Study of Carboxyhemoglobin Level in Postmortem Blood

การศึกษาระดับคาร์บอกซีฮีโมโกลบินในเลือดภายหลังตาย

Worawit Vanichkulbodee M.D.*, Wichai Wongchanapai M.D. LL.B. Ph.D.*, Somboon Thamtakerngkit M.D. LL.B.*

*Department of Forensic Medicine, Faculty of Medicine, Siriraj Hospital, Mahidol University, Bangkok, Thailand

วรวิทย์ วณิชกุลบดี พบ.†, วิชัย วงศ์ชนะภัย , พ.บ., น.บ., ปร.ด.†, สมบูรณ์ ธรรมเถกิงกิจ, พ.บ., น.บ.†

†ภาควิชานิติเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพ, ประเทศไทย

ABSTRACT

Objective: Blood carboxyhemoglobin (COHb) level is essential for determining the cause of death in some unnatural death. This study determined the effect of blood sample storage time and temperature on COHb level analysis.

Method: The blood from 62 dead bodies was collected in sodium fluoride tubes and spiked with carbon monoxide. After COHb was analyzed by spectrophotometry, each sample was split equally. One portion was kept at room temperature; the other was kept at 4ºC. Both halves were retrieved for COHb determining at 0, 3, 6, 24, 48 and 72 hours.

Results: The study showed that mean of carboxyhemoglobin level, when kept in 4 ºC at 0 hour was 64.81%, 3 hours was 65.81%, 6 hours was 64.23%, 24 hours was 61.69%, 48 hours was 61.51 %, 72 hours was 62.40 % and in room temperature at 0 hour was 64.81%, 3 hours was 62.23%, 6 hours was 63.55%, 24 hours was 62.45%, 48 hours was 63.51 %, 72 hours was 66.63 %. Statistic analysis of blood carboxyhemoglobin level kept in 4 ºC, when compared with 0 hours, at 3-24 and 72 hours are not statistic significant difference, but 48 hours is statistic significant P=0.041. Statistic analysis of blood carboxyhemoglobin level kept in room temperature, when compared with 0 hours, at 3-72 hours are not statistic significant. There is no statistic significant difference ($P<0.05$) of COHb levels obtained from the samples stored at room temperature with various storage time when compared to immediate analysis. Storage of blood at room temperature and at 4 ºC also showed no statistic significant difference when analyses for COHb at various time up to 72 hours. At 3-24 hours showed no statistic significant difference, but 48 to 72 hours revealed statistic significant difference P= 0.041 and 72 hours P=0.022.

Conclusions: The findings from this study suggest that COHb in sodium fluoride tubes is stable within 72 hours when stored at room temperature.

Keywords: Carboxyhemoglobin, Spectrophotometry, Sodium Fluoride tube

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์: การตรวจหาปริมาณคาร์บอกซีฮีโมโกลบินในเลือดจะเป็นพยานหลักฐานสำคัญที่จะพิสูจน์สาเหตุการตายในรายที่เสียชีวิตโดยผิดธรรมชาติ งานวิจัยนี้ทำขึ้นเพื่อศึกษาผลของระยะเวลาและอุณหภูมิในการเก็บตัวอย่างต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณคาร์บอกซีฮีโมโกลบินในเลือด

วิธีการ:เก็บเลือดจากศพ 62 รายใส่สารโพแทสเซียมออกซาเลตและโซเดียมฟลูออไรด์ นำมาพ่นก๊าซคาร์บอนมอนอกไซด์ในเลือดและแบ่งเลือดแต่ละรายเป็น 2 ตัวอย่าง เก็บในอุณหภูมิห้องและที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ตรวจหาระดับ%คาร์บอกซีฮีโมโกลบินด้วยเครื่อง spectrophotometry ที่เวลา 0, 3, 6, 24, 48และ72 ชั่วโมง

