The stability of postmortem blood ethanol concentrations after repeat of the analysis over different times
ความคงตัวของระดับเอทานอลในเลือดของศพเมื่อทำการตรวจวิเคราะห์ซ้ำในระยะเวลาที่แตกต่างกัน

Arthit Surawisankun M.D., Peerayuht Phuangphung M.D., Ph.D., Wichai Wongchanapai M.D., Ph.D.
Department of Forensic Medicine, Faculty of Medicine, Siriraj Hospital, Mahidol University, Bangkok 10700, Thailand
อาทิตย์ สุรวิศาลกุล พบ., พีรยุทธ เฟื่องฟุ้ง พ.บ., ว.ว. (นิติเวชศาสตร์), ปร.ด, (นิติพิษวิทยา), วิชัย วงศ์ชนะภัย พ.บ., ว.ว. (นิติเวชศาสตร์), ปร.ด. (เภสัชวิทยาและพิษวิทยา)
ภาควิชานิติเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพฯ 10700 ประเทศไทย

Abstract

Objective: To study the stability of blood ethanol concentrations in postmortem blood samples at 4 °C over different times by re-analysis of blood ethanol concentrations using the same blood tubes

Materials and Methods: All 48 post-mortem blood samples were taken from autopsy cases that were all Thai and over 18 year-old sent to department of forensic medicine, Siriraj hospital which did not turn into decomposition until cannot take blood samples and did not have some underlying disease that may involve in post-mortem ethanol concentration such as diabetes and liver disease. All samples were first analyzed on the day after collection and set as day 0. Then the re-analysis of each samples was done on the day after day 0 which set as day 3, 7, 14, 21 and 30. During analytic process all samples were stored at 4 °C and analyzed by using HS-GC-FID under accredited laboratory according to ISO/IEC 17025:2017. The 6 negative-ethanol blood samples were used as control and 42 positive-ethanol blood samples were divided into 3 groups for concentration (low, medium and high) and analyzed with statistical method.

Results: Post-mortem ethanol concentration tended to decrease in all groups. The statistically significant decrease of low and medium blood ethanol concentration group was after day 21 while the high blood was after day 14. The mean of statistically significant decrease of all samples was after day 14. The author found that acetaldehyde was the factor influence in statistically significant decrease of post-mortem ethanol concentration after 14 day

Conclusion: The stability of postmortem blood ethanol concentrations after re-analysis was within 14 day of the first analysis. Acetaldehyde was the factor influence the decrease of post-mortem ethanol concentration.

Keywords: post-mortem blood ethanol concentration, stability, re-analysis

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์: เพื่อศึกษาความคงตัวของระดับเอทานอลในเลือดหลังตาย โดยมีการทำซ้ำที่ระยะเวลาต่าง ๆ และใช้หลอดเก็บเลือดตัวอย่างเดิมซึ่งเก็บรักษาที่อุนหภูมิ 4 องศา

วัสดุและวิธีการศึกษา: ทำการศึกษาในเลือดตัวอย่าง 48 ตัวอย่างที่เก็บจากศพชาวไทยอายุมากกว่า 18 ปี ซึ่งไม่ได้มีการเปลี่ยนแปลงสู่การเน่าจนไม่สามารถเก็บเลือดได้ หรือไม่มีโรคประจำตัวบางอย่างที่อาจมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของระดับเอทานอลหลังตาย เช่น เบาหวานและโรคตับ โดยเป็นศพที่ส่งเข้ามาผ่าตรวจศพที่ภาควิชานิติเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล ตัวอย่างเลือดถูกเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C แล้วนำมาตรวจจิเคราะห์ในวันรุ่งขึ้นโดยเครื่องตรวจมาตรฐาน HS-GC-FID และทำภายในห้องปฏิบัติการที่ได้รับการรับรองมาตรฐาน หลังจากนั้นมีการทำซ้ำ ณ จุดเวลาต่าง ๆ ที่วันที่ 3, 7, 14, 21 และ 30 โดยใช้หลอดเก็บเลือดเดิม ผลที่ได้จะถูกแบ่งเป็น 3 กลุ่ม แล้วนำมาวิเคราะห์ทางสถิติ รวมทั้งศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อความคงตัวของระดับเอทานอล

ผลการศึกษา: พบแนวโน้มการลดลงของระดับเอทานอลในตัวอย่างเลือดหลังตายทั้งสามกลุ่ม โดยลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อมีการทำซ้ำหลังจากผ่านไปเกิน 21 วัน ในกลุ่มระดับเอทานอลต่ำและปานกลาง และพบการลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อมีการทำซ้ำหลังจากผ่านไป 14 วัน ในกลุ่มระดับเอทานอลสูง ซึ่งโดยเฉลี่ยพบการลดลงของระดับเอทานอลอย่างมีนัยสำคัญเมื่อมีการทำซ้ำหลังจากผ่านไปเกิน 14 วัน เมื่อทำการศึกษาต่อพบว่าปัจจัยที่ทำให้มีการลดลงของระดับเอทานอลอย่างมีนัยสำคัญเมื่อมีการทำซ้ำคือการตรวจพบอะซีตัลดีไฮด์ร่วมกับเอทานอลในตัวอย่างเลือดนั้น

