นิพนธ์ต้นฉบับ

การเปรียบเทียบวิธีการวิเคราะห์เอทานอลในวัตถุตัวอย่างจากร่างกาย

พรพิมล กองทิพย์* วราพรรณ ด่านอุตรา**
อนุสรณ์ รังสิโยธิน* ปราณี ดินประเสริฐ*
วิชัย โปษยะจินดา*

Kongtip P, Danultra V, Rungsiyothin A, Dinprasert P, Poshyachinda V. Comparison of detection methods for ethanol in body fluids. Chula Med J 1988; 32(7): 649-660

The legal control of road accidents related on alcoholic beverages commonly adopted the ethanol concentration in biological fluid samples from the drivers of the vehicles as a diagnostic criteria for permissible level. In a number of industrialized countries, the blood estimation of ethanol by the breathalyzer is frequently recommended as a primary method. However, for developing countries with limited budgetary allocation for controlling road accidents, the breathalyzer is rather costly. Hence a study was carried out to compare the outcome of 3 laboratory methods for ethanol measurement in body fluids namely colorimetry, head space gas chromatography and breathalyzer. A prototype filter paper dipstick method for screening ethanol in body fluid samples was also investigated. The study was conducted by serial measurements of blood ethanol by breathalyzer of 11 volunteers who drank 120-330 ml of whisky, while concurrent serial saliva samples were collected for subsequent analysis by colorimetry and head space gas chromatography. The result revealed that when the measurement of blood alcohol by breathalyzer was 100 mg/dl, the ethanol concentration in saliva analyzed by colorimetry and head space gas chromatography were 104 ± 13 mg/dl and 104 ± 15 mg/dl respectively. The sensitivity of colorimetric method applying alcohol dehydrogenase was 7.5 mg/dl. The recovery at ethanol concentrations 50, 100 and 200 mg/dl was between 95-98%. The coefficient of variation of the precision within the same concentration range was below 9%. For the head space gas chromatography, the recovery at ethanol concentrations 15, 25 and 40 mg/dl were between 100-101 % and the coefficient of variation of the precision at the same concentration range was less than 4 %. The prototype filter paper dipstick method could detect ethanol concentration above 100 mg/dl accurately at about 85 %.

The study demonstrated that blood ethanol estimation by breathalyzer were reflected in practically equivalent values of ethanol concentration in saliva determined by colorimetry and head space gas chromatography. The outcome indicated that colorimetric and chromatographic methods which are commonly in use in most servicing laboratories can mostly be the alternative methods to blood ethanol estimation by breathalyzer.

Reprint requests: Kongtip P, Drug Dependence Research Center, Institute of Health Research.
Received for publication. July 9, 1987.

* ศูนย์วิจัยยาเสพติด สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
** ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สาเหตุการตายของประชากรในประเทศไทยในช่วงปี พ.ศ. 2523-2527[1] เกิดจากอุบัติเหตุและการเป็นพิษถึงร้อยละ 32-35 คิดเป็นจำนวนมากกว่า 16,000 คนต่อปี และจากการวิจัยหาระดับแอลกอฮอล์ในเลือดของผู้ประสบอุบัติเหตุจากการจราจรทางบกในเขตกรุงเทพมหานคร ตรวจพบเอทานอลในเลือดของผู้ประสบอุบัติเหตุคิดเป็นร้อยละ 80 ของตัวอย่างทั้งหมด[2] เอทานอลเป็นสารที่มีผสมอยู่ในเครื่องดื่มที่มีแอลกอฮอล์ มีฤทธิ์กดประสาท ถ้ามีอยู่ในร่างกายในระดับที่สูงกว่า 100 mg/dl จะทำให้ขาดประสิทธิภาพในการควบคุมตนเองและยานพาหนะต่าง ๆ เอทานอลจึงอาจเป็นสาเหตุสำคัญประการหนึ่งของอุบัติเหตุซึ่งทำให้สูญเสียชีวิต ทรัพย์สิน และส่งผลกระทบต่อเศรษฐกิจและสังคมของประเทศ การแก้ปัญหาอุบัติเหตุจากการดื่มเครื่องดื่มที่มีแอลกอฮอล์ที่นิยมใช้กันวิธีหนึ่งคือ การจำกัดและตรวจระดับเอทานอลในเลือดผู้ขับขี่ยานพาหนะต่าง ๆ สำหรับประเทศไทย พ.ร.บ. จราจรทางบก พ.ศ. 2522 ที่ใช้อยู่ภายในประเทศ มิได้กำหนดระดับแอลกอฮอล์ที่กฎหมายอนุญาตให้มีในร่างกายผู้ขับขี่ยานยนต์ และวิธีตรวจวัดระดับแอลกอฮอล์ที่เหมาะสม[2] ทำให้ พ.ร.บ. ที่ใช้อยู่มีผลไม่สมบูรณ์ วิธีวัดปริมาณเอทานอลที่ได้รับความเชื่อถือสูงที่สุด ได้แก่วิธีเฮดสเปซแกสโครมาโตกราฟฟี[3,4] ซึ่งเป็นวิธีตรวจในห้องปฏิบัติการ สำหรับวิธีวัดจากลมหายใจด้วยเครื่องวิเคราะห์ลมหายใจ (Breathalyzer)[5] ได้รับการยอมรับในแง่กฎหมายให้ใช้ประเมินเป็นปริมาณเอทานอลในเลือดในหลายประเทศ เช่น อเมริกา แคนาดา นิวซีแลนด์ และออสเตรเลีย[6] ทั้ง 2 วิธีดังกล่าวใช้เครื่องมือราคาแพง ค่าบำรุงรักษาเครื่องมือค่อนข้างสูง สำหรับวิธีเฮดสเปซแกสโครมาโตกราฟฟี ผู้ทดลองต้องมีความชำนาญและวิเคราะห์ตัวอย่างได้จำนวนจำกัด การพัฒนาเพื่อหาเทคโนโลยีที่ง่าย สะดวก ราคาถูก สำหรับใช้วิเคราะห์เอทานอลจึงน่าจะเป็นประโยชน์มาก รายงานนี้แสดงผลการเปรียบเทียบวิธีวิเคราะห์เอทานอลในวัตถุตัวอย่างจากร่างกายด้วยวิธีดัลเลอริเมตรี วิธีชุบด้วยกระดาษกรอง วิธีเฮดสเปซแกสโครมาโตกราฟฟี และวิธีใช้เครื่องวิเคราะห์ลมหายใจ และหาความสัมพันธ์ของระดับเอทานอลในเลือดที่ประเมินโดยใช้เครื่องวิเคราะห์ลมหายใจ และน้ำลายด้วยวิธีต่าง ๆ เพื่อประโยชน์ในการเลือกวิธีการที่เหมาะสมสำหรับศึกษาปริมาณเอทานอลในร่างกาย เพื่อการดำเนินการป้องกันและแก้ไขปัญหาอุบัติเหตุที่สืบเนื่องมาจากการดื่มสุรา

วัสดุและวิธีการ

ให้อาสาสมัครชาย 11 คน ซึ่งเป็นคนปกติมีอายุระหว่าง 20-35 ปี เป่าลมหายใจเข้าเครื่องวิเคราะห์ลมหายใจเพื่อประเมินระดับแอลกอฮอล์ในเลือด และเก็บตัวอย่างน้ำลายในภาชนะปิด แล้วดื่มสุราแม่โขง 120-330 ml. ดื่มหมดแล้วล้างปากด้วยน้ำ 20 นาที ต่อมาเป่าลมหายใจเข้าเครื่องวิเคราะห์ลมหายใจ และเก็บตัวอย่างน้ำลายทุกระยะ 20 นาที ใน 1 ชั่วโมงแรก และทุกระยะ 30 นาทีใน 2 ชั่วโมงต่อมา เก็บตัวอย่างน้ำลาย 8 ตัวอย่างต่ออาสาสมัคร 1 ราย รวมตัวอย่างน้ำลาย 88 ตัวอย่าง นำตัวอย่างน้ำลายไปวิเคราะห์ด้วยวิธีดัลเลอริเมตรี และวิธีเฮดสเปซแกสโครมาโตรกราฟฟี

