎหมาย คือการตรวจแอลกอฮอล์ในเลือด และการตรวจจากลมหายใจ (นิรนาม, 2535; นิรนาม 2537) วิธีมาตรฐานที่ใช้ในการตรวจ แอลกอฮอล์ในเลือด คือ วิธีเฮดสเปซแก๊สโครมาโตกราฟี (headspace gas chromatography) วิธีนี้ใช้เครื่องมือราคาแพง มีได้ตามโรงเรียนแพทย์ หรือโรงพยาบาลขนาดใหญ่เท่านั้น การใช้เครื่องตรวจลมหายใจ (breath analyzer) ยังมีปัญหาในด้านระเบียบวิธีทดสอบและการควบคุมคุณภาพของเครื่อง ต้องมีการลงทุนในการจัดซื้อตลอดจนการบำรุงรักษา ยังมีวิธีวิเคราะห์แอลกอฮอล์อีกวิธีหนึ่งคือใช้วิธีสเปคโตรโฟโตเมทรี ซึ่งง่าย สะดวก และราคาถูก เครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ เป็นเครื่องมือพื้นฐานในห้องปฏิบัติการทั่วไป โรงพยาบาลชุมชนและโรงพยาบาลศูนย์ ซึ่งเป็นโรงพยาบาลขนาดเล็ก ไม่มีเครื่องแกสโครมาโตกราฟ ไม่มีงบประมาณที่จะซื้อเครื่องตรวจวัดแอลกอฮอล์จากลมหายใจ จึงไม่มีข้อมูลทางด้านห้องปฏิบัติการ เพื่อศึกษาปัญหาที่เกิดจากการดื่มเครื่องดื่มที่มีแอลกอฮอล์ หรือในทำนองกลับกันไม่มีข้อมูลอันแสดงถึงปัญหา จึงไม่สามารถของบประมาณเพื่อดำเนินการต่อไปได้ สามารถใช้วิธีสเปคโตรโฟโตเมทรีวิเคราะห์แอลกอฮอล์ในสารตัวอย่างจากร่างกาย เช่น น้ำลาย และซีรัมได้ เพื่อเป็นประโยชน์ในการศึกษาวิจัย และอาจนำไปสู่การประยุกต์ใช้ในทางนิติเวชวิทยาต่อไปได้ ซึ่งเป็นทางเลือกหนึ่งในการดำเนินการป้องกันและแก้ไขปัญหาที่สืบเนื่องจากการดื่มเครื่องดื่มที่มีแอลกอฮอล์

การใช้วิธีสเปคโตรโฟโตเมทรีวิเคราะห์แอลกอฮอล์ในน้ำลายนั้นสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ได้ดำเนินการศึกษาไว้แล้วโดยพรพิมล กองทิพย์ และคณะ(2531) การศึกษาครั้งนี้เป็นการเปรียบเทียบการวิเคราะห์หาปริมาณแอลกอฮอล์ในซีรัม โดยวิธีสเปคโตรโฟโตเมทรีกับวิธีเฮดสเปซแก๊สโครมาโตกราฟี และเปรียบเทียบกับปริมาณแอลกอฮอล์ในเลือดที่วิเคราะห์โดยวิธีเฮดสเปซแก๊สโครมาโตกราฟี

การวิเคราะห์หาปริมาณแอลกอฮอล์ในซีรัมโดยวิธีสเปคโตรโฟโตเมทรีนี้อาศัยปฏิกิริยาของเอนไซม์ alcohol dehydrogenase (ADH) และโคเอนไซม์ nicotinamide adenine dinucleotide (NAD^+) เปลี่ยนสับสเตรทคือ ethyl alcohol ให้เป็น acetaldehyde และเปลี่ยน NAD^+ เป็น $NADH+H^+$ (nicotinamide adenine dinucleotide, reduced form) ดังสมการ

$$\text{ethanol} + NAD^+ \xrightarrow{\text{alcohol dehydrogenase}} \text{acetaldehyde} + NADH + H^+$$

เมื่อกำหนดให้ความเข้มข้นของเอนไซม์และโคเอนไซม์ (ADH, NAD^+) คงที่ ความเข้มข้นของ $NADH + H^+$ จะแปรผันตามความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ สามารถวัดปริมาณแอลกอฮอล์ได้จากการวัดค่าการดูดแสงของ $NADH + H^+$ ที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร หรือให้ $NADH + H^+$ ทำปฏิกิริยา

ต่อไปกับ phenazine methosulphate (PMS) และ tetrazolium salt (INT, 2-p-iodophenyl-3-p-nitrophenyl-5-phenyltetrazolium chloride) ได้สารประกอบสีแดงของ formazan ดังสมการ

$$NADH + H^+ + PMS \longrightarrow \text{reduced PMS} + NAD^+$$

$$\text{reduced PMS} + INT \longrightarrow PMS + \text{formazan compound}$$

สามารถวัดปริมาณแอลกอฮอล์ได้จากการวัดค่าการดูดแสงของ formazan ที่ความยาวคลื่น 505 นาโนเมตร

