



การทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ระดับแอลกอฮอล์ในเลือดโดยวิธี  
แก๊สโครมาโทกราฟี-เฮดสเปซแบบต่อคอลัมน์คู่  
Validation of a Quantitative Determination Method of Blood Alcohol  
by Gas Chromatography-Headspace with Dual Column

วัชรชัย รุจิโรจน์กุล ศุภิสรา สุขเกษม และ วรภาพร ชลอำไพ  
ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 6 ชลบุรี กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

Watcharachai Rujirojkul, Supisara Sukkasem, and Varaporn Chonumpai  
Regional Medical Sciences Center 6 Chonburi, Department of Medical Sciences

Received May 17, 2023 | Revised June 14, 2023 | Accepted June 16, 2023

บทความวิจัย (Research Article)

### บทคัดย่อ

การตรวจวิเคราะห์ระดับแอลกอฮอล์ในเลือดเป็นงานประจำในห้องปฏิบัติการพิษวิทยา การตรวจวิเคราะห์ซึ่งเป็นที่ยอมรับในความถูกต้องคือการตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธีแก๊สโครมาโทกราฟี-เฮดสเปซ (Gas Chromatography-Headspace: GC-HS) โดยคอลัมน์คู่ (Dual column) และมีตัววัดสัญญาณชนิดเปลวไฟไอออนไนเซชัน (Flame Ionization Detector: FID) การเปรียบเทียบเวลาในการแยกสาร (Retention Time: RT) จากคอลัมน์ทั้งสองจะช่วยให้สามารถระบุชนิดของสารได้อย่างถูกต้อง และสามารถคำนวณหาปริมาณของสารได้จากกราฟมาตรฐาน (Calibration curve) จากคอลัมน์ทั้งสองด้วย การศึกษานี้มีจุดมุ่งหมายเพื่อพัฒนาและทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ระดับแอลกอฮอล์ในเลือดโดยใช้เครื่องมือแก๊สโครมาโทกราฟี ยี่ห้อเอจิลেন্ট (Agilent) รุ่น 7890B ต่อกับเครื่องเฮดสเปซ รุ่น 7697A และใช้คอลัมน์สำหรับตรวจแยกแอลกอฮอล์สองแบบ ได้แก่ ดีบี-บีเอซี1 (DB-BAC1) และดีบี-บีเอซี2 (DB-BAC2) โดยพบว่าเวลาในการแยกของเอทานอลในคอลัมน์ ดีบี-บีเอซี1 เท่ากับ 1.068 นาที ส่วนคอลัมน์ ดีบี-บีเอซี2 เท่ากับ 1.175 นาที โดยใช้เทอร์เชียรีบิวทานอล (Tert-butanol) เป็นสารมาตรฐานภายใน (Internal standard) ค่าความเป็นเส้นตรง (Range) อยู่ในช่วง 5.7 ถึง 376.02 มิลลิกรัมเปอร์เซ็นต์ (mg%) ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ ( $R^2$ ) เท่ากับ 0.9999 ทั้งสองคอลัมน์ ร้อยละการคืนกลับ (%Recovery) อยู่ระหว่างร้อยละ 96.83 ถึง 105.76 ค่าต่ำสุดที่ตรวจพบได้ (Limit of Detection: LOD) เท่ากับ 5 มิลลิกรัมเปอร์เซ็นต์ และปริมาณต่ำสุดที่ตรวจวิเคราะห์ได้ (Limit of Quantitation: LOQ) เท่ากับ 7 มิลลิกรัมเปอร์เซ็นต์ ดังนั้น วิธีการตรวจวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นนี้ สามารถใช้เป็นวิธีสำหรับตรวจวิเคราะห์หาระดับแอลกอฮอล์ในเลือดได้

**คำสำคัญ:** แอลกอฮอล์ในเลือด, แก๊สโครมาโทกราฟี-เฮดสเปซ, คอลัมน์คู่, การทดสอบความถูกต้อง



## Abstract

Blood alcohol level analysis is a routine task in toxicology laboratories. The widely accepted analytical method for accurate results is Gas Chromatography-Head Space (GC-HS) employing dual columns and a flame ionization detector (FID). By comparing the retention times (RT) obtained from the two columns, the type of substance can be accurately identified, and its quantity can be determined using the calibration curves. This study aimed to develop and validate a method for analyzing blood alcohol levels using gas chromatography. Agilent equipment, specifically the GC model 7890B coupled with HS model 7697A, was utilized, along with two alcohol separation columns: DB-BAC1 and DB-BAC2. The findings indicated that the retention time for ethanol was 1.068 minutes on the DB-BAC1 column and 1.175 minutes on the DB-BAC2 column, with tert-butanol serving as an internal standard. The linearity of the method ranged from 5.7 to 376.02 milligram percent (mg%), exhibiting a high correlation coefficient ( $R^2 = 0.9999$ ) for both columns. The percentage of recovery (%Recovery) ranged from 96.83% to 105.76%. The Limit of Detection (LOD) was determined to be 5 mg%, while the Limit of Quantitation (LOQ) was found to be 7 mg%. Consequently, this improved analysis method holds promise as an effective means for determining blood alcohol content.