การประเมินระดับเอทานอลในเลือดโดยใช้เครื่องวิเคราะห์ลมหายใจ

อาสาสมัครเป่าลมหายใจเข้าเครื่องวิเคราะห์ลมหายใจ (Smith & Wesson รุ่น 2000) เครื่องจะวัดปริมาณเอทานอลในลมหายใจ แล้วประเมินเป็นปริมาณเอทานอลในเลือดมีหน่วยเป็น g/dl

การวิเคราะห์เอทานอลในน้ำลาย วิธีดัลเลอริเมตรี

ดัดแปลงใช้วิธีของ Lim และ Buttery[7] โดยใช้ตัวอย่างน้ำลายแทนตัวอย่างซีรัม น้ำยาที่ใช้มีดังนี้

1. สารละลายมาตรฐานเอทานอลเข้มข้น 500 mg/dl ในน้ำ
2. บัฟเฟอร์ ประกอบด้วย 2-amino-2-methy-propane-1-ol, polyoxyethylene sorbitan monolaurate ในน้ำ ปรับ pH เป็น 8.5 ด้วยกรดเกลือ
3. สารที่ทำให้เกิดสี ประกอบด้วย p-iodonitro-tetrazolium chloride, nicotinamide adenine dinucleotide และ phenazine methosulphate ในน้ำ
4. แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส suspension ในสารละลายของ ammonium sulphate และ tetrasodium pyrophosphate, decahydrate ในน้ำ
5. กรดเกลือ 1 โมล/ลิตร

เมื่อทดลองจะเกิดสารสีแดงของ Formazan และวัดความเข้มของสีด้วยเครื่อง Spectronic 20 ที่คลื่นแสง 505 nm.

การศึกษาความเชื่อถือได้ของวิธีวิเคราะห์

ศึกษาความไวของวิธีวิเคราะห์โดยกำหนดให้ปริมาณเอทานอลที่ให้ค่า absorbance เท่ากับ 0.05 เป็นความไวของวิธีวิเคราะห์ ศึกษาความเที่ยงตรงและความถูกต้องของการวิเคราะห์เอทานอล 50, 100 และ 200 mg/dl และศึกษา

ความจำเพาะโดยวิเคราะห์ acetone, methanol, isobutanol, acetaldehyde, isoamyl alcohol, n-propanol และ n-butanol ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ซึ่งคาดว่าจะรบกวนการวิเคราะห์เอทานอล โดยเติมสารดังกล่าว ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ลงในเอทานอล 100 mg/dl นำไปวิเคราะห์ ถ้าอ่านค่าความเข้มข้นได้แตกต่างไปมากกว่า ± 3 mg/dl ถือว่าปริมาณสารที่เติมลงไปรบกวนการวิเคราะห์

วิธีชุบด้วยกระดาษกรอง

ใช้น้ำยาเช่นเดียวกับวิธีคัลเลอริเมตรีโดยผสมบัฟเฟอร์ 250 ul แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส 10 ul และสารที่ทำให้เกิดสี 200 ul ผสมแล้วใช้ทันที วิธีใช้ปิเปตน้ำยา 50 ul หยดบนกระดาษกรอง No. 1 ขนาด 1.5×5 ซม. แล้วหยดสารละลายมาตรฐานเอทานอลเข้มข้น 100 mg/dl หรือตัวอย่างน้ำลาย 10 ul ทิ้งไว้ 1 นาที สังเกตความเข้มของสีแดงที่เกิดขึ้น ถ้าความเข้มของสีในตัวอย่างเข้มกว่าสีเมื่อใช้เอทานอลมาตรฐาน 100 mg/dl อ่านผลเป็นบวก ถ้าต่ำกว่าอ่านผลเป็นลบ

วิธีเฮดสเปซแกสโครมาโตกราฟฟี

ใช้ตัวอย่างน้ำลายหรือเอทานอลที่ความเข้มข้นต่าง ๆ 500 ul เติมน้ำ 500 ul และ Internal standard (n-propanol 0.8% โดยปริมาตรในน้ำ) 50 ul ใส่ในขวด 25 ml เขย่าในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 35ซ เป็นเวลา 5 นาที ฉีดไอ 500 ul เข้าเครื่องแกสโครมาโตกราฟ (Pye Unicam รุ่น GCD) โดยใช้คอลัมน์แก้วขนาด 1500×4 mm. บรรจุด้วย 0.2% Carbowax 1500 บน Carbopack C (80-100 mesh) ใช้ดีเทคเตอร์ FID อุณหภูมิคอลัมน์ 135ซ และใช้ N_2 เป็นแกสตัวพาด้วยอัตราเร็ว 40 ml/min

ผล

การวิเคราะห์เอทานอลในน้ำลาย

วิธีคัลเลอริเมตรี

กราฟมาตรฐาน รูปที่ 1 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความสามารถในการดูดกลืนแสง และความเข้มข้นของเอทานอลระหว่าง 0-250 mg/dl ได้ความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงและมีความไวของวิธีวิเคราะห์เป็น 7.5 mg/dl ของน้ำลาย ความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์เอทานอล 50, 100, 200 mg/dl มีค่าร้อยละของสัมประสิทธิ์แห่งการกระจายในการทดลองเดียวกันเป็น 0.1, 1.2 และ 2.1 และระหว่างการทดลองเป็น 1.3, 1.7 และ 9.1 ตามลำดับ (ตารางที่ 1) ความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ ในช่วงความเข้มข้นเดียวกัน มีค่าเปอร์เซ็นต์การวิเคราะห์กลับคืน อยู่ระหว่าง 95-98 (ตารางที่ 2) สำหรับความจำเพาะของวิธีวิเคราะห์ปรากฏว่า isoamyl alcohol, acetaldehyde, isobutanol, methanol และ acetone ที่ระดับความเข้มข้น 500 mg/dl, 1, 2.5, 5 และ 50 g/dl ตามลำดับไม่รบกวนการวิเคราะห์เอทานอลที่ระดับความเข้มข้น 100 mg/dl (ตารางที่ 3) สารที่รบกวน การวิเคราะห์คือ n-propanol และ n-butanol ถ้ามีความเข้มข้นสูงกว่า 10 mg/dl.

Table 1 Precision of salivary ethanol determination by colorimetry.

Concentration	Within assay		Between assay	
(mg/dl)	$\bar{X}$ ± S.D.*(mg/dl)	% CV	$\bar{X}$ ± S.D.*(mg/dl)	% CV
50	47.5±0.5	0.1	48.4±0.6	1.3
100	99.2±1.2	1.2	99.4±1.7	1.7
200	204.2±4.3	2.1	195.0±17.8	9.1