สรุปผลการศึกษา: ความคงตัวของระดับเอทานอลในตัวอย่างเลือดหลังตายจะลดลงจนมีนัยสำคัญเมื่อมีการทำซ้ำภายหลังจากวันที่ 14 หลังจากการตรวจวัดครั้งแรก และการตรวจพบอะซีตัลดีไฮด์ในตัวอย่างเลือดหลังตายร่วมด้วยเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการลดลงของระดับเอทานอลในตัวอย่างเลือดหลังตาย

คำสำคัญ: ระดับเอทานอลในตัวอย่างเลือดหลังตาย, ความคงตัว, การทำซ้ำ

บทนำ

ในปัจจุบันการตรวจระดับเอทานอลจากเลือดเพื่อใช้ประโยชน์ในทางกฎหมายมีการส่งตรวจกันมากขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งนับตั้งแต่มีความร่วมมือของกรมควบคุมโรค กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ และสำนักงานตำรวจแห่งชาติ เพื่อทำการตรวจวัดระดับเอทานอลในเลือดของผู้ขับขี่ยานพาหนะในช่วง 7 วันอันตรายตั้งแต่ปลายเดือนธันวาคม 2560 ถึงต้นเดือนมกราคม 2561 เป็นต้นมาจนถึงปัจจุบัน ซึ่งการตรวจวัดระดับเอทานอลในเลือดมีด้วยกันหลายวิธี ได้แก่ การตรวจคัดกรองระดับเอทานอลจากลมหายใจ และการตรวจยืนยันระดับเอทานอลจากเลือด ในกรณีศพทางนิติเวชศาสตร์ที่ศพถูกส่งมาตรวจผ่าศพเพิ่มเติมโดยกระบวนการตามประมวลกฎหมายวิธีพิจารณาความอาญานั้น การตรวจวัดระดับเอทานอลในสิ่งส่งตรวจจะกระทำการวัดจากในเลือดเป็นหลักเพื่อให้สามารถนำไปใช้ในทางกฎหมายได้ตามที่กฎหมายกำหนด ซึ่งหลังจากแพทย์ได้ทำการเก็บเลือดและนำส่งไปยังห้องปฏิบัติการแล้ว ตัวอย่างเลือดจะถูกเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C ระหว่างรอทำการตรวจ จากนั้นห้องปฏิบัติการจะได้ทำการตรวจหาระดับเอทานอลในเลือดด้วยวิธีการที่เป็นมาตรฐาน คือ การตรวจด้วย Headspace-Gas Chromatography-Flame Ionization Detector (HS-GC-FID) อย่างไรก็ตามในกระบวนการตรวจทางห้องปฏิบัติการ จะมีการควบคุมคุณภาพการตรวจในหลายขั้นตอนเพื่อให้การตรวจหาระดับของเอทานอลในเลือดมีความถูกต้องและแม่นยำมากที่สุด ได้แก่ การมี QC (quality control) sample ประกอบในการตรวจแต่ละ batch, การตรวจตัวอย่างจำนวนอย่างน้อย 2 ซ้ำของแต่ละตัวอย่างเพื่อเปรียบเทียบกัน และ การมี criteria of acceptability ในการยอมรับว่าค่าที่ตรวจนั้นสามารถนำไปใช้ได้ ได้แก่ ค่า precision ของค่าที่ได้จากจำนวน 2 ซ้ำ จะต้องไม่เกินค่าที่กำหนด คือ 5-10% เป็นต้น ซึ่งหากการตรวจแต่ละตัวอย่างไม่ผ่านเกณฑ์ที่กำหนด ห้องปฏิบัติการจะต้องมีการตรวจซ้ำเพื่อให้ผ่านตามเกณฑ์มาตรฐาน อย่างไรก็ตามมีประเด็นที่ต้องพิจารณาคือ ในการทำซ้ำแต่ละครั้งที่เวลาที่ผ่านไป อาจมีผลต่อความคงตัวของระดับเอทานอลในเลือดได้ จึงทำให้เกิดคำถามวิจัยว่า เมื่อทำการตรวจวัดระดับเอทานอลในเลือดของศพไปตามระยะเวลาที่ผ่านไประยะหนึ่ง จะทำให้ระดับเอทานอลในเลือดที่วัดได้มีความเปลี่ยนแปลงไปจากการวัดครั้งแรกหรือไม่ (reproducibility of the analysis of blood alcohol concentration) และหากมีการเปลี่ยนแปลงจะมีการเปลี่ยนแปลงไปมากน้อยอย่างไร

จากการรวบรวมข้อมูลพบว่ามีผลงานวิจัยในเรื่องนี้ออกมาจำนวนไม่มากนัก การศึกษาส่วนใหญ่ที่มีความใกล้เคียงกันจะเป็นการศึกษาเกี่ยวกับความคงตัวของระดับเอทานอลในเลือด (stability of blood alcohol concentration) ซึ่งการศึกษาลักษณะนี้ส่วนใหญ่ศึกษาจากเลือดตัวอย่างของผู้ที่ยังมีชีวิต[1-3] มีเพียงส่วนน้อยซึ่งทำการศึกษาจากตัวอย่างเลือดจากศพผู้เสียชีวิต[4] ซึ่งในกรณีการศึกษาจากตัวอย่างเลือดจากศพผู้เสียชีวิตจะเป็นการศึกษาที่เป็นของต่างประเทศทั้งสิ้น จากการค้นคว้าข้อมูลยังไม่พบการศึกษาลักษณะนี้ในประเทศไทย