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

การเก็บและเตรียมตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างเลือดและซีรัมจากอาสาสมัครที่ดื่มสุราและยินยอมให้เจาะเลือด โดยใช้น้ำยา thimerosal หรือ povidone-iodine เช็ดทำความสะอาดผิวหนังบริเวณที่จะเจาะแทนการใช้แอลกอฮอล์เช็ดแผล แล้วแบ่งเลือดที่ได้ออกเป็นสองส่วน ส่วนหนึ่งเก็บในขวดแก้วขนาด 10 มล. เติมสารป้องกันเลือดแข็งตัว (potassium oxalate 3 มก. + sodium fluoride 10 มก. ต่อเลือด 1 มล.) ปิดด้วยจุก hycar พันทับด้วย parafilm อีกส่วนหนึ่งปล่อยให้เลือดแข็งตัวและปั่นแยกซีรัมเก็บไว้

การเตรียมตัวอย่างเลือด และซีรัม สำหรับการวิเคราะห์โดยวิธีเฮดสเปซแกสโครมาโตกราฟี ใช้ปิเปตดูดเลือด หรือ ซีรัม 0.5 มล. ใส่ในขวดแก้วขนาด 25 มล. เติม isopropanol (0.1% โดยปริมาตร) 0.5 มล. เป็น internal standard ปิดด้วยจุก hycar พันทับด้วย paratfilm เก็บในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -15°ซ จนกว่าจะวิเคราะห์ (1-3 วัน) ตัวอย่างเลือดที่เหลือเก็บในตู้เย็นอุณหภูมิ 10 °ซ ตัวอย่างซีรัมที่เหลือเก็บไว้ในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -15°ซ เป็นระยะเวลา 1 เดือน นำมาวิเคราะห์หาปริมาณแอลกอฮอล์ซ้ำโดยวิธีเฮดสเปซแกสโครมาโตกราฟี เพื่อศึกษาความเสถียรของแอลกอฮอล์

การวิเคราะห์ตัวอย่าง

วิเคราะห์แอลกอฮอล์ในเลือดและซีรัมโดยวิธีเฮดสเปซแก๊สโครมาโตกราฟี

นำตัวอย่างเลือดและซีรัมที่เตรียมไว้มา incubate ใน shaking water bath อุณหภูมิ 50°ซ นาน 5 นาที ดูดไอปริมาตร 0.5 มล. ฉีดเข้าเครื่อง Gas chromatograph (Varian Vista 6000, Varian Integrator 4270) ใช้คอลัมน์แก้วขนาด 2 มม. X 2 ม. บรรจุด้วย 80/100 mesh Carbopack C/0.2% Carbowax 1500 อุณหภูมิคอลัมน์ 100 °ซ ความเร็วของแก๊สตัวพา (N_2 gas) 30 มล./นาที

วิธีนี้สามารถวิเคราะห์แอลกอฮอล์ได้ตั้งแต่ 0-300 มก.% มีค่าร้อยละของสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (coefficient of variation) ตลอดการทดลองเท่ากับ 3.8 และมีความถูกต้อง (recovery) เท่ากับร้อยละ 98.2

วิเคราะห์แอลกอฮอล์ในซีรัมโดยวิธีสเปคโตรโฟโตเมทรีที่ความยาวคลื่นแสง 340 นาโนเมตร ตามวิธีของ Gadsden และ Taylor (Gadsden and Taylor, 1986)

น้ำยาวิเคราะห์

1. สารละลาย ADH ประกอบด้วย alcohol dehydrogenase (ADH,Sigma A7011, 75kU/vial) 0.01 กรัม ในน้ำกลั่น 5 มล.

2. สารละลาย NAD^+ ประกอบด้วย NAD^+ (Sigma N0632) 0.2 กรัม ในน้ำกลั่น 5 มล.

3. สารละลายบัฟเฟอร์ใช้ได้ทั้ง AMP buffer หรือ TRIS buffer

3.1 AMP buffer 0.65 M pH 8.5 ปิเปต AMP (2 - amino - 2 - methylpropan -1-ol) 64 มล. เติมน้ำกลั่น 800 มล. ปรับ pH เป็น 8.5 ด้วย 6 N HCl เติมน้ำกลั่นจนครบ 1 ลิตร

3.2 TRIS buffer 0.5 M pH 8.8 ชั่ง TRIS (MW 121.14) 60.5 กรัม เติมน้ำกลั่น 800 มล. ปรับ pH เป็น 8.8 ด้วย 6N HCl เติมน้ำกลั่นจนครบ 1 ลิตร