Table 2 Accuracy of salivary ethanol determination by colorimetry

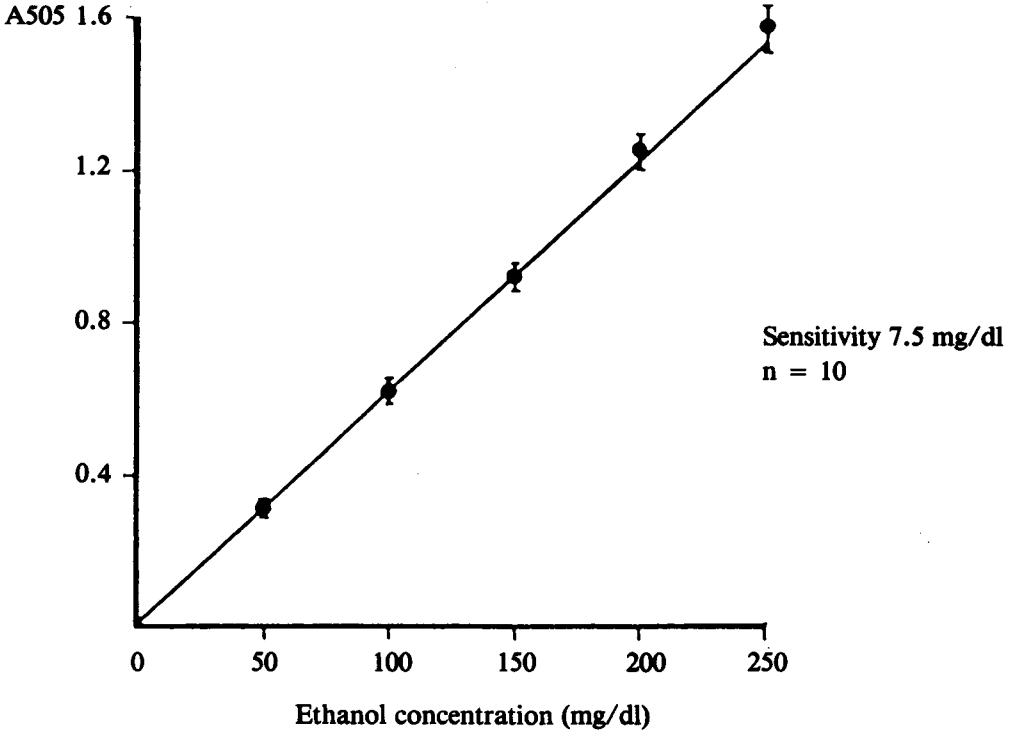
Quantity added. (mg/dl)	Quantity measured $\bar{X}$ ± S.D.*(mg/dl)	% Recovery
50	47.5±1.0	95
100	95.5±1.3	96
150	146.0±1.4	97
200	196.3±4.2	98

*n = 3

Table 3 Specificity of ethanol determination by colorimetry

Substances	Concentration of substances not interfere with the determination of ethanol at 100 mg/dl
Acetone	50 g/dl
Methanol	5 g/dl
Isobutyl alcohol	2.5 g/dl
Acetaldehyde	1 g/dl
Isoamyl alcohol	500 mg/dl
n-propyl alcohol	10 mg/dl
n-Butyl alcohol	10 mg/dl

Figure 1 Standard curve of salivary ethanol determination by colorimetry.



วิธีชุบด้วยกระดาษกรอง

ทดสอบความเชื่อถือได้ของวิธีวิเคราะห์โดยทดสอบเอทานอลในน้ำลายที่มีความเข้มข้น 0, 20, 40 จนถึง 200 mg/dl ด้วยวิธีชุบด้วยกระดาษกรอง โดยที่ผู้อ่านผล 15 คน เป็นบุคคลที่ไม่มีประสบการณ์ด้านห้องปฏิบัติการ ปรากฏว่าตัวอย่างน้ำลายที่มีเอทานอลตั้งแต่ 80-200 mg/dl อ่านผลเป็นบวก โดยมีค่าการกระจายตัวของอัตราการอ่านผลผิด ดังรูปที่ 2 จะเห็นได้ว่า น้ำลายที่มีเอทานอลเข้มข้น 80 mg/dl มีอัตราการอ่านผลผิดสูงที่สุด และเอทานอลในช่วงความเข้มข้น 100-200 mg/dl มีอัตราการอ่านผลผิดน้อยกว่า 20% จากการอ่านผลว่ามีเอทานอลด้วยระดับนี้ มีความถูกต้องโดยเฉลี่ยร้อยละ 85

วิธีเฮดสเปซแกสโครมาโตกราฟฟี

รูปที่ 3 แสดงโครมาโตแกรม การวิเคราะห์แอลกอฮอล์ชนิดต่าง ๆ ด้วยวิธีเฮดสเปซแกสโครมาโตกราฟฟี ได้กราฟมาตรฐานของการวิเคราะห์ในรูปที่ 4 ความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์เอทานอล 15, 25 และ 40 mg/dl มีค่าร้อยละของสัมประสิทธิ์แห่งการกระจายภายในการทดลองเดียวกัน เป็น 1.5, 0.5 และ 0.7 และระหว่างการทดลองเป็น 1.5, 1.6 และ 1.4 ตามลำดับ (ตารางที่ 4) ความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ในช่วงความเข้มข้นเดียวกัน มีค่าเปอเซ็นต์การวิเคราะห์กลับคืนอยู่ระหว่าง 99-101 (ตารางที่ 5)

Figure 2 Distribution of false interpretation rate of enzymatic dipstick method.

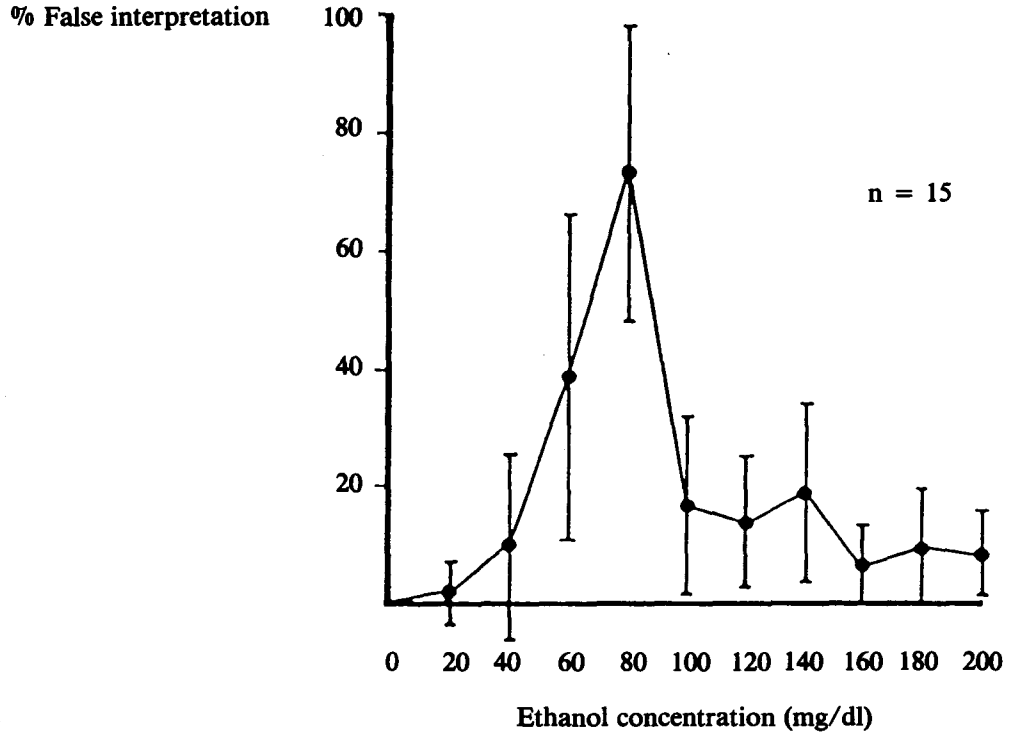


Figure 3 Chromatogram of alcohol determination by gas chromatography.