วัสดุและวิธีการศึกษา

กลุ่มตัวอย่างของประชากรที่ใช้ศึกษา

กลุ่มตัวอย่างของประชากรที่ใช้ศึกษา ได้แก่ ศพที่ตายผิดธรรมชาติที่ถูกส่งเข้ามาทำการชันสูตรพลิกศพ และผ่าศพตรวจที่ภาควิชานิติเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล ตั้งแต่วันที่ 27 กุมภาพันธ์ 2563 ถึง 20 มีนาคม 2563 โดยมีเกณฑ์การคัดเลือกเข้าสู่งานวิจัย คือ ศพที่มีสัญชาติไทยและมีอายุมากกว่า 18 ปี และมีเกณฑ์คัดออกจากงานวิจัย ได้แก่ ศพที่เข้าสู่กระบวนการเน่าที่ไม่สามารถเก็บเลือดได้ หรือศพที่ทราบประวัติโรคประจำตัวหรือภาวะบางอย่างซึ่งอาจส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงของระดับเอทานอลในเลือด เช่น โรคตับแข็ง โรคเบาหวาน เป็นต้น โดยมีจำนวนตัวอย่างจากศพทั้งหมด 48 ตัวอย่าง และแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ให้ผลการตรวจระดับเอทานอลในเลือดเป็นลบ จำนวน 6 ตัวอย่าง และกลุ่มที่ให้ผลการตรวจระดับเอทานอลในเลือดเป็นบวก คือ มากกว่า 10 มิลลิกรัมเปอร์เซ็นต์ จำนวน 42 ตัวอย่าง

ขั้นตอนการเก็บตัวอย่างและการบันทึกข้อมูล

ทำการเจาะเลือดตัวอย่างจากศพ บริเวณหลอดเลือดดำของต้นขา โดยทำการเก็บจำนวน 1 ตัวอย่าง ปริมาณ 3 มล. ลงในหลอดที่มีสาร โซเดียมฟลูออไรด์ เป็นสารเก็บรักษาสภาพเลือด จากนั้นตัวอย่างเลือดดังกล่าวจะถูกส่งไปยังห้องปฏิบัติการโดยเก็บรักษาไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อตรวจวิเคราะห์ระดับเอทานอลด้วยเครื่อง HS-GC-FID ภายในวันถัดไป ซึ่งกำหนดให้เป็นจุดเวลาวันแรกของการวิเคราะห์ จากนั้นจึงทำการวิเคราะห์ตัวอย่างเลือดต่อไป ณ วันที่ 3, 7, 14, 21 และ 30 นับจากจุดเวลาวันแรก ตามลำดับ โดยแต่ละครั้งของการตรวจวิเคราะห์จะทำการตรวจ 2 ซ้ำ (duplicate analysis) และหาค่าเฉลี่ยของ 2 ซ้ำ มารายงานผลเป็นระดับเอทานอลในเลือดในวันนั้นๆ

ทำการบันทึกข้อมูลที่ใช้ในการวิเคราะห์ ได้แก่ ระดับเอทานอลในเลือดที่เวลาต่างๆ, การตรวจพบอะซีตัลดีไฮด์ร่วมด้วย, การเปลี่ยนแปลงภายหลังตาย และการตรวจพบบาดแผลเปิด จากนั้นแบ่งกลุ่มของระดับเอทานอลเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่มีระดับเอทานอลต่ำ (30-100 มิลลิกรัมเปอร์เซ็นต์), กลุ่มที่มีระดับเอทานอลปานกลาง (100-200 มิลลิกรัมเปอร์เซ็นต์) และกลุ่มที่มีระดับเอทานอลสูง (มากกว่า 200 มิลลิกรัมเปอร์เซ็นต์) กลุ่มละ 14 ตัวอย่าง เพื่อทำการวิเคราะห์ทางสถิติ

สารมาตรฐานและสารเคมีที่ใช้

สารมาตรฐานเอทานอล สารมาตรฐานภายใน (internal standard) คือ t-butanol สารมาตรฐานอะซีตัลดีไฮด์และสารมาตรฐานอะซีโตน ทำการซื้อมาจากบริษัท ยูแอนด์วี โฮลดิ้ง (ไทยแลนด์) จำกัด และบริษัทแสงวิทย์ ชายน์ จำกัด โดยสารมาตรฐานเอทานอล มีค่าความเข้มข้นเท่ากับ 10, 50, 150 และ 400 มิลลิกรัมเปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ตามลำดับส่วนสารมาตรฐาน อะซีตัลดีไฮด์และอะซีโตน มีค่าความเข้มข้นเท่ากับ 2, 10, 20 และ 50 มิลลิกรัมเปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เพื่อใช้ในการทำเส้นกราฟมาตรฐานสำหรับการตรวจวิเคราะห์ (calibration curve) สำหรับตัวอย่างที่ใช้ควบคุมคุณภาพ (QC sample) ของเอทานอล ทำการเตรียมจาก สารมาตรฐานเอทานอลในเกรดการวิเคราะห์ (analytical grade) ขึ้นในห้องปฏิบัติการเอง (in-house preparation) โดยเตรียมที่ความเข้มข้นเท่ากับ 20, 100 และ 300 มิลลิกรัมเปอร์เซ็นต์ ส่วนตัวอย่างควบคุมคุณภาพของอะซีตัลดีไฮด์และอะซีโตน ทำการเตรียมจาก สารมาตรฐานของอะซีตัลดีไฮด์และอะซีโตน โดยเตรียมที่ความเข้มข้นเท่ากับ 20, 100 และ 300 มิลลิกรัมเปอร์เซ็นต์

เครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์ระดับเอทานอลในตัวอย่างเลือดจากศพ

การวิเคราะห์ระดับเอทานอลในตัวอย่างเลือดจากศพ อยู่ภายใต้การดำเนินการของห้องปฏิบัติการนิติพิษวิทยา ภาควิชานิติเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล ซึ่งได้รับรองมาตรฐาน ISO/IEC 17025/2017 โดยทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HS-GC-FID ยี่ห้อ Agilent 7890A โดยสภาวะของ HS ได้รับการตั้งค่าไว้ดังนี้ การวิเคราะห์ใช้ก๊าซฮีเลียมบริสุทธิ์ (Ultra-grade pure Helium) เป็นก๊าซพาหะ (carrier gas) โดยใช้อัตราการไหลของก๊าซเป็นลำดับ (gradient flow rate) คอลัมน์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ (Chromatographic column) เป็นชนิด RTX-BAC2 RESTEK มีขนาด 30 m x 320 μm x 1.2 μm อุณหภูมิสำหรับการฉีดตัวอย่าง (injection temperature) เท่ากับ 200 องศาเซลเซียส การวิเคราะห์กระทำภายใต้ภาวะอุณหภูมิคงที่ (isocratic elution) โดยใช้อุณหภูมิเท่ากับ และใช้เวลาในการวิเคราะห์แต่ละครั้งนาน 5 นาที (run time) ทำการตั้งค่าอุณหภูมิของ FID ไว้ที่ 235 องศาเซลเซียส โดยกำหนดให้มีการไหลของก๊าซเข้าสู่ FID ได้แก่ ก๊าซไฮโดรเจน (Hydrogen) 45 มิลลิลิตร/นาที อากาศ (Air) 450 มิลลิลิตร/นาที และก๊าซเมคอัพ 5.8 มิลลิลิตร/นาที

การเตรียมตัวอย่างในการวิเคราะห์

การเตรียมตัวอย่างในการวิเคราะห์ ทำโดยดูดสารมาตรฐานภายใน (0.1% v/v t-butanol) ปริมาณ 200 μL ผสมกับตัวอย่างเลือด 200 μL ลงในขวดแก้ว จากนั้นทำการปิดฝาขวดด้วยเครื่องปิด และนำไปตรวจ

วิเคราะห์ด้วยเครื่อง HS-GC-FID และทำการหาความเข้มข้นของเอทานอลในเลือด

การทำเส้นกราฟมาตรฐานสำหรับการตรวจวิเคราะห์ กรณีการตรวจวิเคราะห์เอทานอลจะทำในช่วงระหว่าง 10-400 มิลลิกรัมเปอร์เซ็นต์ สำหรับการตรวจวิเคราะห์อะซีตัลดีไฮด์และอะซีโตนจะทำในช่วงระหว่าง 2-50 มิลลิกรัมเปอร์เซ็นต์ โดยการตรวจวิเคราะห์ทั้งเอทานอล, อะซีตัลดีไฮด์ และอะซีโตน มีค่าสัมประสิทธิ์ความเป็นเส้นตรง (r2) ไม่น้อยกว่า 0.995 โดยในการวิเคราะห์ตัวอย่างในแต่ละครั้ง จะต้องมีตัวอย่างควบคุมคุณภาพที่ผ่านเกณฑ์การควบคุมอย่างน้อย 2 ใน 3 ตัวอย่าง และตัวอย่างควบคุมคุณภาพจะต้องมีค่าความถูกต้อง (accuracy) อยู่ในช่วงไม่เกิน ±5% และตัวอย่างที่ทำซ้ำ 2 ซ้ำจะต้องมีค่าความเที่ยง (precision) อยู่ในช่วงไม่เกิน ±5% ด้วย

การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

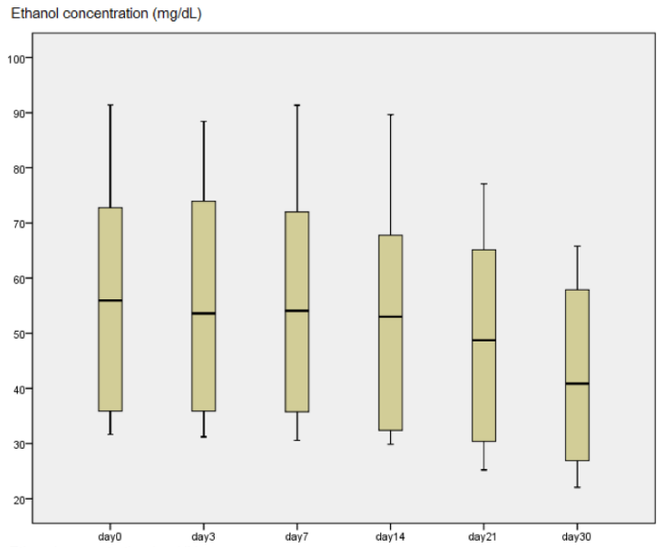
ทำการวิเคราะห์ข้อมูลและคำนวณค่าทางสถิติ โดยใช้โปรแกรม SPSS for Window version 26 โดยการวิเคราะห์สถิติเชิงพรรณา ใช้การคำนวณหาค่าเฉลี่ย (mean) ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation, SD) และค่าร้อยละของความแตกต่างของระดับเอทานอลเมื่อเทียบกับเวลาเริ่มต้น ของแต่ละตัวอย่างเลือด สำหรับการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย และค่าร้อยละของความแตกต่างของระดับเอทานอล ณ เวลาต่างๆ กัน เมื่อเทียบกับเวลาเริ่มต้น ทำการวิเคราะห์โดยใช้การทดสอบ ANOVA with multiple comparison จากนั้นจึงทำการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อร้อยละของความแตกต่างของระดับเอทานอล ณ เวลาต่าง ๆ กัน เมื่อเทียบกับเวลาเริ่มต้น โดยใช้ contingency table Chi-square test โดยกำหนดให้การทดสอบทั้งสองค่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p<0.05$

ผลการศึกษา

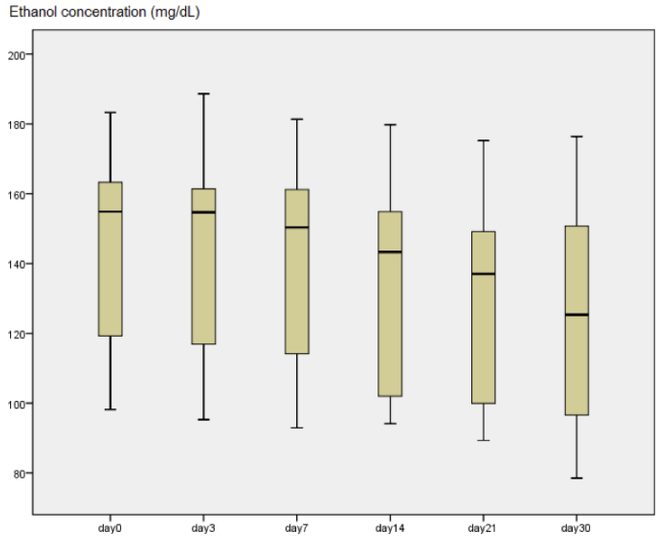
ตัวอย่างเลือดจากศพทั้งหมดที่ตรวจไม่พบระดับเอทานอลมีทั้งหมด 6 ตัวอย่าง และที่ตรวจพบระดับเอทานอลมีทั้งหมด 42 ตัวอย่าง โดยตัวอย่างเลือดที่ตรวจไม่พบระดับเอทานอลในเลือด เมื่อทำการตรวจวิเคราะห์ต่อไป ณ วันที่ 3, 7, 14, 21 และ 30 พบว่า ผลการตรวจยังคงตรวจไม่พบระดับเอทานอลในเลือด ซึ่งเป็นเครื่องบ่งชี้ว่า ไม่มีการเกิดขึ้นของเอทานอลในเลือดภายหลังการเก็บรักษา

สำหรับตัวอย่างเลือดที่ตรวจพบระดับเอทานอลจะแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่มีระดับเอทานอลต่ำ (30-100 มิลลิกรัมเปอร์เซ็นต์), กลุ่มที่มีระดับเอทานอลปานกลาง (100-200 มิลลิกรัมเปอร์เซ็นต์) และกลุ่มที่มีระดับเอทานอลสูง (มากกว่า 200 มิลลิกรัมเปอร์เซ็นต์) กลุ่มละ 14 ตัวอย่าง จากผลการศึกษาพบว่า ระดับเอทานอลในเลือดจากศพทั้ง 3 กลุ่ม เมื่อติดตามไปจนถึงวันที่ 30 มีแนวโน้มลดลงจากผลการตรวจวันแรกในทุกความเข้มข้น ดังรูปที่ 1 อย่างไรก็ตาม จากการวิเคราะห์ทางสถิติด้วย ANOVA with multiple comparison พบว่า มีเพียงกลุ่มที่มีระดับเอทานอลต่ำในวันที่ 30 เท่านั้นที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากผลการตรวจวันแรก ($p<0.05$) (รูปที่ 1(1)) ในขณะที่ในกลุ่มที่มีระดับเอทานอลปานกลาง และสูง ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) (รูปที่ 1(2) และ 1(3))

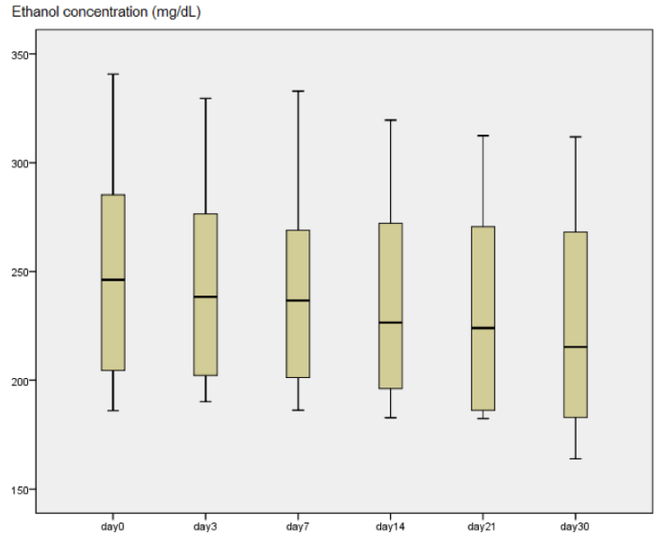
(1)