3.3 สารละลายกรดเกลือ (6N HCl) ใช้กรดเกลือเข้มข้น ผสมกับน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:1

4. สารละลายมาตรฐาน 1 % โดยปริมาตร ใช้ขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มล. เติมน้ำกลั่นลงไปครึ่งหนึ่ง เติม absolute ethanol 0.1 มล. เติมน้ำกลั่นจนครบ 10 มล. (absolute ethanol ที่ใช้มีความบริสุทธิ์ 99.7% โดยปริมาตรและมีความถ่วงจำเพาะ 791 มก./มล. ดังนั้นสารละลายแอลกอฮอล์ 1 % โดยปริมาตรมีความเข้มข้นเท่ากับ 789 มก.%)

5. สารละลายมาตรฐาน 0.1, 0.2 และ 0.3% โดยปริมาตร ใช้ขวดวัดปริมาตร ขนาด 10 มล. เติมน้ำกลั่นลงไปครึ่งหนึ่ง ใช้ปิเปตดูดสารละลายมาตรฐาน 1 % โดยปริมาตร (จากข้อ 4) มา 1, 2 และ 3 มล. แล้วเติมน้ำกลั่นจนครบ 10 มล.

วิธีการวิเคราะห์

ใช้สารมาตรฐานหรือซีรัม 0.01 มล. เติมบัฟเฟอร์ 3 มล. ADH 0.1 มล. และ NAD^+0.1 มล. ผสมให้เข้ากัน ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที วัดค่าการดูดแสงที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร

วิเคราะห์แอลกอฮอล์ในซีรัมโดยวิธีสเปคโตรโฟโตเมทรีที่ความยาวคลื่นแสง 505 นาโนเมตร ตามวิธีของ Lim และ Buttery (Lim and Buttery, 1977)

น้ำยาวิเคราะห์

1. สารละลาย ADH ประกอบด้วย alcohol dehydrogenase (ADH, Sigma A7011, 75kU/vial) 0.01 กรัม ในน้ำกลั่น 5 มล.

2. สารละลาย NAD^+/PMS/INT (Color reagent) ประกอบด้วย NAD^+ (Sigma N0 632) 0.2 กรัม PMS 0.005 กรัม และ INT 0.02 กรัม ในน้ำกลั่น 10 มล.

3. สารละลายบัฟเฟอร์ใช้ได้ทั้ง AMP buffer หรือ TRIS buffer

3.1 AMP buffer 0.65 M pH 8.5 ปิเปต AMP (2-amino-2-methylpropan-1-ol) 64 มล. เติมน้ำกลั่น 800 มล. เติม Tween 20 1 มล. ปรับ pH เป็น 8.5 ด้วยสารละลายกรดเกลือ (6N HCl) เติมน้ำกลั่นจนครบ 1 ลิตร

3.2 TRIS buffer 0.5 M pH 8.8 ชั่ง TRIS (MW 121.14) 60.5 กรัม เติมน้ำกลั่น 800 มล. เติม Tween 20 1 มล. ปรับ pH เป็น 8.8 ด้วยสารละลายกรดเกลือ(6N HCl) เติมน้ำกลั่นจนครบ 1 ลิตร

3.3 สารละลายกรดเกลือ (6N HCl) ใช้กรดเกลือเข้มข้น ผสมกับน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:1

4. สารละลายกรดเกลือ 0.1 N ใช้กรดเกลือเข้มข้น ผสมกับน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1: 120

วิธีการวิเคราะห์

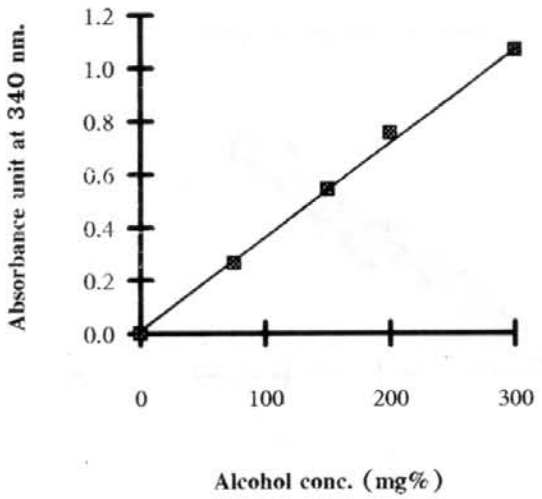
ใช้สารมาตรฐานหรือซีรัม 0.01 มล. เติมบัฟเฟอร์ 0.5 มล. ADH 0.1 มล. และ color reagent 0.2 มล. ผสมให้เข้ากัน ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที เติม 0.1 N HCl 5 มล. วัดค่าการดูดแสงที่ความยาวคลื่น 505 นาโนเมตร