**Keywords:** Blood Alcohol, Gas Chromatography-Headspace, Dual column, Method Validation

## บทนำ

มนุษย์นิยมดื่มเครื่องดื่มที่มีแอลกอฮอล์มาตลอดตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน และเป็นที่ยอมรับกันดีถึงโทษของแอลกอฮอล์ที่ออกฤทธิ์ต่อระบบประสาทส่วนกลาง จนมีผลกระทบต่อสุขภาพตนเองและการแสดงพฤติกรรมรุนแรงต่าง ๆ ตลอดจนก่อให้เกิดการตัดสินใจที่ผิดพลาดได้ง่ายกว่าปกติ และมักเป็นสาเหตุของการบาดเจ็บหรือเสียชีวิตจำนวนมาก ทั้งจากโรคที่มีสาเหตุจากการดื่มสุรา เช่น โรคพิษสุราเรื้อรัง โรคตับ หรือโรคอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องกันกับสุรา เป็นต้น รวมไปถึงการก่อเหตุทะเลาะวิวาท ทำร้ายร่างกาย และอุบัติเหตุจราจร ซึ่งมักพบสาเหตุมาจากการดื่มสุราเช่นกัน เมื่อเกิดการดำเนินคดีขึ้น ผลการตรวจวัดระดับแอลกอฮอล์ในเลือดจึงเป็นหลักฐานทางนิติวิทยาศาสตร์ที่สำคัญ ในการพิจารณาคดีตามขั้นตอนของกระบวนการยุติธรรม

ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 6 ชลบุรี ให้บริการตรวจวิเคราะห์ระดับแอลกอฮอล์ในเลือดเป็นงานประจำ โดยใช้วิธีแก๊สโครมาโทกราฟี-เฮดสเปซ ซึ่งเป็นวิธีที่ได้รับการยอมรับโดยทั่วไป เนื่องจากวิธีเดิมที่ห้องปฏิบัติการใช้อยู่นั้นเป็นการตรวจวิเคราะห์โดยใช้คอลัมน์เดี่ยว และใช้เวลาในการตรวจวิเคราะห์นานถึง 15 นาทีต่อตัวอย่างหนึ่งขวด จึงได้ทำการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ขึ้นใหม่เป็นแบบต่อคอลัมน์คู่ เพื่อให้สามารถยืนยันผลโครมาโทแกรม (Chromatogram) เทียบกันได้ระหว่าง 2 คอลัมน์ เป็นการเพิ่มความเชื่อมั่นและการยอมรับในความถูกต้องของผลการตรวจวิเคราะห์ที่เพิ่มมากขึ้น (Okorocho, 2014, pp. 211-231) พร้อมทั้งปรับปรุงวิธีให้สามารถตรวจวิเคราะห์ได้รวดเร็วขึ้นกว่าเดิม และเปลี่ยนสารมาตรฐานภายใน จาก



ไอโซโพรพานอล (Isopropanol) ที่ใช้อยู่เดิม เป็นเทอร์เชียรีบิวทานอล เนื่องจากมีรายงานว่า ในตัวอย่างเลือดอาจมีสารชนิดอื่นนอกเหนือจากเอทานอลปนอยู่ด้วย โดยเฉพาะตัวอย่างเลือดที่มาจากศพ ซึ่งอาจพบ แอซีทัลดีไฮด์ (Acetaldehyde) นอร์มัลโพรพานอล (N-propanol) ไอโซโพรพานอล และแอซีโตน (Acetone) (Boumba, 2008, pp. 133-151; Sharp, 2001, pp. 631-636) หลังจากปรับสภาวะเครื่องมือและวิธีได้เหมาะสมแล้ว จึงทำการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ และนำไปใช้ในงานประจำทดแทนวิธีการตรวจวิเคราะห์เดิม