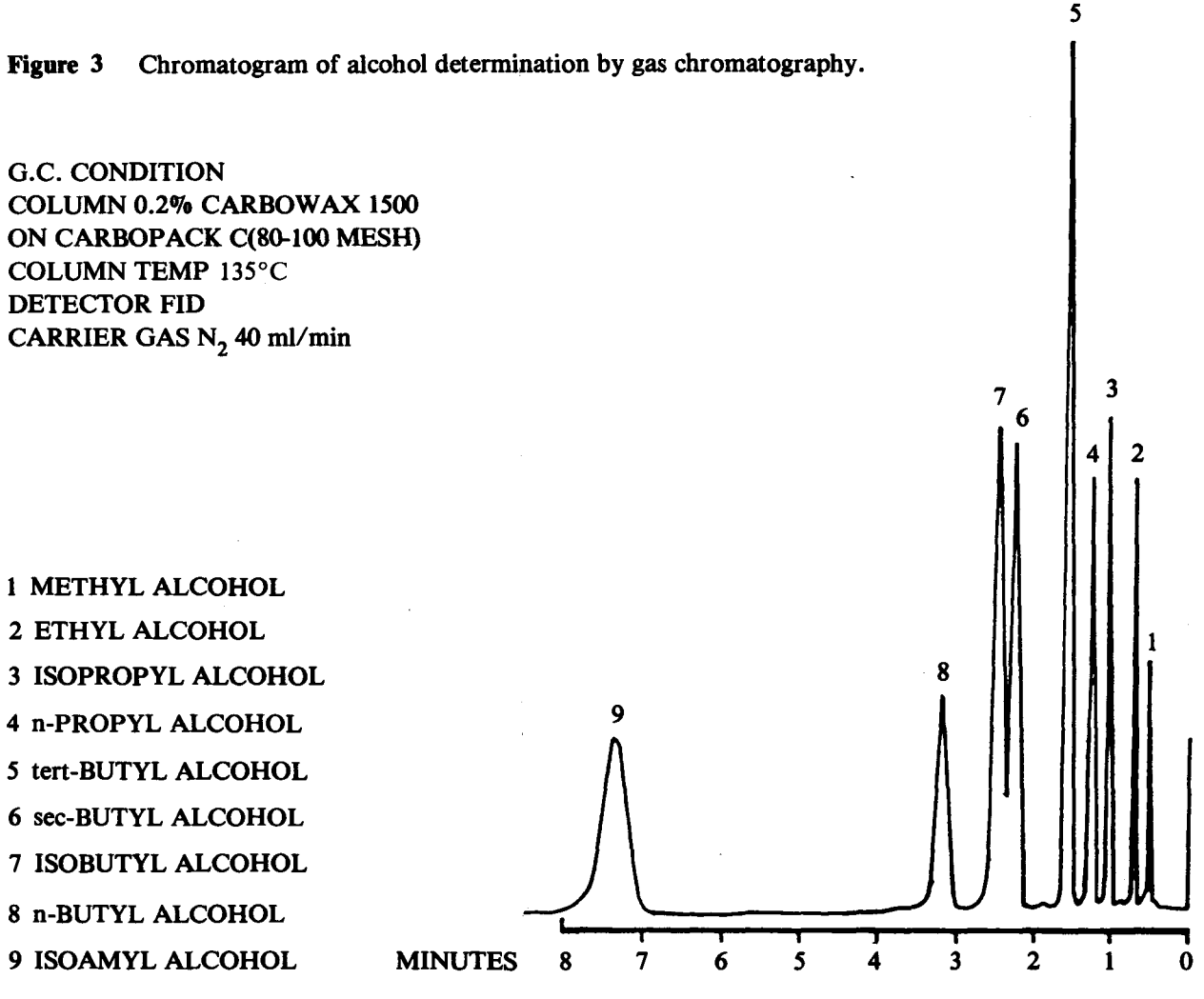
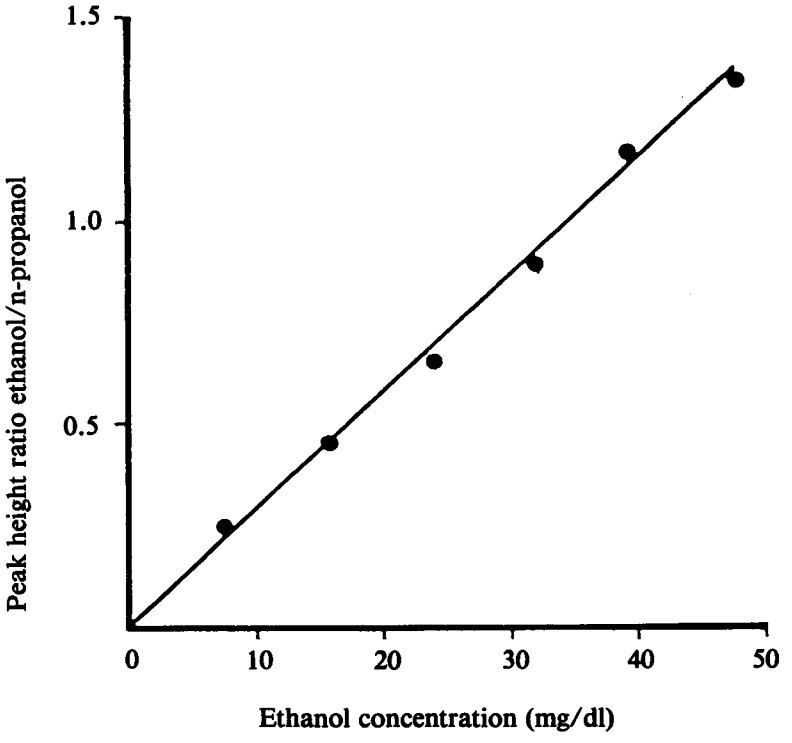


Figure 4 Standard curve of salivary ethanol determination by gas chromatography.



Column	1500×4mm 0.2% carbowax 1500 on carbopack C (80-100 mesh)	
Condition	Column temperature 135°C	
	Detector	FID
	Carrier gas	N_2 40 ml/min

Table 4 Precision of salivary ethanol determination by gas chromatography.

Concentration (mg/dl)	Within assay $\bar{X} \pm$ S.D.*(mg/dl)	% CV	Between assay $\bar{X} \pm$ S.D.*(mg/dl)	% CV
15	15.1±0.23	1.52	15.1±0.23	1.53
25	24.6±0.12	0.47	24.3±0.38	1.58
40	39.7±0.29	0.73	39.5±0.56	1.43

Table 5 Accuracy of salivary ethanol determination by gas chromatography

Quantity added (mg/dl)	Quantity measured $\bar{X} \pm$ S.D.*(mg/dl)	% Recovery
15	15.2±0.17	101
25	24.7±0.17	99
40	39.9±0.17	100

*n = 3

ผลการวิเคราะห์ปริมาณเอทานอลในเลือดที่ประเมินโดยใช้เครื่องวิเคราะห์ลมหายใจ และน้ำลายด้วยวิธีคัลเลอริเมตรี และวิธีเฮดสเปซแกสโครมาโตกราฟฟี ของอาสาสมัคร 11 ราย พบว่าสามารถตรวจพบเอทานอลในวัตถุตัวอย่างทุกตัวอย่างที่เก็บหลังการดื่ม รูปที่ 5,6,7 แสดงระดับเอทานอลในเลือดและน้ำลายอาสาสมัคร 3 ราย (พ.ม., ช.ม. และ ส.ข.) ในช่วงเวลาต่าง ๆ หลังดื่มสุรา 120, 270 และ 330 ml ตามลำดับ ระดับเอทานอลหลังดื่ม 20 นาที อยู่ระหว่าง 40-140 mg/dl ต่อจากนั้นส่วนใหญ่ระดับเอทานอลจะลดลง เมื่อเวลาผ่านไป 2 ชั่วโมง 30 นาที ระดับเอทานอลจะลดลงเหลือระหว่าง 19-85 mg/dl จากผลการวิเคราะห์พบว่าปริมาณเอทานอลในวัตถุตัวอย่างจากร่างกาย และอัตราการลดลงขึ้นกับปริมาณสุราที่ดื่ม

Figure 5 Ethanol concentrations in blood and saliva.