ผล

1. การวิเคราะห์หาปริมาณแอลกอฮอล์ในซีรัมโดยวิธีสเปคโตรโฟโตเมทรีที่ความยาวคลื่นแสง 340 นาโนเมตร

วิธีนี้สามารถวิเคราะห์แอลกอฮอล์ได้ตั้งแต่ 0-300 มก.% (รูปที่ 1) มีค่าร้อยละของสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนในการทดลองเดียวกันเป็น 2.1 และ 2.6 และระหว่างการทดลองเป็น 3.1 และ 4.4 ตามลำดับ (ตารางที่ 1) เมื่อนำค่าที่วิเคราะห์ได้โดยวิธีนี้ไปสร้างผังการกระจายคู่กับค่าที่วิเคราะห์ได้โดยวิธีเฮคสเปซแก๊สโครมาโตกราฟี (รูปที่ 2) คำนวณค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ได้เท่ากับ 0.975 ($p<0.001$) และได้สมการความสัมพันธ์ $y = 9.7+0.95x$ เมื่อ y เป็นปริมาณแอลกอฮอล์ในซีรัมที่วิเคราะห์โดยวิธีสเปคโตรโฟโตเมทรี ที่ความยาวคลื่นแสง 340 นาโนเมตร และ x เป็นปริมาณแอลกอฮอล์ในซีรัมที่วิเคราะห์โดยวิธีเฮคสเปซแกสโครมาโตกราฟี (ตารางที่ 1 และ รูปที่ 2)

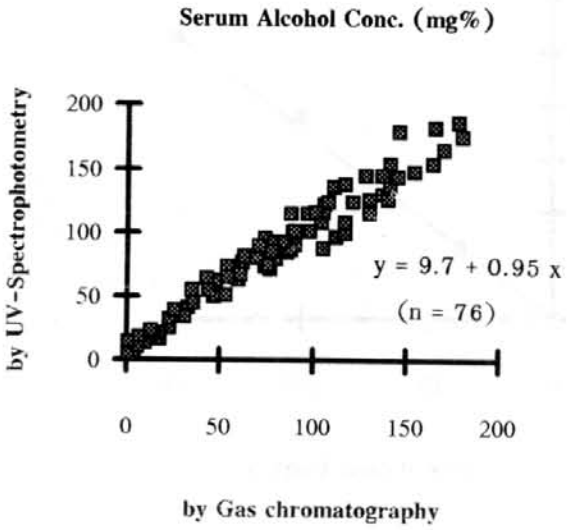
รูปที่ 1 Linearity ของวิธีวัดปริมาณแอลกอฮอล์ในซีรัมโดยวิธีสเปคโตรโฟโตเมทรีที่ความยาวคลื่นแสง 340 นาโนเมตร



ตารางที่1 ความเชื่อถือได้ของวิธีวิเคราะห์แอลกอฮอล์ในซีรัมโดยวิธีสเปคโตรโฟโตเมทรีที่ความยาวคลื่นแสง 340 นาโนเมตร

Linearity (mg%)	Precision within assay(n=5) X±S.D.(mg%)	%CV	Precision between assay(n=3) X±S.D.(mg%)	%CV	Correlaton with GC (n=76)
0-300	52.6±1.1	2.1	50.1±2.2	4.4	y = 9.7+0.95 x
	159.8±4.1	2.6	156.9±4.9	3.1	r = 0.975

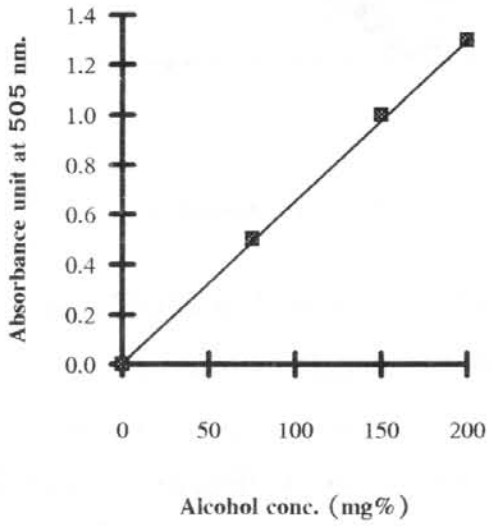
รูปที่ 2 ผลการเปรียบเทียบวิธีวัดปริมาณแอลกอฮอล์ในซีรัมโดยวิธีสเปคโตรโฟโตเมทรีที่ความยาวคลื่นแสง 340 นาโนเมตร กับวิธี แก๊สโครมาโตกราฟฟี



2. การวิเคราะห์หาปริมาณแอลกอฮอล์ในซีรัมโดยวิธีสเปคโตรโฟโตเมทรีที่ความยาวคลื่นแสง 505 นาโนเมตร