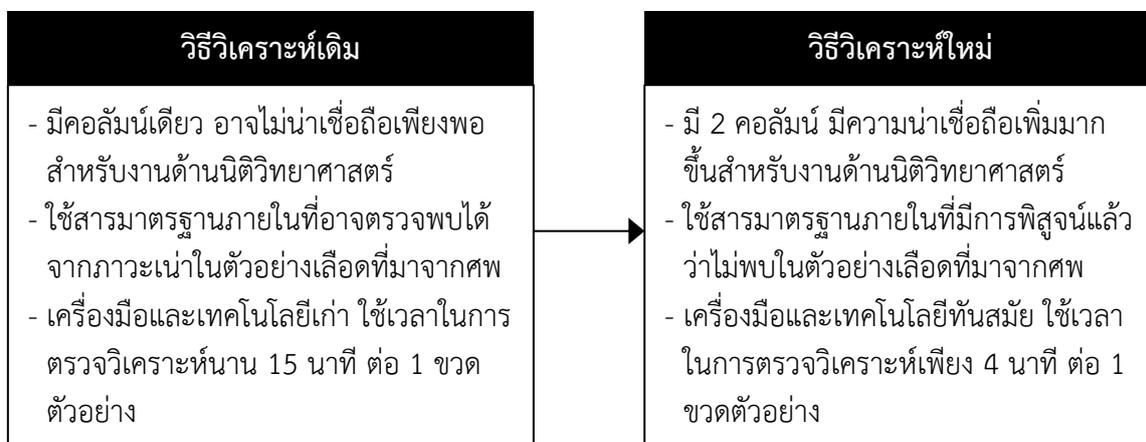
การทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (Method Validation) เป็นกระบวนการเพื่อพิสูจน์ความเหมาะสมของวิธีการวิเคราะห์ที่พัฒนาหรือดัดแปลงขึ้นก่อนนำไปใช้งาน เพื่อให้เกิดความมั่นใจว่าวิธีการนั้นเชื่อถือได้และสามารถใช้งานได้ ให้ผลการวิเคราะห์ที่มีความถูกต้อง แม่นยำ โดยการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ครั้งนี้ ได้ดำเนินการตามแนวปฏิบัติการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ทางเคมีโดยห้องปฏิบัติการเดี่ยว (Ningnoi, 2006) ของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข มีพารามิเตอร์ที่ดำเนินการ ได้แก่ ความเป็นเส้นตรงและพิสัย ความจำเพาะเจาะจง ความแม่นยำ ความเที่ยง ชีตจำกัดของการตรวจพบ ชีตจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ และการทดสอบความทน

### วัตถุประสงค์

- 1) เพื่อพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์ระดับแอลกอฮอล์ในเลือดสำหรับใช้ในงานประจำ ให้มีความถูกต้อง แม่นยำ และเพิ่มความน่าเชื่อถือในผลการตรวจวิเคราะห์มากยิ่งขึ้น บนพื้นฐาน และหลักการทางนิติวิทยาศาสตร์ ที่เป็นที่ยอมรับโดยสากล
- 2) เพื่อทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ที่ได้พัฒนาขึ้น ตามขั้นตอนทางเคมีวิเคราะห์ และผลการทดสอบทางสถิติตามเกณฑ์การยอมรับ
- 3) เพื่อเพิ่มศักยภาพของวิธีการตรวจวิเคราะห์ให้ตรวจได้รวดเร็วมากขึ้น เพื่อรองรับปริมาณงานประจำ และสามารถออกรายงานผลการตรวจวิเคราะห์ได้อย่างรวดเร็ว

### กรอบแนวคิดการวิจัย

การพัฒนาวิธีวิเคราะห์เพื่อทดแทนวิธีวิเคราะห์เดิมในครั้งนี้ มีกรอบแนวคิดดังแสดงใน ภาพที่ 1



ภาพที่ 1 กรอบแนวคิดในการพัฒนาวิธีวิเคราะห์วิธีใหม่ทดแทนวิธีเดิมเพื่อใช้ในงานประจำ



## ทบทวนวรรณกรรม

### 1) ทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง

แอลกอฮอล์ในเลือด สำหรับการพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์ครั้งนี้ หมายถึง เอทานอล ซึ่งเป็นเครื่องดื่มที่มีการใช้อย่างแพร่หลาย และมักเป็นสาเหตุสำคัญในการบาดเจ็บและเสียชีวิต คำว่า แอลกอฮอล์ มีรากศัพท์มาจากภาษาอาหรับ คือ Al-kuhul หมายถึง ผงละเอียดของพลวง ซึ่งใช้ในการตกแต่งดวงตา แต่เดิมนั้นแอลกอฮอล์มักจะหมายถึงผงละเอียดต่าง ๆ ต่อมานักเล่นแร่แปรธาตุในสมัยกลาง จึงนำมาใช้ในความหมายของสารที่ได้จากการกลั่น จนกลายมาเป็นแอลกอฮอล์ในปัจจุบัน