(2)



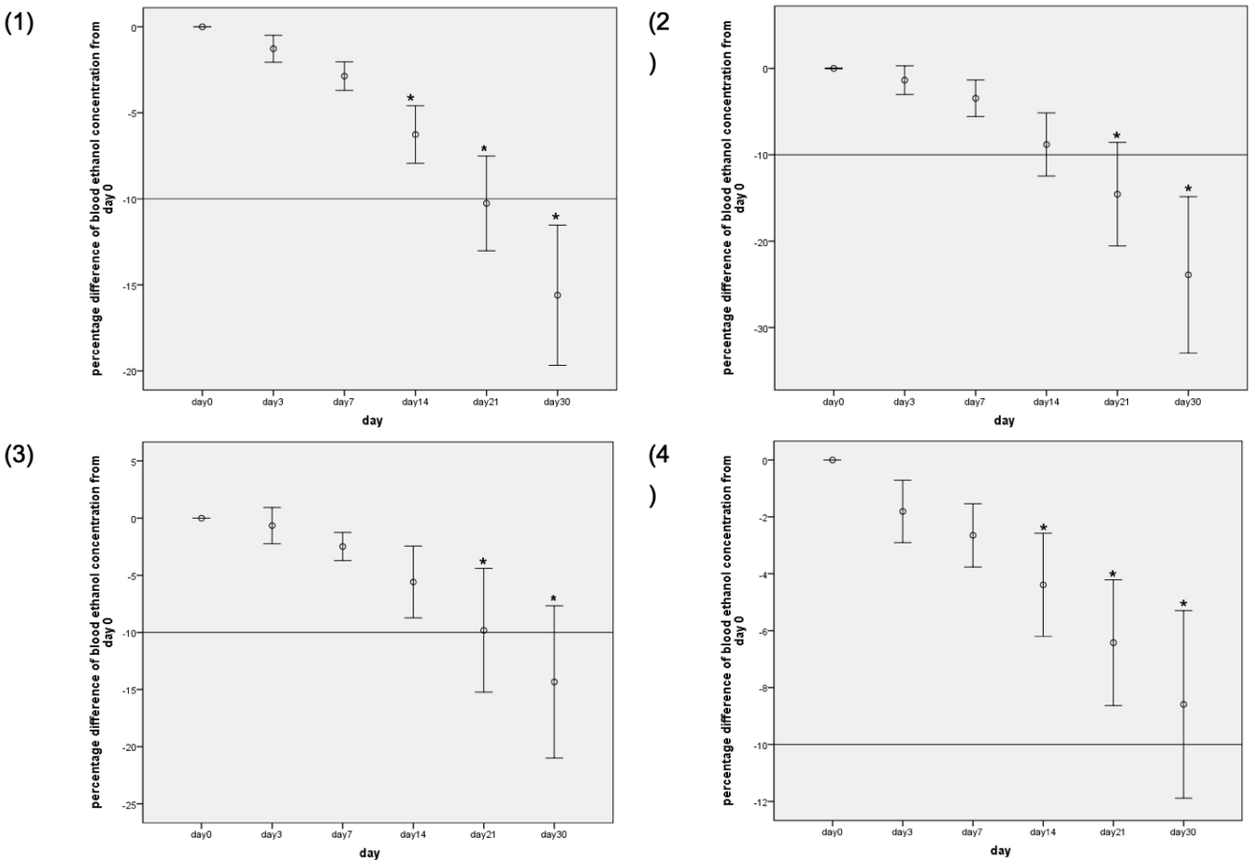
(3)



รูปที่ 1 ระดับเอทานอลในเลือด (มิลลิกรัมเปอร์เซ็นต์) ที่ตรวจวิเคราะห์ได้ในแต่ละช่วงเวลา ตั้งแต่วันที่ 0 ถึงวันที่ 30 โดยแบ่งเป็น (1) กลุ่มที่มีระดับเอทานอลต่ำ (30-100 มิลลิกรัมเปอร์เซ็นต์), (2) กลุ่มที่มีระดับเอทานอลปานกลาง (100-200 มิลลิกรัมเปอร์เซ็นต์) และ (3) กลุ่มที่มีระดับเอทานอลสูง (มากกว่า 200 มิลลิกรัมเปอร์เซ็นต์)