วิธีนี้สามารถวิเคราะห์แอลกอฮอล์ได้ตั้งแต่ 0-200 มก.% (รูปที่ 3) มีค่าร้อยละของสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนในการทดลองเดียวกันเป็น 2.7 และ 4.3 และระหว่างการทดลองเป็น 5.6 และ 6.9 ตามลำดับ (ตารางที่ 2) เมื่อนำค่าที่วิเคราะห์ได้โดยวิธีนี้ไปสร้างผังการกระจายคู่กับค่าที่วิเคราะห์ได้โดยวิธีเฮดสเปซแก๊สโครมาโตกราฟี (รูปที่ 4) คำนวณค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ได้เท่ากับ 0.976 ($p<0.001$) และได้สมการความสัมพันธ์ $y = 4.2+0.94x$ เมื่อ y เป็นปริมาณแอลกอฮอล์ในซีรัมที่วิเคราะห์โดยวิธีสเปคโตรโฟโตเมทรี ที่ความยาวคลื่นแสง 505 นาโนเมตร และ x เป็นปริมาณแอลกอฮอล์ในซีรัมที่วิเคราะห์โดยวิธีเฮดสเปซแก๊สโครมาโตกราฟี (ตารางที่ 2 และ รูปที่ 4)

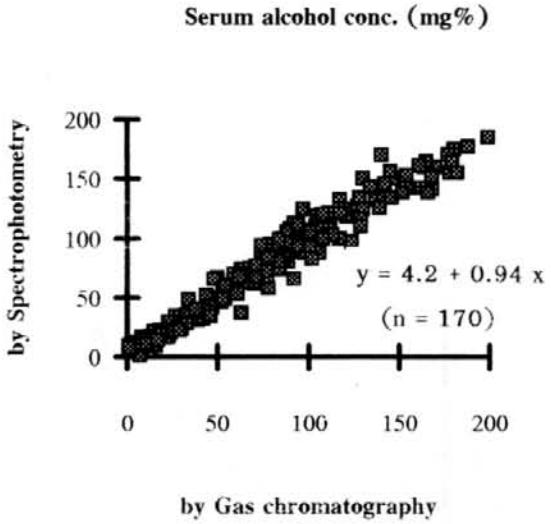
รูปที่ 3 Linearity ของวิธีวัดปริมาณแอลกอฮอล์ในซีรัมโดยวิธีสเปคโตรโฟโตเมทรีที่ความยาวคลื่น 505 นาโนเมตร



ตารางที่ 2 ความเชื่อถือได้ของวิธีวิเคราะห์แอลกอฮอล์ในซีรัมโดยวิธีสเปคโตรโฟโตเมทรีที่ความยาวคลื่นแสง 505 นาโนเมตร

Linearity (mg%)	Precision within assay(n=5) X±S.D.(mg%)	%CV	Precision between assay(n=6) X±S.D.(mg%)	%CV	Correlaton with GC (n=170)
0-200	51.4±2.2	4.3	49.8±2.8	5.6	y = 4.2+0.94 x
	173.3±4.7	2.7	170.7±11.7	6.9	r = 0.976

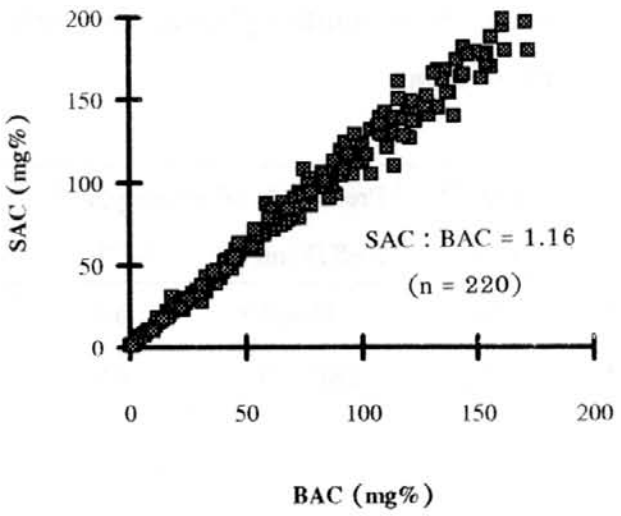
รูปที่ 4 ผลการเปรียบเทียบวิธีวัดปริมาณแอลกอฮอล์ในซีรัมโดยวิธีสเปคโตรโฟโตเมทรีที่ความยาวคลื่น 505 นาโนเมตร กับวิธี GC



3. ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณแอลกอฮอล์ในซีรัมกับปริมาณแอลกอฮอล์ในเลือด