เอทานอล เป็นสารประกอบอินทรีย์พวกไฮโดรคาร์บอน ประกอบด้วยหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) จับกับคาร์บอนอะตอม มีสูตรเคมีคือ  $C_2H_6O$  น้ำหนักโมเลกุล 46.06844 กรัมต่อโมล จุดเดือด 78.29 องศาเซลเซียส จุดหลอมเหลว 114.14 องศาเซลเซียส ความหนาแน่น 0.79 กรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส ความดันไอ 59.3 มิลลิเมตรปรอท และค่าคงที่การแตกตัวของกรด (pKa) เท่ากับ 15.9 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส มีคุณสมบัติคือ ระเหยง่าย เป็นของเหลวใสไม่มีสี กลิ่นฉุนรสชาตรี้น ติดไฟง่าย ละลายได้ในน้ำ เอทิลอีเทอร์ (Ethyl ether) คลอโรฟอร์ม (Chloroform) และแอสีโทน (Jumlongkul, 2016, p. 285)

เป็นที่ทราบกันดีว่าแอลกอฮอล์เข้าสู่ร่างกายส่วนใหญ่โดยการดื่มกิน แอลกอฮอล์จะซึมผ่านเนื้อเยื่อบุผิวของระบบทางเดินอาหารเข้าสู่กระแสเลือด เริ่มตั้งแต่เนื้อเยื่อบุผิวในปาก ไปจนถึงลำไส้ใหญ่ บริเวณที่ถูกดูดซึมได้มากที่สุด คือ ที่บริเวณกระเพาะและลำไส้เล็กส่วนต้น แล้วเข้าสู่กระแสเลือดผ่านระบบการไหลเวียนโลหิต และกระจายไปสู่ส่วนต่าง ๆ ของร่างกาย โดยมีอัตราการกระจายตัวที่ไม่เท่ากัน ดังนั้นการเจาะเลือดจากตำแหน่งต่าง ๆ ของร่างกายมาตรวจ จะได้ความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ในเลือดไม่เท่ากัน อย่างไรก็ตาม ในทางปฏิบัติและถือเป็นเกณฑ์มาตรฐาน จะใช้การเจาะเลือดจากหลอดเลือดดำที่ข้อพับแขน สำหรับการตรวจหาปริมาณแอลกอฮอล์ในเลือด (Kongmebhol, 1986, pp. 716-717)

วิธีที่ใช้ในการตรวจวัดระดับแอลกอฮอล์ในเลือดมีหลายวิธี ได้แก่ 1.) วิธีทางเคมี ซึ่งมีข้อเสียคือสารที่มีคุณสมบัติเป็นตัวรีดิวซ์ (Reducing agent) เช่น เมทานอล คีโตน และแอลดีไฮด์ สามารถให้ผลบวกวงได้ 2.) วิธีทางชีวเคมี โดยใช้เอนไซม์ แอลกอฮอล์ ดีไฮโดรจีเนส (Alcohol Dehydrogenase: ADH) ข้อดีของวิธีนี้ คือ เอนไซม์แอลกอฮอล์ ดีไฮโดรจีเนส ไม่ทำปฏิกิริยากับเมทานอลหรือแอสีโทน แต่สามารถทำปฏิกิริยาได้เล็กน้อยกับไอโซโพรพานอลและบิวทานอล 3.) วิธีเป่าลมหายใจ วิธีนี้เริ่มมีการใช้หลังจากมีการออกกฎหมายเกี่ยวกับการตรวจจับผู้ขับขี่ยานพาหนะขณะเมาสุรา เป็นวิธีที่สะดวกในการปฏิบัติงานภาคสนาม สามารถให้ผลได้รวดเร็ว และวิธีที่ 4.) วิธีแก๊สโครมาโทกราฟี นับเป็นวิธีที่นิยมสูงสุดสำหรับการตรวจหาแอลกอฮอล์ในทางนิติเวชศาสตร์ ข้อดีของวิธีนี้ คือ ไม่มีสารที่จะรบกวนการตรวจวัด ถือเป็นวิธีอ้างอิงของการตรวจวัดแอลกอฮอล์ (Sreeganjant, 2019, pp. 51-52)