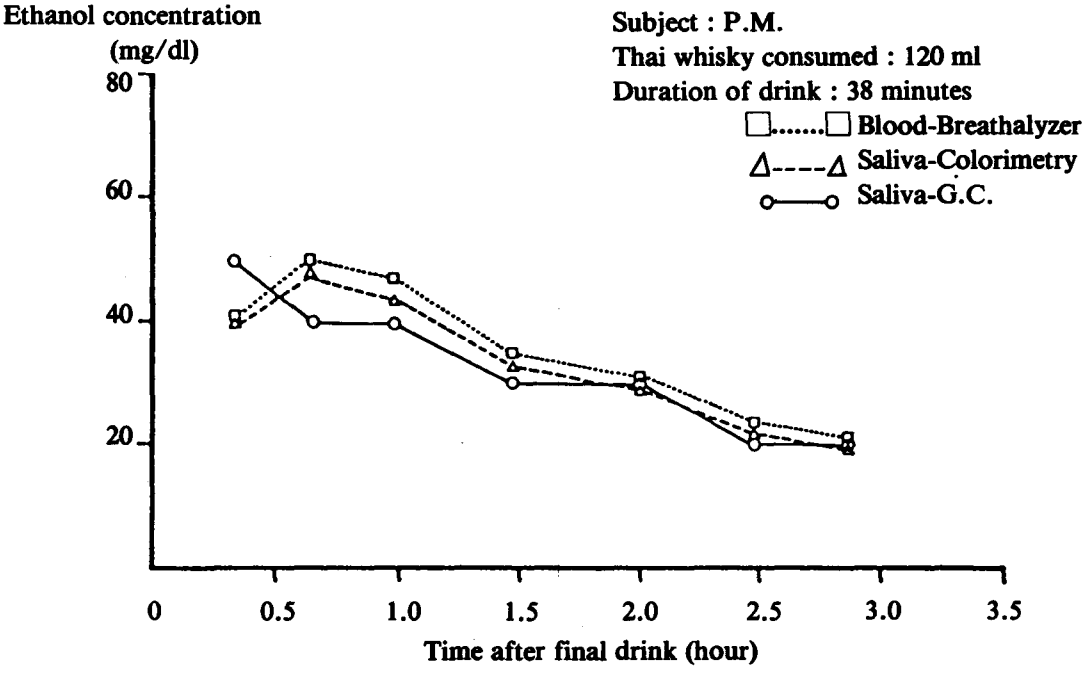


Figure 6 Ethanol concentrations in blood and saliva.

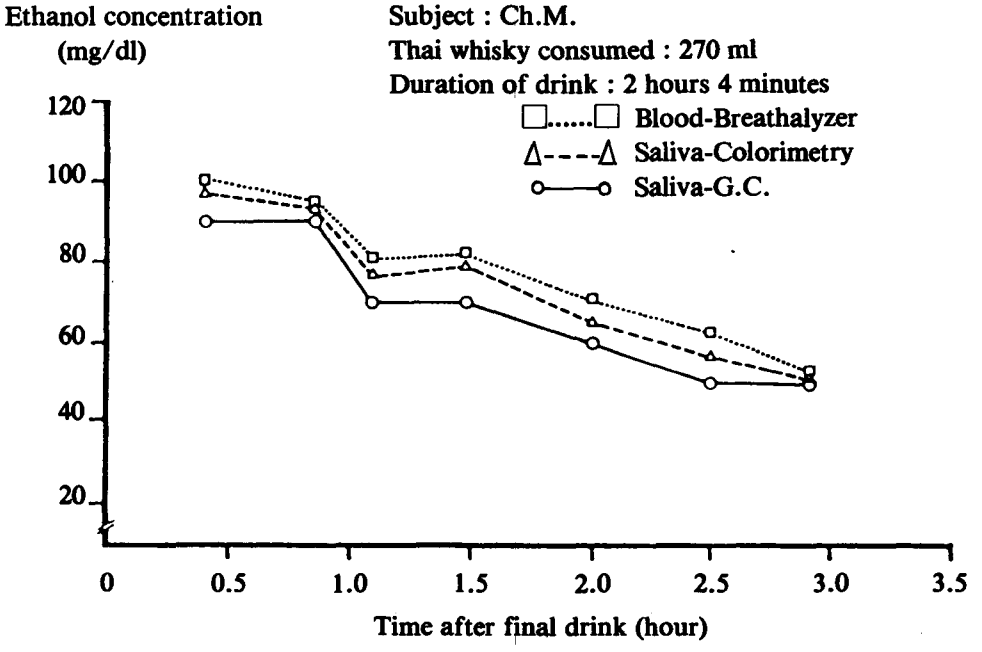
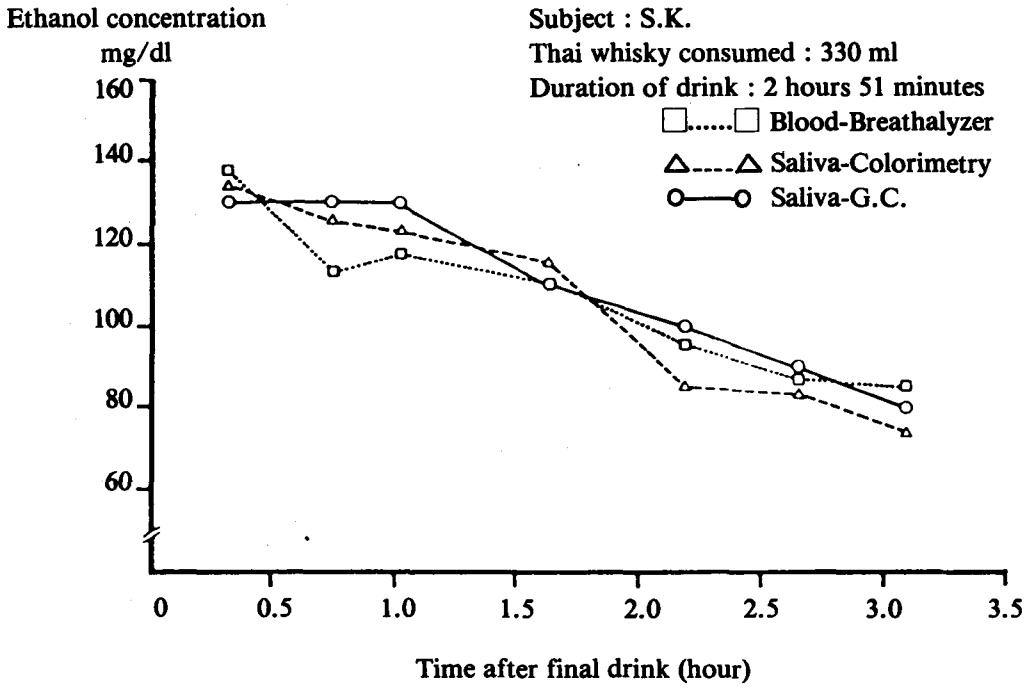


Figure 7 Ethanol concentrations in blood and saliva.



ผลการวิเคราะห์เปรียบเทียบปริมาณเอทานอลในน้ำลายระหว่าง วิธีเฮดสเปซแกสโครมาโตกราฟฟี และวิธีคัลเลอริเมตรี ของตัวอย่างที่ศึกษาจำนวน 77 ตัวอย่าง (ตัวอย่างน้ำลายก่อนดื่มสุรา 11 ตัวอย่าง ตรวจไม่พบเอทานอล จึงไม่นำมาเปรียบเทียบ) ได้ความสัมพันธ์ดังสมการ Y = 0.990x + 0.476 (รูปที่ 8 ตารางที่ 6,a) Y เป็นปริมาณเอทานอลวิเคราะห์ด้วยวิธีคัลเลอริเมตรี และ X เป็นปริมาณเอทานอลวิเคราะห์ด้วยวิธีเฮดสเปซแกสโครมาโตกราฟฟี ความคลาดเคลื่อนของการประมาณค่าบนแกน Y = 4.39 mg/dl และสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient) =

Figure 8 Correlation of salivary ethanol concentration by gas chromatography and colorimetry.