ผลการศึกษา: ระดับเปอร์เซนต์คาร์บอกซีฮีโมโกลบินในเลือดที่เก็บไว้ในอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสมีค่าเฉลี่ยที่ไม่เปลี่ยนแปลงทางสถิติระหว่างเวลา 24 ชั่วโมงแรกและ72ชั่วโมง (65.81%, 64.23%, 61.69%, 62.403%) และมีค่าลดลง (P =0.041) ที่เวลา48 ชั่วโมง (61.51 %) ขณะที่ค่าเปอร์เซนต์คาร์บอกซีฮีโมโกลบินของเลือดที่เก็บในอุณหภูมิห้องตลอด72ชั่วโมง ไม่มีการเปลี่ยนแปลงทางสถิติ และเมื่อเปรียบเทียบระดับคาร์บอกซีฮีโมโกลบินในเลือดที่เก็บในอุณหภูมิห้องและที่ 4 องศาเซลเซียสในแต่ละช่วงเวลาพบว่าใน24ชั่วโมงแรก ไม่มีความแตกต่างกัน แต่ที่เวลา48 และ 72 ชั่วโมงพบว่ามีการเพิ่มขึ้นของระดับคาร์บอกซีฮีโมโกลบินในเลือดที่เก็บในอุณหภูมิห้องอย่างมีนัยสำคัญ P= 0.041 และ0.022 ตามลำดับ

สรุปผลการศึกษา: เลือดที่เก็บในหลอดโซเดียมฟลูออไรด์ เมื่อเก็บเลือดไว้ในอุณหภูมิห้องและที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ไม่มีการลดลงในช่วงระยะเวลา 72 ชั่วโมง แต่มีการเพิ่มขึ้นของคาร์บอกซีฮีโมโกลบินในเลือดที่เก็บในอุณหภูมิห้องเมื่อเทียบกับการเก็บในอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

บทนำ

การตรวจหาระดับคาร์บอกซีฮีโมโกลบินในเลือด(carboxyhemoglobin, COHb) จะเป็นพยานหลักฐานสำคัญที่จะพิสูจน์สาเหตุการตายจากก๊าซคาร์บอนมอนมอนอกไซด์ ซึ่งควรจะต้องตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างส่งตรวจอย่างรวดเร็วเพื่อให้ผลระดับคาร์บอกซีฮีโมโกลบินที่ได้มีความน่าเชื่อถือแต่ไม่สามารถกระทำได้ในทางปฏิบัติจึงต้องเก็บเลือดเพื่อทำการส่งตรวจในเวลาราชการซึ่งมีปัจจัยเรื่องระยะเวลาและอุณหภูมิในการรักษาตัวอย่างก่อนทำการตรวจวิเคราะห์ (1, 2, 3, 4, 5)

ทั้งนี้ยังไม่ปรากฏว่ามีข้อมูลหรือการศึกษาในประเทศไทยมาก่อน ดังนั้นจึงศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการเปลี่ยนแปลงของระดับคาร์บอกซีฮีโมโกลบินในเลือดเปรียบเทียบช่วงเวลาและอุณหภูมิที่เก็บรักษาตัวอย่าง

วิธีการศึกษา

การเก็บตัวอย่าง

เจาะเลือด จากศพที่มาชันสูตรผ่าศพ ณ ภาควิชานิติเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล จำนวน 62 ราย แต่ละรายปริมาณ 5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดโซเดียมฟลูออไรด์และโพแทสเซียมออกซาเลต ผสมให้เลือดกับสารในหลอดเข้ากันดีและนำส่งยังห้องปฏิบัติการทันที

การเตรียมตัวอย่าง

1.นำเลือดมาพ่นด้วยก๊าซคาร์บอนมอนอกไซด์ 99.99% เพื่อให้ได้ระดับคาร์บอกซีฮีโมโกลบินเริ่มต้นที่ระดับต่างๆกัน

2.นำเลือดตัวอย่างแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่เก็บไว้ในอุณหภูมิห้อง และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