### 2) งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การตรวจวิเคราะห์ระดับแอลกอฮอล์ด้วยวิธีแก๊สโครมาโทกราฟี เริ่มขึ้นในช่วงปลาย ค.ศ. 1950 สมัยนั้นมีชื่อเรียกว่าวิธีเวเฟอร์ แฟรกโทเมทรี (Vapor fractometry) ซึ่งปัจจุบันรู้จักกันโดยทั่วไปว่าวิธีแก๊ส ลิกวิด โครมาโทกราฟี (Gas Liquid Chromatography: GLC) ในปี ค.ศ. 1956 Wolthers ได้เขียนบทความอธิบายการแยกเอทานอล ออกจากแอลกอฮอล์ชนิดอื่น ๆ ด้วยวิธีดังกล่าว แล้วนำไปตรวจหาปริมาณต่อด้วยวิธีเอนไซม์ แอลกอฮอล์ ดีไฮโดรจีเนส อีกครั้งหนึ่ง ต่อมาได้มีการพัฒนาตัววัดสัญญาณชนิดเทอร์มัล คอนดักติวิตี (Thermal Conductivity Detector: TCD) ขึ้นและใช้กันอยู่ช่วงระยะเวลาหนึ่ง



ก่อนจะมีการพัฒนาตัววัดสัญญาณชนิดเฟลมไอออไนเซชัน ซึ่งมีความไวและความจำเพาะที่ดีกว่า ใช้ปริมาณตัวอย่างในการตรวจวิเคราะห์น้อยกว่า และโอระเหยของน้ำในตัวอย่างมีผลรบกวนการตรวจวิเคราะห์ต่ำกว่า จึงมีความนิยมใช้ตัววัดสัญญาณชนิดเฟลมไอออไนเซชันเพิ่มมากขึ้น ต่อมา มีการปรับปรุงและพัฒนาคอลัมน์จนสามารถแยกสาร เมทานอล แอซีทัลดีไฮด์ แอซีโตน และไอโซโพรพานอล ออกจากกันได้ โดยใช้เวลาภายใน 5 นาที แต่ยังคงประสบปัญหาเกี่ยวกับเมทริกซ์ (Matrix) ของสิ่งส่งตรวจ จากการฉีดตัวอย่างโดยตรงเข้าสู่ระบบของเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี จนกระทั่งในปี ค.ศ. 1962 เทคนิคเฮดสเปซ ได้ถูกนำเสนอขึ้นเป็นครั้งแรกในงานประชุมวิชาการนานาชาติด้านแอลกอฮอล์และความปลอดภัยทางถนน (International Conference on Alcohol and Road Traffic) จัดโดยสมาคมแพทย์แห่งสหราชอาณาจักร (British Medical Association) และถูกใช้เป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจหาระดับแอลกอฮอล์ในเลือดตั้งแต่นั้นเป็นต้นมา (Johns, 1996, pp. 13-44)

หลักการของวิธีแก๊สโครมาโทกราฟี-เฮดสเปซ คือ การแยกสารตัวอย่างที่เป็นสารผสม โดยเปลี่ยนสารผสมให้เป็นไอ แล้วใช้แก๊สพา (Carrier gas) นำพาไอของสารเหล่านั้นผ่านเข้าไปยังคอลัมน์ ที่บรรจุด้วยเฟสคงที่ (Stationary phase) องค์ประกอบของสารผสมที่มีความสามารถในการเคลื่อนที่ และการกระจายตัวผ่านเฟสคงที่ที่แตกต่างกัน จะแยกออกจากกัน และถูกตรวจวัดโดยตัววัดสัญญาณ สัญญาณที่ตรวจวัดได้จะถูกบันทึก และแสดงออกมาในรูปของโครมาโทแกรม มีลักษณะเป็นพีก (Peak) ที่แสดงเวลาของสารแต่ละชนิด ที่ใช้ในการเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์ ซึ่งในการตรวจหาระดับแอลกอฮอล์ในเลือด ต้องแยกเอทานอลออกจากสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายอื่น ๆ (Volatile Organic Compounds: VOCs) ที่อาจพบได้ในตัวอย่างเลือด ซึ่งมีความเป็นไปได้ที่สารบางชนิด อาจมีคุณสมบัติทางเคมีที่ใกล้เคียงกับเอทานอล จนไม่สามารถแยกพีกออกจากกันได้อย่างชัดเจน ทำให้การรายงานผลผิดพลาด หรือทำให้ตรวจพบระดับแอลกอฮอล์ในเลือดสูงกว่าค่าที่แท้จริงได้ แม้ว่าปัจจุบัน บริษัทเครื่องมือชั้นนำต่าง ๆ ได้พัฒนาคอลัมน์รุ่นพิเศษที่มีความจำเพาะ สำหรับการตรวจหาระดับแอลกอฮอล์ในเลือด ออกมาวางจำหน่ายเป็นจำนวนมาก โดยมีประสิทธิภาพในการแยกเอทานอล ออกจากสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายชนิดอื่น ๆ ได้เป็นอย่างดี แต่ในทางนิติวิทยาศาสตร์แล้ว ยังคงมีคำแนะนำให้ใช้เทคนิคคอลัมน์คู่ในการตรวจวิเคราะห์ เพื่อประโยชน์ในการยืนยันผล โดยพิจารณาโครมาโทแกรมการแยกของเอทานอลจากทั้ง 2 คอลัมน์เปรียบเทียบกับกัน จึงจะสามารถนำรายงานผลที่ได้ ไปใช้ประกอบการพิจารณาคดีได้อย่างมั่นใจ และเป็นที่ยอมรับมากกว่าผลการตรวจวิเคราะห์ที่ได้มาจากคอลัมน์เดี่ยว (Okorochoa, 2014, pp. 220-228)