เมื่อนำปริมาณแอลกอฮอล์ในซีรัมและในเลือดที่วิเคราะห์โดยวิธีเฮดสเปซแก๊สโครมาโตกราฟี มาสร้างผังการกระจาย (รูปที่ 5) คำนวณค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ได้เท่ากับ 0.992 ($p<0.001$) และได้สมการความสัมพันธ์ $y = 1.8+1.16x$ เมื่อ y เป็นปริมาณแอลกอฮอล์ในซีรัมที่วิเคราะห์โดยวิธีเฮดสเปซแก๊สโครมาโตกราฟี และ x เป็นปริมาณแอลกอฮอล์ในเลือดที่วิเคราะห์โดยวิธีเฮดสเปซแก๊สโครมาโตกราฟี

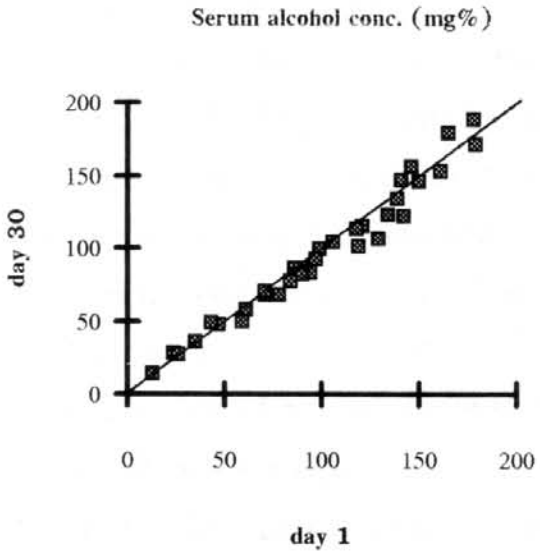
รูปที่ 5 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณแอลกอฮอล์ในซีรัมกับในเลือด



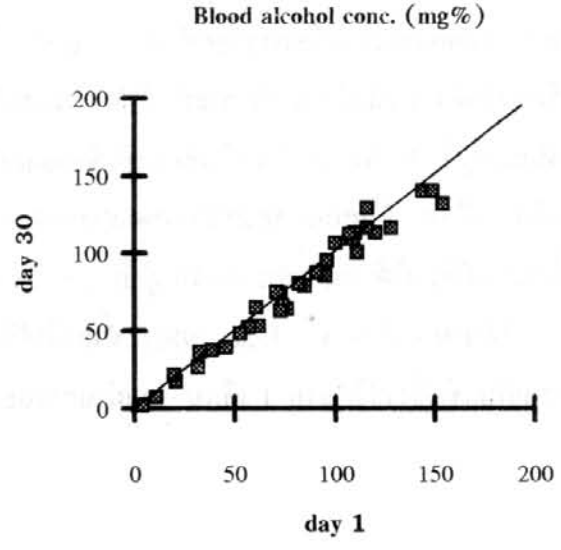
4. ความเสถียรของแอลกอฮอล์ในซีรัมและในเลือด

เปรียบเทียบปริมาณแอลกอฮอล์ในซีรัมและในเลือดที่เก็บไว้นาน 1 เดือน ที่อุณหภูมิ -15 ° ซ และ 10 ° ซ ตามลำดับ (y) กับปริมาณตั้งต้น (x) พบว่า y = -0.20+0.98x สำหรับซีรัม (n=33) และ y = -2.77+0.97x สำหรับเลือด (n=35) (รูปที่ 6,7) เมื่อทดสอบความแตกต่างของปริมาณแอลกอฮอล์ตั้งต้นกับปริมาณแอลกอฮอล์เมื่อเก็บสารตัวอย่างไว้นาน 1 เดือนโดยวิธี paired t-test (n=33 และ 35 ตามลำดับ) พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