การตรวจวิเคราะห์

1.ทำการตรวจหาระดับคาร์บอกซีฮีโมโกลบินในเลือดด้วยเทคนิค Spectrophotometry(6) โดยทำการวิเคราะห์ระดับคาร์บอกซีฮีโมโกลบินในเลือดเริ่มต้น (T0) ก่อนแยกเก็บแต่ละกลุ่มตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิห้อง และ 4 องศาเซลเซียส

2.ทำการตรวจวิเคราะห์หาระดับคาร์บอกซีฮีโมโกลบินในเลือดตัวอย่างแต่ละกลุ่ม ที่ช่วงเวลาต่างๆ คือ 3, 6, 24, 48, 72 ชั่วโมง

ขั้นตอนการตรวจ

1.นำตัวอย่างเลือด 100 ไมโครลิตร มาใส่ใน 0.1% Ammonium hydroxide จนได้ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

2.ดูดตัวอย่างแบ่งเป็น 3 หลอด หลอดละ 5 มิลลิลิตร

หลอดที่ 1 นำมาพ่นด้วยก๊าซคาร์บอนมอนอกไซด์ 99.99% ที่ความดัน 2 psi นาน 10 นาที เพื่อเป็น Positive control

หลอดที่ 2 นำมาพ่นด้วยก๊าซออกซิเจน 99.99% ที่ความดัน 2 psi นาน 10 นาที เพื่อเป็น Negative control

หลอดที่ 3 ไม่ต้องพ่นก๊าซใดๆ

3.นำตัวอย่างทั้ง 3 หลอด มาใส่สาร Sodium dithionite หลอดละ 20 มิลลิกรัม แล้วนำไปตรวจหาระดับคาร์บอกซีฮีโมโกลบินในเลือดด้วยเครื่อง Spectrophotometer(6, 7)

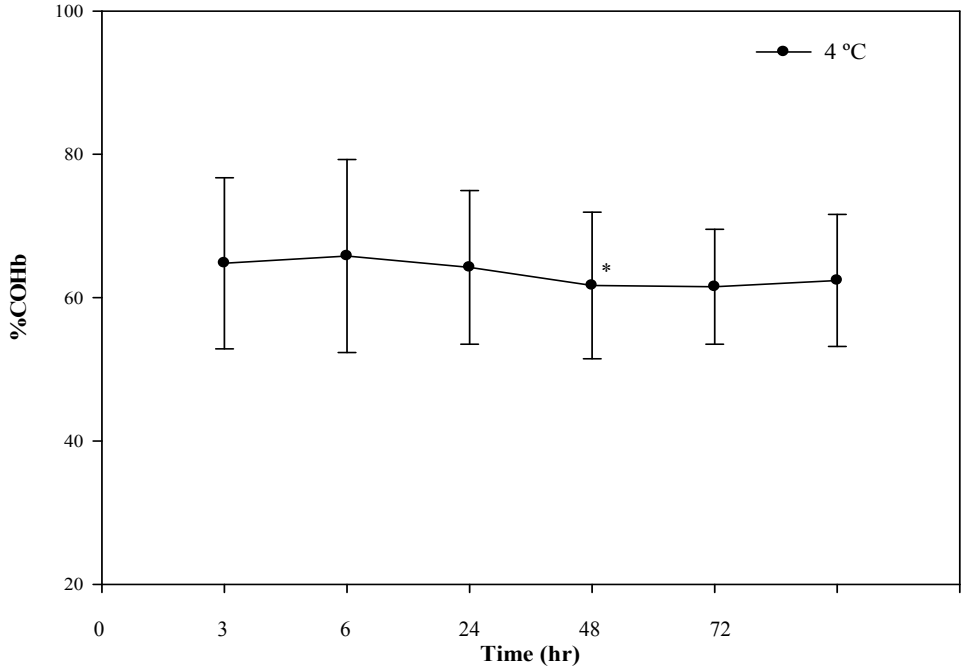
การวิเคราะห์ข้อมูล

ผลการวิเคราะห์รายงานเป็นระดับเปอร์เซนต์คาร์บอกซีฮีโมโกลบินในเลือด (ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตราฐาน) วิเคราะห์เปรียบเทียบทางสถิติโดยใช้วิธี Pair t-test