อย่างไรก็ตาม เมื่อพิจารณาร้อยละของความแตกต่างของระดับเอทานอลของแต่ละตัวอย่างเลือดเทียบกับตัวอย่างเลือดนั้นเอง เปรียบเทียบกับวันที่ 0 และติดตามไปจนถึงวันที่ 30 จะพบว่า ร้อยละของความแตกต่างนี้มีค่าลดลงในทั้ง 3 กลุ่ม อย่างชัดเจน จากการวิเคราะห์ทางสถิติด้วย ANOVA with multiple comparison พบว่า ร้อยละของความแตกต่าง จะมีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่วันที่ 21 ในกลุ่มที่มีระดับเอทานอลต่ำ และปานกลาง ($p<0.01$) และที่วันที่ 14 ในกลุ่มที่มีระดับเอทานอลสูง ($p<0.01$) และเมื่อทำการวิเคราะห์รวมกัน ก็พบว่าร้อยละของความแตกต่าง จะมีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่วันที่ 14 ($p<0.01$) ดังแสดงในรูปที่ 2 (1)-(4)

นอกจากนี้ ในแนวทางมาตรฐานของการทดสอบความใช้ได้ของวิธี ร้อยละของความแตกต่างของระดับเอทานอลในเลือดเมื่อทำซ้ำเมื่อเวลาผ่านไป หรือความคงตัวของระดับเอทานอลในเลือด จะมีค่ายอมรับได้ที่ ไม่เกินร้อยละ 10(1) ซึ่งหากพิจารณาในรูปที่ 2 (1)-(4) แล้วจะพบว่า การลดลงของระดับเอทานอลในเลือดในตัวอย่างทั้งหมด จะมีค่ามากกว่าร้อยละ 10 ที่วันที่ 14 ขึ้นไป (รูปที่ 2 (1)) ซึ่งหากแยกตามกลุ่มแล้วนั้นจะพบความแตกต่างมากขึ้น กล่าวคือ ในกลุ่มที่มีระดับเอทานอลต่ำ และปานกลาง การลดลงของระดับเอทานอลในเลือดในตัวอย่าง จะมีค่ามากกว่าร้อยละ 10 ที่วันที่ 21 ขึ้นไป (รูปที่ 2 (2)-(3)) ในขณะที่ ในกลุ่มที่มีระดับเอทานอลสูง การลดลงของระดับเอทานอลในเลือดในตัวอย่าง จะยังไม่เกินร้อยละ 10 ที่วันที่ 30 (รูปที่ 2 (4)) ดังนั้น ในภาพรวมเมื่อพิจารณาทั้งจากการวิเคราะห์ทางสถิติ และแนวทางมาตรฐานการทดสอบความใช้ได้ของวิธี จะเห็นว่า ร้อยละของความแตกต่างของระดับเอทานอล จะมีค่าลดลงอย่างชัดเจน ระหว่างวันที่ 14 และ 21 นับจากเริ่มต้น



รูปที่ 2 ร้อยละของความแตกต่างของระดับเอทานอลของแต่ละตัวอย่างเลือดเทียบกับตัวอย่างเลือดนั้นเอง เปรียบเทียบกับวันที่ 0 และติดตามไปจนถึงวันที่ 30 โดยแบ่งเป็น (1) ตัวอย่างทั้งหมด (2) กลุ่มที่มีระดับเอทานอลต่ำ (30-100 มิลลิกรัมเปอร์เซ็นต์), (3) กลุ่มที่มีระดับเอทานอลปานกลาง (100-200 มิลลิกรัมเปอร์เซ็นต์) และ (4) กลุ่มที่มีระดับเอทานอลสูง (มากกว่า 200 มิลลิกรัมเปอร์เซ็นต์)

เมื่อพิจารณาค่าเฉลี่ยของร้อยละของความแตกต่างของระดับเอทานอลของแต่ละตัวอย่างเลือดเทียบกับตัวอย่างเลือดนั้นเอง เปรียบเทียบกับวันที่ 0 และติดตามไปจนถึงวันที่ 30 สามารถแสดงได้ดัง ตารางที่ 1 ซึ่งจะเห็นว่าค่าเฉลี่ยของร้อยละของความแตกต่างของระดับเอทานอลที่เปลี่ยนแปลง จะมีค่าลดลงอย่างชัดเจน ที่วันที่ 21 นับจากเวลาเริ่มต้น (มากกว่าวันที่ 14) เมื่อพิจารณาที่ร้อยละ 10 นับจากเวลาเริ่มต้น

ตารางที่ 1 ค่าเฉลี่ยของของความแตกต่างของระดับเอทานอลของแต่ละตัวอย่างเลือดเทียบกับตัวอย่างเลือดนั้นเอง เปรียบเทียบกับวันที่ 0 และติดตามไปจนถึงวันที่ 30

กลุ่มตัวอย่าง	ค่าเฉลี่ยของร้อยละของความแตกต่างของระดับเอทานอลของแต่ละตัวอย่างเลือด เมื่อเทียบกับตัวอย่างเลือดนั้นเอง เปรียบเทียบกับวันที่ 0 ณ จุดเวลาต่าง ๆ				
	3 วัน	7 วัน	14 วัน	21 วัน	30 วัน
ระดับเอทานอลต่ำ	- 1.36	- 3.46	- 8.81	- 14.56	- 23.89
ระดับเอทานอลปานกลาง	- 0.65	- 2.49	- 5.59	- 9.82	- 14.33
ระดับเอทานอลสูง	- 1.81	- 2.65	- 4.39	- 6.42	- 8.59
ระดับเอทานอลทั้งหมด	- 1.27	- 2.87	- 6.26	- 10.27	- 15.60