รูปที่ 6 ความเสถียรของแอลกอฮอล์ในซีรัม



รูปที่ 7 ความเสถียรของแอลกอฮอล์ในเลือด



วิจารณ์

การตรวจวิเคราะห์หาปริมาณแอลกอฮอล์ในซีรัม โดยวิธีสเปคโตรโฟโตเมทรีที่ความยาวคลื่นแสง 340 นาโนเมตรเป็นวิธีที่ง่าย สะดวก เหมาะกับห้องปฏิบัติการที่ไม่มีเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ แต่มีเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ที่มีแหล่งกำเนิดแสงในช่วงรังสีอุลตราไวโอเลต (ความยาวคลื่นแสง <380 นาโนเมตร) หากห้องปฏิบัติการใดมีเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ที่มีแหล่งกำเนิดแสงในช่วงรังสีเฉพาะที่ตามองเห็นได้ (ความยาวคลื่นแสง 380-780 นาโนเมตร) ก็สามารถดัดแปลงวิธีนี้เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณแอลกอฮอล์ได้ โดยเพิ่มปฏิกิริยาควบคู่สังเคราะห์สาร formazan สารนี้มีคุณสมบัติดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 505 นาโนเมตร วิธีวิเคราะห์ทั้งสองวิธีนี้มีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงกับวิธีแก๊สโครมาโตกราฟี มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เท่ากับ 0.98 อย่างไรก็ตาม มีข้อจำกัดบางประการในการวิเคราะห์หาแอลกอฮอล์ในสารตัวอย่างจากร่างกายโดยวิธีสเปคโตรโฟโตเมทรี ประการแรกคือความจำเพาะของวิธีวิเคราะห์ ปฏิกิริยาระหว่างเอ็นไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสกับเอธิลแอลกอฮอล์อาจถูกรบกวนโดยแอลกอฮอล์โมเลกุลเล็กๆ ที่มีสูตรโครงสร้างเป็นเส้นตรง เช่น n-propanol และ n-butanol แต่สารทั้งสองชนิดเป็นสารพิษที่พบในร่างกายน้อยมาก (พรพิมล และคณะ, 2531) อีกประการหนึ่งคือความเสถียรของแอลกอฮอล์ในสารตัวอย่างจากร่างกาย โดยปกติการเก็บสารตัวอย่างเพื่อตรวจวิเคราะห์แอลกอฮอล์ จะต้องเติมโซเดียมฟลูออไรด์ในปริมาณที่ทำให้ได้ความเข้มข้นของสารเท่ากับ 1 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร (1% w/v) เพื่อยับยั้งปฏิกิริยาทั้งการสังเคราะห์และสลายเอธิลแอลกอฮอล์โดยเอ็นไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส ออกซิเดส หรือเอ็นไซม์อื่นๆ ในสารตัวอย่างหรือโดยเอ็นไซม์จากจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในตัวอย่างนั้น ทำให้สามารถเก็บตัวอย่างที่จะวิเคราะห์ได้นานขึ้น ในสภาพแช่แข็ง -15 °ซ เก็บได้นานถึง 6 เดือน (Kate, 1980) การเก็บตัวอย่างในภาชนะปิด เก็บจนให้ปริมาตรของตัวอย่างเกือบเต็มภาชนะ เพื่อลดการระเหยของแอลกอฮอล์และเพิ่มอายุการเก็บตัวอย่าง (Chang *et al.*, 1984) เนื่องจากโซเดียมฟลูออไรด์มีคุณสมบัติยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส ดังนั้นสารตัวอย่างที่นำมาตรวจโดยวิธีสเปคโตรโฟโตเมทรีนี้ต้องไม่เติมสารโซเดียมฟลูออไรด์ หรือสารใดๆ ที่อาจยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ สารตัวอย่างที่เป็นซีรัมเป็นสารตัวอย่างที่เหมาะกับการใช้วิธีนี้เพราะไม่ต้องเติมสารกันเลือดแข็งตัวหรือสารใดๆทั้งสิ้น เมื่อเจาะเลือดแล้วก็ตั้งทิ้งไว้ในภาชนะปิดที่อุณหภูมิต่ำ รอให้เลือดแข็งตัวแล้วนำซีรัมมาวิเคราะห์ ถ้าไม่สามารถวิเคราะห์ทันที ก็เก็บซีรัมไว้โดยแช่แข็งในภาชนะปิดที่อุณหภูมิ -10 ถึง -20 °ซ (ในช่องแช่แข็งของตู้เย็นธรรมดา) จากการทดลองพบว่าสามารถเก็บได้นานถึง 1 เดือน ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Kate ที่รายงานว่าเลือดที่ไม่มีโซเดียมฟลูออไรด์ เก็บที่อุณหภูมิห้องได้นาน 2 วัน เก็บใน ตู้เย็น (5 °ซ) ได้นาน 2 สัปดาห์ และเก็บในตู้แช่แข็ง (-15 °ซ) ได้นาน 4 สัปดาห์ (Kate, 1980) น้ำยาที่ใช้วิเคราะห์ก็เช่นกัน เมื่อเตรียมแล้วและใช้ไม่หมด สามารถเก็บแช่แข็งไว้ได้นาน 1 เดือน โดยผ่านการละลายซ้ำๆ 3-4 ครั้งได้

แต่ไม่ควรเก็บน้ำยาวิเคราะห์ในตู้เย็นธรรมดาเพราะ NAD^+ จะเปลี่ยนไปเป็น NADH ทำให้ linearity ของการวิเคราะห์ลดลง

เมื่อทราบความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ในซีรัม (serum alcohol concentration, SAC) ก็สามารถคำนวณหาความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ในเลือด (blood alcohol concentration, BAC) ได้ โดยศึกษาหาความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ในสารตัวอย่างทั้งสองชนิด ในการศึกษาครั้งนี้ค่า SAC : BAC เท่ากับ 1.16 ค่า SAC : BAC ที่สถาบันนิติเวชวิทยา กรมตำรวจ (2536) รายงานไว้เท่ากับ 1.13 ส่วนการศึกษาในต่างประเทศ พบว่าค่า SAC : BAC เท่ากับ 1.08-1.18 (Charlebois et al., 1996)