ผลการศึกษา

การเก็บรักษาเลือดที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เมื่อเปรียบเทียบกับเวลา

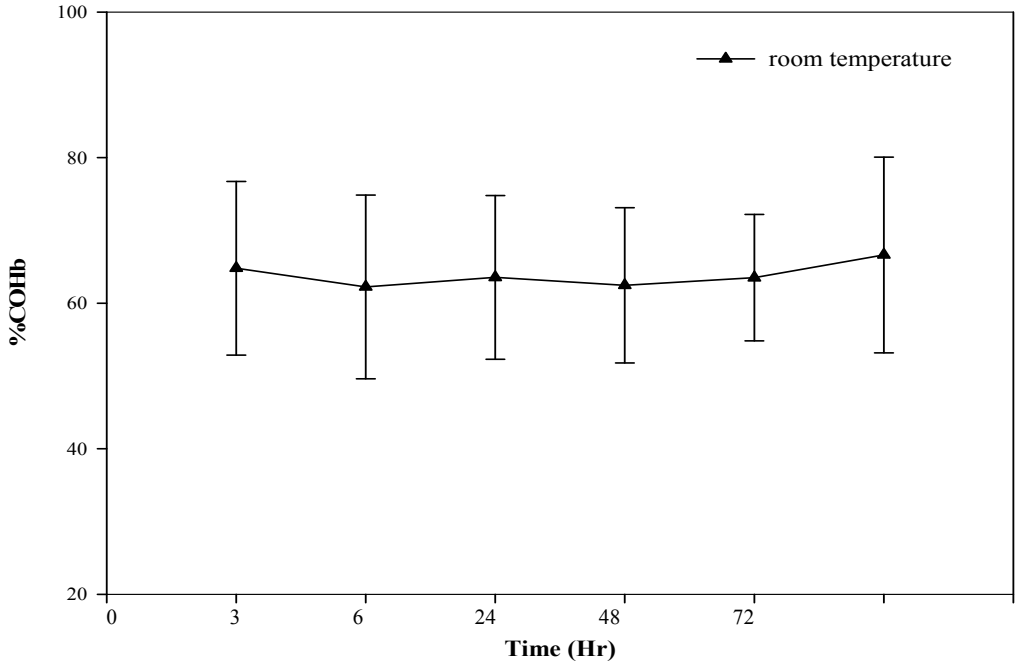
ค่าเฉลี่ยระดับคาร์บอกซีฮีโมโกลบินในเลือดที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ที่เวลาเริ่มต้น 0 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ 64.81 ± 1.19%, ค่าเฉลี่ยที่เวลา 3 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ 65.81 ± 1.35%, ค่าเฉลี่ยที่เวลา 6 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ 64.23 ± 1.07%, ค่าเฉลี่ยที่เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง มีค่าลดลงเท่ากับ 61.69 ± 1.02%, 61.51 ± 8.01%, 62.40% ± 9.21% ตามลำดับ (แผนภาพที่ 1) จากการศึกษาพบว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในระยะเวลา 24 ชั่วโมงและ 72 ชั่วโมง เมื่อเทียบกับเวลาเริ่มต้น แต่ที่เวลา 48 ชั่วโมงมีการลดลงประมาณ 3% อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P = 0.041)



แผนภาพที่ 1 แผนภาพแสดงค่าเฉลี่ยของระดับคาร์บอกซีฮีโมโกลบินในเลือดที่เก็บในอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ที่เวลา 0, 3, 6, 24, 48และ 72ชั่วโมง (N=62) (* =P<0.05 VS T0)