Bernal (2012, p. 206) ได้ทบทวนวรรณกรรมเกี่ยวกับการตรวจวิเคราะห์หาสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายโดยวิธีแก๊สโครมาโทกราฟี-เฮดสเปซ ที่ตีพิมพ์ตั้งแต่ปี ค.ศ. 1975 จนถึงปี ค.ศ. 2005 พบว่าวิธีการตรวจวิเคราะห์ส่วนใหญ่จะใช้คอลัมน์เดี่ยว และใช้นอร์มัลโพรพานอลเป็นสารมาตรฐานภายใน ซึ่งการตรวจตัวอย่างเลือดในงานประจำนั้น จะมีทั้งตัวอย่างที่เก็บมาจากคนที่ยังมีชีวิตและตัวอย่างเลือดจากศพ ในกรณีตัวอย่างเลือดจากศพ เมื่อมีภาวะเน่า หรือมีเชื้อแบคทีเรีย ยีสต์ หรือราในศพ จะทำให้ตรวจพบแอซีทัลดีไฮด์ นอร์มัลโพรพานอล ไอโซโพรพานอล และแอซีโตนได้ (Boumba, 2008, pp. 133-151; Sharp, 2001, pp. 631-636) โดย Behnam (2010, pp. 311-316) ได้ทำการศึกษาในระดับเอทานอลและนอร์มัลโพรพานอลในเลือดจากศพ จำนวน 300 ศพ พบว่า ค่าเฉลี่ยของนอร์มัลโพรพานอลในศพที่เข้าสู่ภาวะเน่าแล้ว เท่ากับ 8.31 มิลลิกรัมเปอร์เซ็นต์ และเท่ากับ 1.58 มิลลิกรัมเปอร์เซ็นต์ ในศพที่ยังไม่เข้าสู่ภาวะเน่า ด้วยเหตุนี้ นอร์มัลโพรพานอลและไอโซโพรพานอลจึงไม่เหมาะสมที่จะใช้เป็นสารมาตรฐานภายใน สำหรับการตรวจหาระดับแอลกอฮอล์ในเลือด เพราะเป็นสารที่สามารถเกิดขึ้นเองในเลือดตัวอย่าง