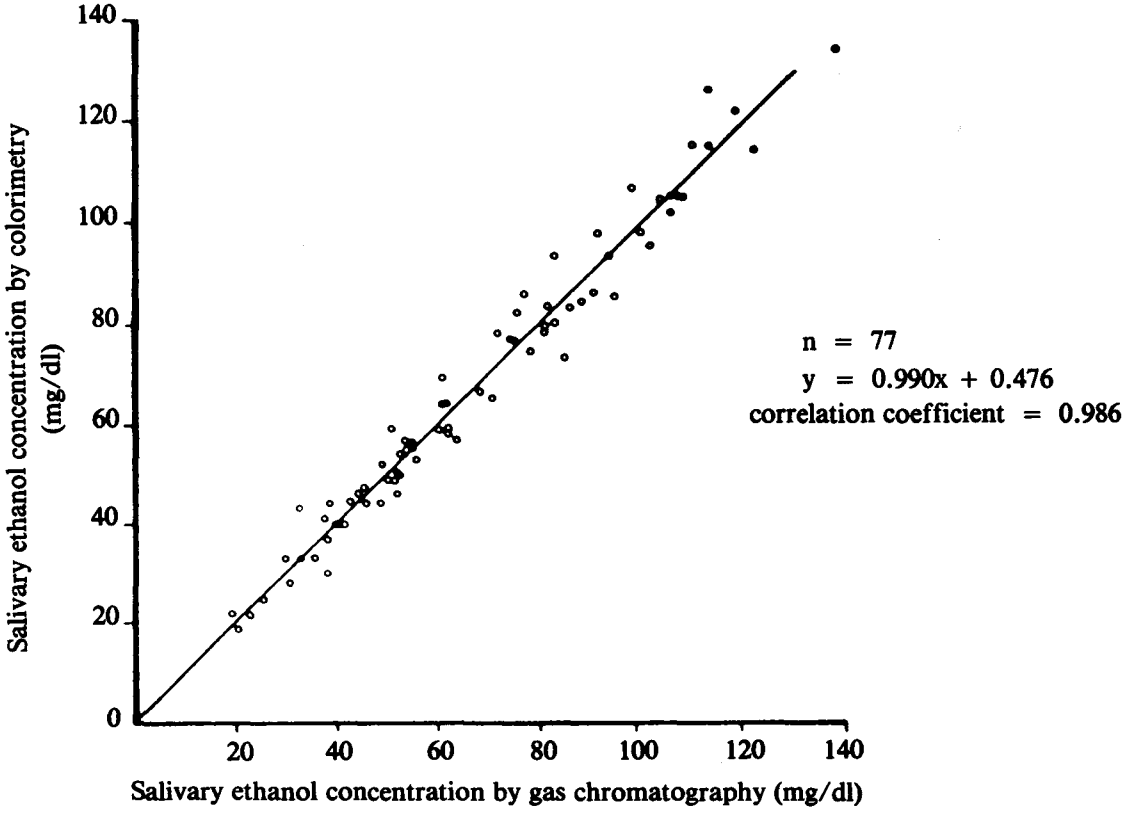


Table 6 Statistical results for ethanol comparison studies.

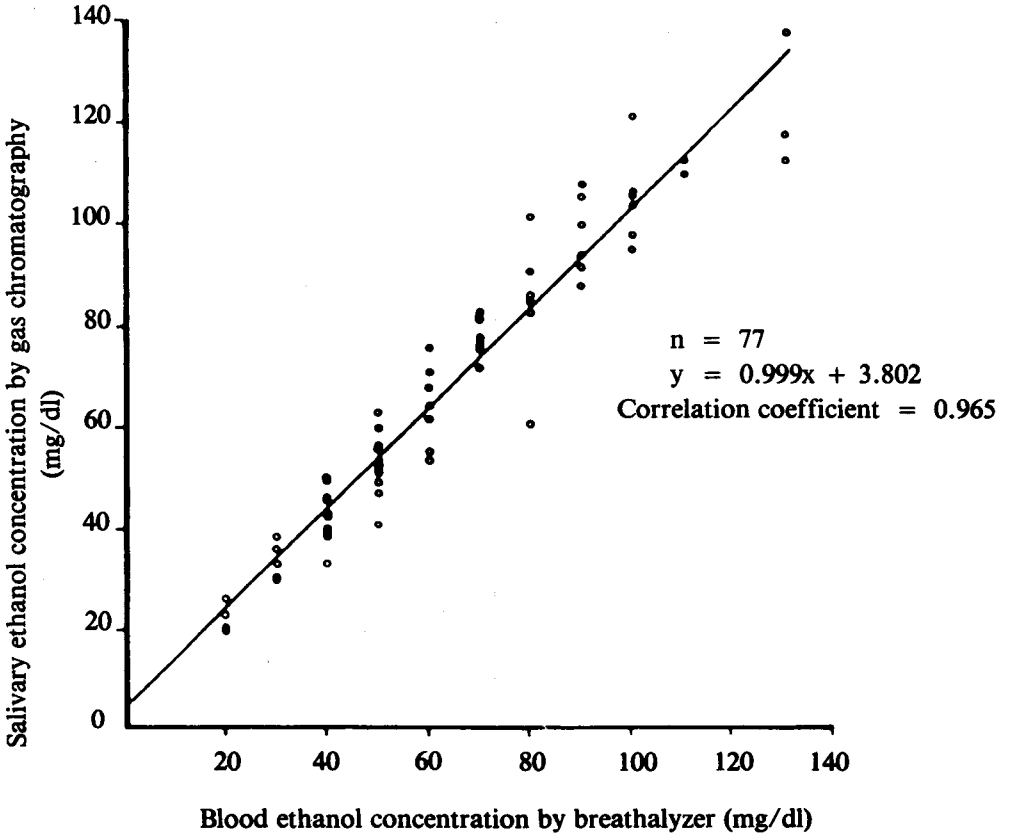
Comparison studies	N	m	b (mg/dl)	Sy/x (mg/dl)	bias (mg/dl)	SDd	t	r
a)	77	0.990	0.48	4.39	0.18	4.66	0.34	0.986
b)	77	0.999	3.80	7.35	-3.73	7.30	-4.48	0.965
c)	77	1.013	2.72	6.29	-3.55	6.26	-4.97	0.975

N = number of samples
m = slope of the least-squares line
b = the y intercept of the least squares line
Sy/x = Standard error of estimate in the y direction
bias = differences between x and y
SDd = standard deviation of differences
t = student's t-value
a = Salivary ethanol concentration by G.C. vs colorimetry
b = Blood ethanol concentration by breathalyzer vs salivary ethanol concentration by G.C.
c = Blood ethanol concentration by breathalyzer vs salivary ethanol concentration by colorimetry

0.986 สำหรับการวิเคราะห์เอทานอลในน้ำลายได้ 100 mg/dl ด้วยวิธีเฮดสเปซแกสโครมาโตกราฟฟี เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธีคัลเลอริเมตรีจะเท่ากับ 100 ± 9 mg/dl.

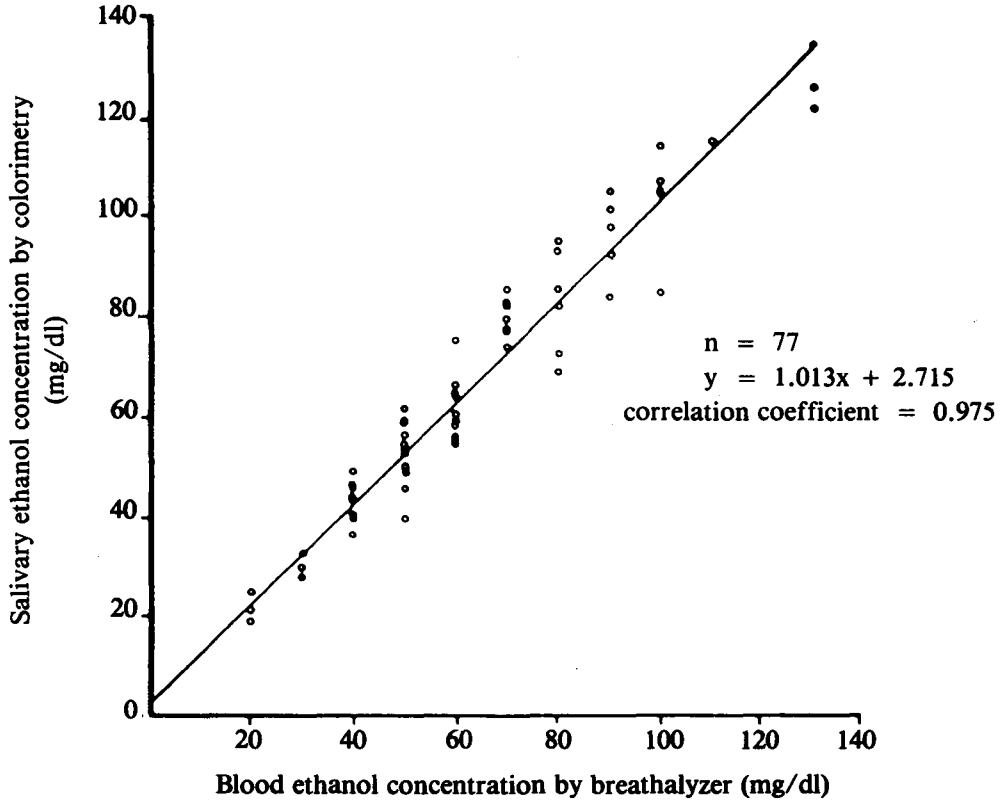
การเปรียบเทียบปริมาณเอทานอลในเลือดที่ประเมินโดยใช้เครื่องวิเคราะห์ลมหายใจ และน้ำลายด้วยวิธีเฮดสเปซ-แกสโครมาโตกราฟฟี ได้ความสัมพันธ์ดังสมการ $Y = 0.999x + 3.802$ (รูปที่ 9 ตารางที่ 6,b) Y เป็นปริมาณเอทานอลในน้ำลาย และ X เป็นปริมาณเอทานอลในเลือด ความคลาดเคลื่อนของการประมาณค่าบนแกน Y = 7.35 mg/dl และสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ = 0.965 ถ้าปริมาณเอทานอลในเลือด ที่ประเมินโดยใช้เครื่องวิเคราะห์ลมหายใจได้ 100 mg/dl เมื่อวิเคราะห์ในน้ำลายด้วยวิธีเฮดสเปซแกสโครมาโตกราฟฟี จะได้เท่ากับ 104 ± 15 mg/dl