การเก็บรักษาเลือดที่อุณหภูมิห้อง เมื่อเปรียบเทียบกับเวลา

ค่าเฉลี่ยระดับคาร์บอกซีฮีโมโกลบินในเลือดที่อุณหภูมิห้อง ที่เวลาเริ่มต้น 0 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ 64.81 ± 1.19%, ค่าเฉลี่ยที่เวลา 3 ชั่วโมงมีค่าเท่ากับ 62.23 ± 1.26%, ค่าเฉลี่ยที่เวลา 6 ชั่วโมงมีค่าเท่ากับ 63.54 ± 1.24%, ค่าเฉลี่ยที่เวลา 24 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ 62.45 ± 1.07 %, ค่าเฉลี่ยที่เวลา 48 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ 63.51 ± 8.68%, ค่าเฉลี่ยที่เวลา 72 ชั่วโมงเพิ่มขึ้นเล็กน้อย มีค่าเท่ากับ 66.63 ± 1.34 % (แผนภาพที่ 2)



แผนภาพที่ 2 แผนภาพแสดงค่าเฉลี่ยของระดับคาร์บอกซีฮีโมโกลบินในเลือดที่เก็บในอุณหภูมิห้อง ที่เวลา 0, 3, 6, 24, 48และ 72 ชั่วโมง (N=62)

จากการศึกษาพบว่าในช่วง 3, 6, 24 และ 48 ชั่วโมง มีอัตราการลดลงเล็กน้อย และไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ และที่เวลา 72 ชั่วโมงพบว่ามีการเพิ่มขึ้นของระดับคาร์บอกซีฮีโมโกลบินแต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ

การเปรียบเทียบระหว่างการเก็บรักษาเลือดที่อุณหภูมิห้องและที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ณ ช่วงเวลาเดียวกัน

เมื่อเปรียบเทียบในช่วงเวลาเดียวกัน การเก็บเลือดในช่วงเวลา 24 ชั่วโมงแรกไม่มีความแตกต่างของระดับคาร์บอกซีฮีโมโกลบินอย่างมีนัยสำคัญ และเมื่อเวลา 48-72 ชั่วโมงพบว่าเลือดที่เก็บในอุณหภูมิห้องมีระดับคาร์บอกซีฮีโมโกลบินสูงกว่าเลือดที่เก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส อย่างมีนัยสำคัญ (P = 0.041 และ 0.022 ตามลำดับ)

อภิปราย

ก๊าซคาร์บอนมอนอกไซด์ (Carbon monoxide, CO) เป็นก๊าซที่ไม่มีสี ไม่มีกลิ่น เกิดขึ้นจากการเผาไหม้ไม่สมบูรณ์ของสารประกอบกลุ่มไฮโดรคาร์บอนในสถานที่ไม่มีอากาศถ่ายเทและมีปริมาณออกซิเจนไม่เพียงพอ (1) เมื่อก๊าซคาร์บอนมอนอกไซด์เข้าสู่ร่างกายโดยการหายใจจะจับกับฮีโมโกลบินได้ดีกว่าออกซิเจน 300 เท่าเกิดเป็นคาร์บอกซีฮีโมโกลบินทำให้เกิดภาวะขาดออกซิเจน เมื่อระดับคาร์บอกซีฮีโมโกลบินในเลือดมากกว่า 40% สามารถทำให้เสียชีวิตได้(3)

ในการศึกษาพบว่าการเก็บเลือดไว้ในอุณหภูมิห้องและที่ 4 องศาเซลเซียสในหลอด Sodium Fluoride สามารถตรวจพบระดับคาร์บอกซีฮีโมโกลบิน ในช่วง 72 ชั่วโมงแรกไม่แตกต่างกัน ซึ่งได้เคยมีการศึกษาการคงตัวของแอลกอฮอล์ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นสารที่สามารถระเหยได้เหมือนกัน (7) ปรากฏว่าระดับแอลกอฮอล์ในเลือดที่เก็บในอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน พบว่ามีการลดลงของแอลกอฮอล์เล็กน้อย