และจะมีผลต่อการคำนวณปริมาณแอลกอฮอล์ในเลือดได้ จึงควรเปลี่ยนไปใช้สารมาตรฐานภายในชนิดอื่นแทน ทั้งนี้ มีรายงานการศึกษาขององค์การบริหารการบินแห่งชาติ ประเทศสหรัฐอเมริกา ซึ่งทำการศึกษาข้อมูลผลการตรวจเลือดจากศพของนักบินที่ประสบเหตุเสียชีวิตย้อนหลังไป 8 ปี จำนวน 2,880 ราย ผลพบว่า ตรวจไม่พบเทอร์เชียรีบิวทานอลในเลือดทุกราย และได้ทำการทดลองเปรียบเทียบค่าทางสถิติของนอร์มัลโพรพานอลเทียบกับเทอร์เชียรีบิวทานอล ที่ความเข้มข้น 150 มิลลิกรัมเปอร์เซ็นต์ จำนวน 20 ซ้ำพบว่า นอร์มัลโพรพานอล ได้ค่าเฉลี่ย 149.9 มิลลิกรัมเปอร์เซ็นต์ มีค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ค่าสัมประสิทธิ์ของการแปรปรวน (CV) และค่าความแปรปรวน (VAR) เท่ากับ 3.48, 2.32 และ 12.09 ตามลำดับ ส่วนเทอร์เชียรีบิวทานอล ได้ค่าเฉลี่ย 149.75 มิลลิกรัมเปอร์เซ็นต์ มีค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานค่าสัมประสิทธิ์ของการแปรปรวน และค่าความแปรปรวน เท่ากับ 2.24, 1.50 และ 5.04 ตามลำดับ โดยให้ข้อสรุปว่า เทอร์เชียรีบิวทานอล เป็นสารมาตรฐานภายในที่จะถูกใช้ในงานประจำต่อไปในอนาคต (Canfield, 1998, pp. 1-5)

### ระเบียบวิธีวิจัย

#### 1) เครื่องมือ

- (1) เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี ยี่ห้อ Agilent รุ่น 7890B
- (2) เครื่องแฮตสเปซ ยี่ห้อ Agilent รุ่น 7697A

#### 2) สารเคมี

- (1) สารมาตรฐานเอทานอล (Ethanol Reference Standard Material) ยี่ห้อ LGC Dr. Ehrenstorfer รุ่น DRE-C13223000 Lot. No. G993090
- (2) เทอร์เชียรีบิวทานอล ชนิด AR เกรด ยี่ห้อ QReC Lot. No. 190722-0223
- (3) เลือดแกะ (Defibrinated sheep blood) ซื้อจากห้างหุ้นส่วนคลีนีคอลไดแอกโนสติกส์ จำกัด (ใช้ในการเตรียมตัวอย่างความเข้มข้นค่าต่าง ๆ)

#### 3) วัสดุอุปกรณ์

- (1) ตัววัดสัญญาณชนิดเฟลมไอออไนเซชัน จำนวน 2 ตัว
- (2) คอลัมน์ชนิด ดีพี-บีเอซี1 (30 เมตร × 0.32 มิลลิเมตร × 1.8 ไมโครเมตร) และดีพี-บีเอซี2 (30 เมตร × 0.32 มิลลิเมตร × 1.2 ไมโครเมตร)
- (3) อุปกรณ์ต่อแยกคอลัมน์ 2 ทาง (Unpurged two-way splitter)
- (4) คอลัมน์เปล่า (Retention Gap) ขนาด 0.4 × 0.45 มิลลิเมตร ใช้ต่อระหว่างอุปกรณ์ต่อแยกคอลัมน์ 2 ทาง กับส่วนฉีดสารตัวอย่าง (Inlet)
- (5) ไปเปตอัตโนมัติ (Auto pipette) ขนาด 200 ไมโครลิตร (ใช้ดูดตัวอย่างเลือดและสารมาตรฐานภายใน)
- (6) แก๊สไนโตรเจน ไฮโดรเจน และอากาศ (Air Zero) เกรดความบริสุทธิ์สูง
- (7) ขวดแก้วบรรจุตัวอย่าง (Vial) สำหรับฉีดเครื่องแฮตสเปซ ขนาดปริมาตรความจุ 20 มิลลิลิตร พร้อมฝาปิดอะลูมิเนียมแบบฝาจีบมีแผ่นซิลิโคนเคลือบด้านสัมผัสสารตัวอย่างด้วยวัสดุเทฟลอน

#### 4) สภาวะเครื่องมือ

สภาวะการทำงานของเครื่องมือแก๊สโครมาโทกราฟี-แฮตสเปซ ดัดแปลงมาจาก หมายเหตุการใช้งาน (Application note) ของบริษัท เอจีเลนส์ เทคโนโลยีส์ (Agilent Technologies) รหัส 5991-



8206EN และ 5991-3671EN (Abercrombie, 2017, p. 2; Boswell, 2013, p. 2) มีรายละเอียด ดังแสดงใน ตารางที่ 1 และตารางที่ 2