Figure 9 Correlation of ethanol concentration in blood and saliva



การเปรียบเทียบระดับเอทานอลในเลือดที่ประเมินโดยใช้เครื่องวิเคราะห์ลมหายใจ และในน้ำลายด้วยวิธีคัลเลอริเมตรี ได้ความสัมพันธ์ดังสมการ Y = 1.013x + 2.715 (รูปที่ 9 ตารางที่ 6,c) Y เป็นปริมาณเอทานอลในน้ำลาย และ X เป็นปริมาณเอทานอลในเลือด ความคลาดเคลื่อนของการประมาณค่าบนแกน Y = 6.29 mg/dl และสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ = 0.975 ถ้าปริมาณเอทานอลในเลือดที่ประเมินโดยใช้เครื่องวิเคราะห์ลมหายใจได้ 100 mg/dl เมื่อวิเคราะห์ในน้ำลายด้วยวิธีคัลเลอริเมตรี จะได้ 104 ± 13 mg/dl.

Figure 10 Correlation of ethanol concentration in blood and saliva



วิจารณ์

พ.ร.บ. จราจรทางบกของประเทศไทยที่ใช้อยู่ในปัจจุบันเป็นฉบับปี พ.ศ. 2522 พ.ร.บ. ฉบับนี้มิได้กำหนดระดับแอลกอฮอล์ที่อนุญาตให้มีในร่างกายผู้ขับขี่ยานยนต์ หรือกำหนดวิธีตรวจวัดปริมาณแอลกอฮอล์ กฎหมายของต่างประเทศหลายแห่งยอมรับการใช้เครื่องวิเคราะห์ลมหายใจและกำหนดระดับแอลกอฮอล์ในเลือดที่ยอมให้มีได้ต่าง ๆ กัน เครื่องวิเคราะห์ลมหายใจใช้ได้สะดวกและรวดเร็ว แต่ราคาค่อนข้างสูง ทดสอบได้เฉพาะผู้ที่สามารถเป่าลมหายใจเข้าเครื่องได้เท่านั้น ผลที่วัดได้อาจมีค่าลบคลาดเคลื่อน (false negative) ได้ ค่าแอลกอฮอล์ในเลือดที่ประเมินโดยใช้เครื่องวิเคราะห์ลมหายใจ ประมาณร้อยละ 15 เทียบเท่ากับผลการวิเคราะห์ปริมาณแอลกอฮอล์ในเลือดด้วยวิธีเฮดสเปซแกสโครมาโตกราฟฟี ภายในเกณฑ์ร้อยละ ±0.01 ประมาณร้อยละ 5 ให้ค่าสูงกว่า นอกนั้นจะให้ผลต่ำกว่า[5] ปัจจุบันกฎหมายของประเทศไทย ยังไม่ยอมรับการใช้เครื่องวิเคราะห์ลมหายใจเพื่อประเมินค่าแอลกอฮอล์ในเลือดแต่ได้มีการศึกษาเกี่ยวกับเครื่องวิเคราะห์ลมหายใจ เพื่อนำไปใช้ในอนาคต เครื่องวิเคราะห์ลมหายใจจะใช้ประเมินค่าแอลกอฮอล์ในเลือด ณ ที่เกิดอุบัติเหตุหรือสถานีตำรวจ แล้วจะมีการวิเคราะห์แอลกอฮอล์ในตัวอย่างเลือดด้วยวิธีเฮดสเปซแกสโครมาโตกราฟฟี ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐาน เพื่อตรวจสอบผลให้ชัดเจนอีกครั้งหนึ่ง การวิเคราะห์แอลกอฮอล์ในตัวอย่างเลือดไม่สะดวกในทางปฏิบัติ ผู้วิจัยจึงศึกษาในตัวอย่างน้ำลาย และศึกษาเปรียบเทียบกับค่าแอลกอฮอล์ในเลือดที่ประเมินโดยใช้เครื่องวิเคราะห์ลมหายใจ ขณะเดียวกันศึกษาเปรียบเทียบวิธีวิเคราะห์แอลกอฮอล์ในน้ำลายระหว่างวิธีคัลเลอริเมตรี และวิธีเฮดสเปซแกสโครมาโตกราฟฟี ซึ่งทั้ง 2 วิธีมีข้อดีและข้อจำกัดต่างกัน (ตารางที่ 7)

Table 7 Comparison of methods for determination of ethanol.

Method	Apparatus required	Final measurement	Specificity	Advantages	Limitations
Head-space gas chromatography	Gas chromatograph	Recorder	- Highly selective for ethanol	- High reliability	- High cost equipment - High technical skill operator
Colorimetry	Spectronic 20	Absorption reading	- Selective for ethanol - Some interference by n-propanol n-butanol	- Simple, rapid, reliable and inexpensive	- Low temperature storage of reagents
Dipstick	–	Eye observation	- As colorimetry	- Simple, rapid and inexpensive - Preliminary screening of a large number of samples	- Semiquantitative analysis - Low temperature storage of reagents
Breath analysis	Breathalyzer	Printer	- Selective for ethanol - Some interference by acetone	- Simple, rapid and reliable	- Relatively high cost of equipment

วิธีดัลเลอริเมตรี เป็นวิธีวิเคราะห์ปริมาณแอลกอฮอล์ที่ง่าย สะดวก มีประสิทธิภาพสูง และราคาพอสมควร สีแดงของ Formazan ที่เกิดขึ้นเสถียรอยู่ได้นาน ความจำเพาะของปฏิกิริยาอาจถูกรบกวนโดยแอลกอฮอล์โมเลกุลเล็ก ๆ ที่มีสูตรโครงสร้างเป็นสันตรง เช่น n-propanol และ n-butanol แต่สารทั้ง 2 ชนิดเป็นสารพิษที่พบในร่างกายน้อยมาก วิธีชุบด้วยกระดาษกรอง อาจใช้วัดเอทานอลแบบกึ่งปริมาณโดยผู้ที่ไม่มีความชำนาญทางห้องปฏิบัติการ

วิธีเฮดสเปซแกสโครมาโตกราฟฟี เป็นวิธีมาตรฐานที่ใช้วิเคราะห์ปริมาณเอทานอลในเลือด มีความเชื่อถือได้สูง แต่ต้องใช้เครื่องมือราคาแพง และผู้วิเคราะห์ที่มีความชำนาญ สำหรับการควบคุมอุณหภูมิที่ 35ซ สามารถวิเคราะห์ที่อุณหภูมิห้องได้โดยเติมโซเดียมคลอไรด์ลงในตัวอย่างเพื่อช่วยให้เอทานอลระเหยได้มากขึ้น