เมื่อมาพิจารณาเป็นรายกลุ่ม คือในกลุ่มที่เก็บไว้ในอุณหภูมิห้องจะพบว่าในช่วงแรกมีการลดลงแต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ แต่เมื่อเวลาผ่านไป 72 ชั่วโมง เราจะพบว่า มีการเพิ่มขึ้นอย่างไม่มีนัยสำคัญ แต่เมื่อดูแนวโน้มของกราฟมีโอกาสที่ปริมาณคาร์บอกซีฮีโมโกลบิน ในเลือด จะมีปริมาณที่เพิ่มขึ้นโดยอธิบายได้จาก เมื่อมีการสลายของ Heme ใน 1 หน่วย จะสร้างก๊าซ CO 1 หน่วย (8, 9, 10, 11, 12) เมื่อเปรียบเทียบสภาพของเลือดที่เก็บในอุณหภูมิห้องจะพบว่ามีการเปลี่ยนเป็นสีดำ ซึ่งแตกต่างจากเลือดที่เก็บในอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสที่ยังมีลักษณะเป็นสีแดงสดอยู่ ซึ่งเป็นลักษณะเลือดที่เกิดการเน่าเป็นผลให้มีการเพิ่มขึ้นของก๊าซคาร์บอนมอนอกไซด์

เมื่อมาพิจารณาในกลุ่มที่เก็บไว้ในอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสจะพบว่าในช่วง 3 ชั่วโมงแรก พบว่ามีการเพิ่มขึ้นแต่เมื่อมาคำนวณค่าทางสถิติแล้วพบว่าไม่มีนัยสำคัญ แต่เมื่อมาพิจารณาทางข้อมูลจะพบว่า มีค่าความแปรปรวนมากในช่วงเวลา 3 ชั่วโมง และ มีการเพิ่มขึ้นเพียง 1 เปอร์เซนต์ ในช่วง 6-24 ชั่วโมงพบว่ามีการลดลงอย่างไม่มีนัยสำคัญ แต่เมื่อดูในช่วง 48 ชั่วโมง พบว่ามีการลดลงอย่างมีนัยสำคัญ แต่ปริมาณที่ลดลงเพียง 3 เปอร์เซนต์ และ ภายหลัง 72 ชั่วโมงจะค่อนข้างคงที่ สอดคล้องกับการวิจัยว่าการเก็บรักษาในอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส สามารถเก็บรักษาไว้ได้ 4 เดือน ถึงแม้จะเก็บในหลอดเก็บที่ต่างกัน ก็ให้ผลคล้ายคลึงกัน(13)

และเมื่อพิจารณาในกลุ่มที่เก็บไว้ในอุณหภูมิห้องเทียบกับอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสจะพบว่าในช่วง 24 ชั่วโมงแรก ไม่พบความแตกต่างระหว่างการเก็บรักษาในอุณหภูมิห้องและที่ 4 องศาเซลเซียสอย่างมีนัยสำคัญ แต่เมื่อพิจารณาในช่วงเวลา 48 และ 72 ชั่วโมงจะพบว่าการเก็บรักษาในอุณหภูมิห้องมีการเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับการเก็บรักษาในอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส น่าจะเกิดจากการสลายของ Heme ใน 1 หน่วย จะสร้างก๊าซ CO 1 หน่วย (8)

ในต่างประเทศได้มีการศึกษาหาระดับคาร์บอนมอนอกไซด์โดยวิธี Gas Chromatography (3, 6, 8) Ocak A. และคณะได้ศึกษาการเปลี่ยนแปลงระดับคาร์บอกซีฮีโมโกลบินในเลือดของผู้เสียชีวิตโดยเก็บไว้ในอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสแล้วนำมาตรวจโดยวิธี Gas Chromatography (14, 15) พบว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงภายหลังการเก็บรักษานาน 4 เดือนและทำการทดลองเลือดสองกลุ่ม คือเสียชีวิตโดยพิษก๊าซคาร์บอนมอนอกไซด์และจากการพ่นก๊าซคาร์บอนมอนอกไซด์ แล้วนำมาเก็บรักษา พบว่าไม่ความแตกต่างกัน (13)