เพื่อจะหาปัจจัยที่มีผลต่อการลดลงของร้อยละของความแตกต่างของระดับเอทานอลของแต่ละตัวอย่างเลือด จึงได้ทำการศึกษาปัจจัยต่างๆ ที่ทำการบันทึกในงานวิจัยนี้ควบคู่ไปกับการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของระดับเอทานอลในเลือด ได้แก่ การตรวจพบอะซีตัลดีไฮด์ในเลือดร่วมด้วย, สภาพศพมีการเปลี่ยนแปลงเข้าสู่การเน่าและการตรวจพบบาดแผลเปิดตามร่างกาย จากนั้นนำปัจจัยดังกล่าวทั้ง 3 ปัจจัยมาวิเคราะห์ทางสถิติ โดยพิจารณาค่าร้อยละของความแตกต่างของระดับเอทานอล เมื่อเวลาผ่านไปมากกว่า 14 วัน ว่าลดลงมากกว่าร้อยละ 10 หรือไม่ ซึ่งจากการศึกษาพบว่า ปัจจัยที่มีผลต่อการลดลงของค่าเฉลี่ยของร้อยละของความแตกต่างของระดับเอทานอลของแต่ละตัวอย่างเลือดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ มีเพียงปัจจัยเดียว คือ การตรวจพบอะซีตัลดีไฮด์ในเลือดร่วมด้วย ($p<0.05$) ดังแสดงใน ตารางที่ 2 แสดงให้เห็นว่า ตัวอย่างที่พบอะซีตัลดีไฮด์ในเลือดร่วมด้วย ซึ่งสามารถเกิดได้จากกระบวนการหมักของเชื้อแบคทีเรียหลังเสียชีวิต จะพบการลดลงของร้อยละของความแตกต่างของระดับเอทานอลได้มากกว่าในตัวอย่างเลือดที่ตรวจไม่พบอะซีตัลดีไฮด์ร่วมด้วย อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางที่ 2 ปัจจัยที่มีผลต่อการลดลงของค่าเฉลี่ยของร้อยละของความแตกต่างของระดับเอทานอลของแต่ละตัวอย่างเลือด

ปัจจัยที่วิเคราะห์	ค่านัยสำคัญทางสถิติ ของความสัมพันธ์ของปัจจัยที่ศึกษากับค่าร้อยละของความแตกต่างของระดับเอทานอลที่ลดลงมากกว่าร้อยละ 10 เมื่อเวลาผ่านไปมากกว่า 14 วัน
การตรวจพบอะซีตัลดีไฮด์ (acetaldehyde) ในเลือด	$p<0.05$ ($p=0.043$)
สภาพศพมีการเปลี่ยนแปลงเข้าสู่การเน่า (decomposition)	$p>0.05$
การตรวจพบแผลเปิดตามร่างกาย (open wound)	$p>0.05$

สรุปและอภิปรายผลการศึกษา

จากการศึกษาพบว่าความคงตัวของระดับเอทานอลในตัวอย่างเลือดหลังตายจะลดลงจนมีนัยสำคัญเมื่อมีการทำซ้ำภายหลังจากวันที่ 14 หลังจากการตรวจวัดครั้งแรก บ่งชี้ว่าหากจำเป็นต้องมีการทำซ้ำจึงควรทำภายใน 14 วัน เนื่องจากยังมีความคงตัวเพียงพอที่จะทำให้ค่าที่ได้ยังไม่เปลี่ยนแปลงไปจนแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญและนำไปใช้อ้างอิงได้

นอกจากนี้ยังพบว่าการตรวจพบอะซีตัลดีไฮด์(Acetaldehyde) ร่วมกับตัวอย่างเลือดหลังตายที่ตรวจพบเอทานอล เป็นปัจจัยที่มีผลต่อการลดลงของระดับเอทานอลเมื่อผ่านไปเกิน 14 วัน อย่างมีนัยสำคัญ บ่งชี้ว่าหากในตัวอย่างเลือดหลังตายที่จำเป็นต้องมีการทำซ้ำนั้นมีการตรวจพบอะซีตัลดีไฮด์ร่วมด้วย ไม่ว่าจะทำซ้ำเมื่อใดก็ควรแปลผลและนำค่าที่ได้ไปใช้อย่างระมัดระวัง

เอกสารอ้างอิง

1. Shan X, Tiscione NB, Alford I, Yeatman DT. A study of blood alcohol stability in forensic antemortem blood samples. Forensic Sci Int. 2011 Sep 10;211(1-3):47-50.

2. Tiscione NB, Vacha RE, Alford I, Yeatman DT, Shan X. Long-Term Blood Alcohol Stability in Forensic Antemortem Whole Blood Samples. J Anal Toxicol. 2015 Jul-Aug;39(6):419-25.

3. Jones AW, Ericsson E. Decreases in blood ethanol concentrations during storage at 4 °C for 12 months were the same for specimens kept in glass or plastic tubes. Pract Lab Med. 2016 Feb 6;4:76-81.

4. Sutlovic D, Versic-Bratincevic M, Definis-Gojanovic M. Blood alcohol stability in postmortem blood samples. Am J Forensic Med Pathol. 2014 Mar;35(1):55-8.

5. AAFS Standards Board 2019, Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology, American Academy of Forensic Sciences, http://www.asbstandardsboard.org/wp-content/uploads/2019/11/036_Std_e1.pdf