ผลการศึกษาเปรียบเทียบวิธีวิเคราะห์ทั้ง 3 วิธีพบว่า เมื่อวัดปริมาณเอทานอลในเลือดที่ประเมิน โดยใช้เครื่องวิเคราะห์ลมหายใจได้ 100 mg/dl จะวัดระดับเอทานอลในน้ำลายด้วยวิธีเฮดสเปซแกสโครมาโตกราฟฟี และวิธีดัลเลอริเมตรีได้ 104 ± 15 และ 104 ± 13 mg/dl ตามลำดับ การประเมินปริมาณเอทานอลโดยใช้เครื่องวิเคราะห์ลมหายใจอาจมีความคลาดเคลื่อนเนื่องจาก อัตราส่วนที่ใช้เปลี่ยนปริมาณเอทานอลในลมหายใจเป็นเอทานอลในเลือด อุณหภูมิขณะทดสอบ และเครื่องวิเคราะห์ลมหายใจระบุค่ามีหน่วยเป็น g/dl เมื่อเทียบค่าเป็นหน่วย mg/dl ค่าเอทานอลในเลือดจากเครื่องวัดลมหายใจ จะมีความคลาดเคลื่อนได้ถึง ± 10 mg/dl การใช้ค่าจากเครื่องวิเคราะห์ลมหายใจเป็นมาตรฐาน เพื่อเปรียบเทียบกับวิธีอื่น จึงต้องคำนึงถึงจุดนี้ด้วย การเปรียบเทียบวิธีวิเคราะห์เอทานอลในน้ำลายระหว่างวิธีเฮดสเปซ-แกสโครมาโตกราฟฟี และวิธีดัลเลอริเมตรี พบว่า เมื่อวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำลายด้วยวิธีเฮดสเปซแกสโครมาโตกราฟฟีได้ 100 mg/dl วิธีดัลเลอริเมตรีจะวิเคราะห์ได้ 100 ± 9 mg/dl แสดงว่าผลการวิเคราะห์เอทานอลในน้ำลายทั้ง 2 วิธี ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยยะสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 6,a)

การเลือกวิธีวิเคราะห์ปริมาณเอทานอลในวัตถุตัวอย่างจากร่างกายเพื่อบ่งชี้การดื่มแอลกอฮอล์ไปใช้ในการป้องกันหรือช่วยลดอุบัติเหตุที่สืบเนื่องจากการดื่มสุราได้นั้น ขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกรณีที่จำเป็นต้องแปลผลการทดลองเพื่อประโยชน์ในการดำเนินการด้านกฎหมาย ได้แก่ พระราชบัญญัติซึ่งจะกำหนดระดับเอทานอลที่อนุญาตให้มีในร่างกายผู้ขับขี่ยานยนต์ วิธีวิเคราะห์ที่กำหนด

ให้ใช้ ความคลาดเคลื่อนของผลการวิเคราะห์ที่สามารถยอมรับได้ ความพร้อมทางด้านเครื่องมือ อุปกรณ์ สารเคมี และผู้วิเคราะห์ คณะผู้วิจัยเสนอให้พยายามใช้ตัวอย่างน้ำลาย เนื่องจากการเก็บตัวอย่างน้ำลายสะดวกกว่าการเก็บตัวอย่างเลือด ไม่ต้องอาศัยบุคลากรทางการแพทย์ อย่างไรก็ตามระดับแอลกอฮอล์ที่วิเคราะห์ได้จากวัตถุตัวอย่างขึ้นอยู่กับปริมาณสุราที่ดื่ม และช่วงเวลาที่ดื่ม นอกจากนี้ยังขึ้นอยู่กับลักษณะเฉพาะของแต่ละบุคคลในการที่ตับจะทำลายแอลกอฮอล์และประวัติการดื่มสุราด้วย การกำหนดระดับแอลกอฮอล์ในเลือดและวิธีวิเคราะห์แอลกอฮอล์ใน พ.ร.บ. การจราจร จึงเป็นสิ่งที่ต้องระมัดระวังเป็นอย่างสูง เพื่อให้เกิดประสิทธิผลในการปฏิบัติ

สรุป

การศึกษาเปรียบเทียบวิธีวิเคราะห์เอทานอลในวัตถุตัวอย่างจากร่างกายโดยวิธีเฮดสเปซแกสโครมาโตกราฟฟี วิธีดัลเลอริเมตรี วิธีชุบด้วยกระดาษกรอง และวิธีใช้เครื่องวิเคราะห์ลมหายใจ วัตถุตัวอย่างจากร่างกายที่ศึกษาคือน้ำลายและลมหายใจ เครื่องวิเคราะห์ลมหายใจจะวัดเอทานอลในลมหายใจแล้วประเมินเป็นปริมาณเอทานอลในเลือด ผลการวิเคราะห์เปรียบเทียบปริมาณเอทานอลในเลือด และน้ำลายของอาสาสมัครที่ดื่มสุรา ปรากฏว่า ถ้าปริมาณเอทานอลในเลือดที่ประเมินโดยใช้เครื่องวิเคราะห์ลมหายใจวัดได้ 100 mg/dl เมื่อวิเคราะห์น้ำลายด้วยวิธีเฮดสเปซแกสโครมาโตกราฟฟี และวิธีดัลเลอริเมตรี จะได้ 104 ± 15 และ 104 ± 13 mg/dl ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบวิธีวิเคราะห์เอทานอลในน้ำลายระหว่างวิธีเฮดสเปซแกสโครมาโตกราฟฟี และวิธีดัลเลอริเมตรี ปรากฏว่าถ้าวิเคราะห์ด้วยวิธีเฮดสเปซแกสโครมาโตกราฟฟีได้ 100 mg/dl วิธีดัลเลอริเมตรีได้ 100 ± 9 mg/dl ผลการศึกษาแสดงถึงความเป็นไปได้ที่จะใช้ระดับเอทานอลในน้ำลาย ซึ่งวัดโดยวิธีเฮดสเปซแกสโครมาโตรกราฟฟี หรือวิธีดัลเลอริเมตรี เป็นเครื่องบ่งชี้ระดับเอทานอลในเลือด

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ พ.ต.อ.หญิง ปรุงจันทน์ ทินกร ณ อยุธยา รองผู้บังคับการ สถาบันนิติเวชวิทยา สำนักงานแพทย์ใหญ่กรมตำรวจ ที่ได้กรุณาให้ความช่วยเหลือในการให้ยืมเครื่องมือ Breathalyzer และให้คำแนะนำในการดำเนินงานอย่างดียิ่ง

อ้างอิง

1. เอกสารของกองสถิติสาธารณสุข สำนักงานปลัดกระทรวง กระทรวงสาธารณสุข, 2528
2. ไพฑูรย์ หลิมรัตน์ และคณะ, การวิจัยหาระดับแอลกอฮอล์ในเลือดของผู้ประสบอุบัติเหตุการจราจรทางบกในเขตกรุงเทพมหานคร. เวชสารแพทย์ตำรวจ 2526 เมษายน; 9(1) : 1-17
3. Christmore DS, Kelly RC, Doshier LA. Improved recovery and stability of ethanol in automated headspace analysis. J Forensic Sci 1984 Oct ; 29(4) : 1038-1044
4. Mendenhall CL, MacGee J, Green ES. Simple rapid and sensitive method for the simultaneous quantitation of ethanol and acetaldehyde in biological materials using headspace gas chromatography. J Chromatogr Sci 1980 Mar ; 190(1) : 197-200
5. Biasotti AA. The role of the forensic scientist in the application of chemical tests for alcohol in traffic law enforcement. J Forensic Sci 1984 Oct ; 29(4) : 1164-1172
6. Emerson VJ, Holleyhead R, Isaacs, MDJ, Fuller NA, Hunt DJ. The measurement of breath alcohol : the laboratory evaluation of substantive breath test equipment and the report of an operational police trial. J Forens Sci Soc 1980 Jan ; 20(1) : 3-70
7. Lim HH, Buttery JE. Determination of ethanol in serum by an enzymatic PMS-INT colorimetric method. Clin Chim Acta 1977 Feb; 75(1) : 9-12