สรุป

จากการศึกษานี้ สรุปว่าคาร์บอกซีฮีโมโกลบินไม่มีการเปลี่ยนแปลงมากอย่างมีนัยสำคัญจากการเก็บในอุณหภูมิห้องตลอด 72 ชั่วโมงหรือเก็บรักษาในตู้เย็นที่ 4 องศาเซลเซียส แต่ระดับคาร์บอกซีฮีโมโกลบินในเลือดที่อุณหภูมิห้องและที่อุณหภูมิ4 องศาเซลเซียสไม่มีความแตกต่างกันตลอด 24 ชั่วโมง แต่ที่ 48 และ72 ชั่วโมง พบว่าการเก็บรักษาในอุณหภูมิห้องมีการเพิ่มขึ้นเล็กน้อยเมื่อเทียบกับการเก็บในอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

เอกสารอ้างอิง

1. แมน อิงคตานุวัฒน์, ตำรานิติเวชศาสตร์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพมหานคร, หน้า 273-274
2. สิริพันธ์ ณรงค์ชัย ,ตำรานิติเวชศาสตร์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่: 245-246
3. John B. Sullivan, Jr, Clinical Environmental health and toxic exposures, second Edition: 722-726
4. A.C. Moffat, Clerke's isolation and identification of drugs in pharmaceuticals, bodyfluids and post-mortem material second edition, London, Department of Pharmaceutical sciences of The Pharmaceutical society of Great Britian , 1986; 1: 20-21

5. A.C. Moffat, M.David Osselton, B. Widdop, Clarke's analysis of drugs and poisons drugs in pharmaceuticals, body fluids and post-mortem material third edition, London. Department of Pharmaceutical sciences of The Pharmaceutical society of Great Britain, 2004.
6. แม้น อมรศิลป์, Principle and techniques of instrumental analysis, กรุงเทพมหานคร, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย 2534: 33-62
7. SG Anderson, W Allender, AF Moynham, J Perl, SR Jennings, GA Starmer, K Lewis, C Brocklesby, The Effects of storage on the Accuracy of Blood Alcohol Reading, Australia, Proceedings of Biennial Conference of Police, NSW 2010
8. Vreman HJ, Concentration of carbon monoxide in postmortem human tissues: Effect of environment exposure: J. Forensic Sci September 2006; 51 No5
9. Engel RR, Matsen JM, Chapman SS Schwartz S. Carbon monoxide production from heme compounds by bacteria, J. Bacterio 1972; 87: 185-205
10. Hendrik J. Vreman and David K. Stevenson, Heme oxygenase activity as measured by carbon monoxide production, Anal Biochem 1988; **168**: 31–38
11. B. E. McLaughlin, J. M. Hutchinson, C. H. Graham, G. N. Smith, G. S. Marks, K. Nakatsu and J. F. Brien, Heme Oxygenase Activity in Term Human **Placenta**, November 2000**; 21**: 870-873
12. SC Wu, B Levine, JC Goodin, YH Caplan, ML Smith , Analysis of spleen specimens for carbon monoxide, J.Anal. Toxicol, 1992; 16: 42-44
13. Ocak A., The effects of storage conditions on the stability of carbon monoxide in postmortem blood: J. anal. Toxicol.1985; 9: 202-206
14. Methadology considerations in the interpretation of postmortem carboxyhemoglobin concentration, J. Anal toxicol 1996; 115: 129-134
15. Automated determination of carboxyhemoglobin contents in autopsy materials using head-space gas chromatography, J. Forensic Sci, 11Sep 2000; 113: 375-379