วิธีสเปคโตรโฟโตเมทรีเป็นทางเลือกหนึ่ง ในการใช้วิเคราะห์หาปริมาณแอลกอฮอล์ในซีรัม และสามารถคำนวณค่าแอลกอฮอล์ในเลือดได้ นอกเหนือไปจากวิธีตรวจเลือดโดยตรงด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ หรือตรวจจากลมหายใจด้วยเครื่อง breath analyzer เป็นประโยชน์สำหรับงานศึกษาวิจัยและอาจพัฒนาไปสู่การประยุกต์ใช้ทางนิติเวชวิทยาต่อไปได้

เอกสารอ้างอิง

คณะทำงานวิจัยสุรา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 2537. สุรากับสังคมไทย : ข้อสนเทศและผลงานวิจัย ความรู้ ทัศนคติ การดื่ม และแนวทางแก้ไข. บทความวิชาการโดยความร่วมมือของสถาบันวิจัยสังคม สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ และวิทยาลัยการสาธารณสุข จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กันยายน พ.ศ.2537.

นิรนาม. 2535. พระราชบัญญัติจราจรทางบก ฉบับที่ 4 ราชกิจจานุเบกษา เล่มที่ 109 ตอนที่ 39 ลงวันที่ 6 เมษายน 2535.

นิรนาม. 2536. กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข และองค์การอนามัยโลก รายงานคณะผู้เชี่ยวชาญสุราที่เกี่ยวข้องกับอุบัติเหตุยานยนต์ ISBN 974-7979-29-2.

นิรนาม. 2537. กฎกระทรวง ฉบับที่ 16 ออกตามความในพระราชบัญญัติจราจรทางบก พ.ศ.2522 ลงวันที่ 15 พฤศจิกายน 2537.

นิรนาม. 2539. ความเป็นจริงเกี่ยวกับสุราและอุบัติเหตุจราจร. เอกสารประกอบการสัมมนาเรื่อง บทบาทของสื่อมวลชนและคนบันเทิงในการแก้ปัญหาอุบัติเหตุจราจรจากสุรา วันที่ 11 มิถุนายน 2539. จัดโดย สถาบันการแพทย์ด้านอุบัติเหตุและสาธารณภัย กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข

พรพิมล กองทิพย์, วราพรรณ ด่านอุตรา, อนุสรณ์ รังสิโยธิน, ปราณี ดินประเสริฐ และ วิชัย โปษยะจินดา. 2531.การเปรียบเทียบวิธีการวิเคราะห์เอทานอลในวัตถุตัวอย่างจากร่างกาย. *จุฬาลงกรณ์เวชสาร* 32 (7) :649-660.

พงษ์พิสุทธิ์ จงอุดมสุข, วิลาสินี หมอกเจริญพงศ์, วรรณา หาญเชาว์วรกุล และศรีนคร ตังวาย. 2536. ลักษณะทางสังคมของสุราและผลกระทบต่อสุขภาพในชนบท. รายงานการศึกษาวิจัยจาก งบสนับสนุนของกระทรวงสาธารณสุขต่อมูลนิธิสาธารณสุขเพื่อการพัฒนา ปี 2535-2536.

สถาบันนิติเวชวิทยา สำนักงานแพทย์ใหญ่ กรมตำรวจ. 2536. การหาค่าระดับต่ำสุดของแอลกอฮอล์ในเลือดคนไทยที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของภาวะประสาท. รายงานคณะผู้เชี่ยวชาญสุราที่เกี่ยวข้องกับอุบัติเหตุยานยนต์ กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข และองค์การอนามัยโลก ISBN 974-7979-29-2.

Chang RB., Smith,WA., Walkin E., and Reynolds PC. 1984. The stability of ethyl alcohol in forensic blood specimens. J Anal Toxicol. 8 : 66-67.

Charlebois RC., Corbett MR., and Wigmore JG. 1996. Comparison of ethanol concentrations in blood, serum, and blood cells for forensic application. J Anal Toxicol. 20 : 171-178.

Gadsden RH. and Taylor EH. 1986. Ethanol in biological fluids by enzymic analysis. in Selected methods of clinical chemistry,volume 11 : Selected methods of emergency toxicology. (Frings, CS., Faulkner, WR., and Marcum,VG. eds.) AACC press, Washington, DC. p 63-65.

Kate S. 1980. The collection and handling of the blood alcohol specimen. Am J Clin Pathol. 74 : 743-746.

Lim HH. and Buttery JE. 1977. Determination of ethanol in serum by an enzymatic PMS-INT colorimetric method. Clinica Chimica Acta. 75 : 9-12.