**ตารางที่ 1** สภาวะการทำงานของเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี

ส่วนที่ปรับตั้ง	ค่าที่ตั้ง	หน่วย
อุณหภูมิส่วนฉีดตัวอย่าง (Inlet temperature)	110	องศาเซลเซียส
ความดันส่วนฉีดตัวอย่าง (Inlet pressure)	24	ปอนด์ต่อตารางนิ้ว (psi)
สัดส่วนการแยกของส่วนฉีดตัวอย่าง (Inlet split ratio)	10:1	
อุณหภูมิตู้อบ (Oven temperature)	40	องศาเซลเซียส
อุณหภูมิส่วนตรวจวัด (Detector temperature)	250	องศาเซลเซียส
อัตราการไหลแก๊สไฮโดรเจน (Detector H <sub>2</sub> flow)	30	มิลลิลิตรต่อนาที
อัตราการไหลอากาศ (Detector air flow)	400	มิลลิลิตรต่อนาที
อัตราการไหลแก๊สปรับแต่ง (Detector make up flow)	25	มิลลิลิตรต่อนาที

**ตารางที่ 2** สภาวะการทำงานของเครื่องแฮดสเปซ

ส่วนที่ปรับตั้ง	ค่าที่ตั้ง	หน่วย
อุณหภูมิตู้อบ (Oven temperature)	65	องศาเซลเซียส
อุณหภูมิลูป (Loop temperature)	80	องศาเซลเซียส
การปรับสมดุลลูป (Loop equilibration)	0.05	นาที
อุณหภูมิสายส่งต่อตัวอย่าง (Transfer line temperature)	90	องศาเซลเซียส
เวลาการฉีดตัวอย่าง (Inject time)	0.60	นาที
ความดันเติมแก๊สขวดตัวอย่าง (Vial fill pressure)	10	ปอนด์ต่อตารางนิ้ว
อัตราการไหลแก๊สขวดตัวอย่าง (Vial fill flow)	50	มิลลิลิตรต่อนาที
เวลาปรับสมดุลขวดตัวอย่าง (Vial equilibrium time)	7	นาที

### 5) การเตรียมตัวอย่าง

(1) สารมาตรฐานภายใน เทอร์เชียรีบิวทานอล ความเข้มข้น 0.25 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร (%v/v) เตรียมโดยชั่งเทอร์เชียรีบิวทานอล 0.25 กรัม ด้วยเครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง ปรับปริมาตรในขวดปรับปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำปราศจากไอออน (Deionized water)

(2) สารอินทรีย์ระเหยง่ายที่ใช้ทดสอบความจำเพาะของวิธี ได้แก่ เมทานอล, แอซิโตน, ไอโซโพรพานอล และนอร์มัลโพรพานอล เตรียมที่ความเข้มข้น 0.25 %v/v โดยชั่งชนิดละ 0.25 กรัมด้วยเครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง แล้วปรับปริมาตรในขวดปรับปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำปราศจากไอออน

(3) สารมาตรฐานเอทานอลสำหรับเตรียมกราฟมาตรฐาน 6 ความเข้มข้น ที่ 5, 10, 20, 100, 200 และ 380 มิลลิกรัมเปอร์เซ็นต์ ซึ่งเมื่อชั่งจริงได้ความเข้มข้น 5.70, 11.60, 19.80, 92.83, 202.70 และ 376.02 มิลลิกรัมเปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยใช้น้ำปราศจากไอออนในการเตรียม



(4) ตัวอย่างเลือดที่เติมเอทานอลที่ความเข้มข้น 2, 5, 7, 46, 48, 147, 148, 300 และ 301 มิลลิกรัมเปอร์เซ็นต์ เตรียมโดยการชั่งสารมาตรฐานเอทานอลด้วยเครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง แล้วปรับปริมาตรด้วยเลือดแกะในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร

#### 6) วิธีวิเคราะห์

ใช้ไปเปิดอัตโนมัติดูดสารมาตรฐานภายในปริมาตร 200 ไมโครลิตร ใส่ในขวดแก้วบรรจุตัวอย่าง ขนาด 20 มิลลิลิตร ตามด้วยการดูดเลือดตัวอย่างที่ความเข้มข้นที่ต้องการทดสอบ ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ใส่ในขวดเติม ปิดฝาอะลูมิเนียมให้แน่นสนิทโดยเร็ว แล้วนำไปตรวจวิเคราะห์ทันที

#### 7) การทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์

(1) การทดสอบความเป็นเส้นตรงและพิสัย (Linearity and Range) โดยวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานเอทานอลความเข้มข้น 6 ระดับ ได้แก่ 5.70, 11.60, 19.80, 92.83, 202.70 และ 376.02 มิลลิกรัมเปอร์เซ็นต์ จำนวนระดับละ 3 ซ้ำ แล้วหาความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐานเอทานอลกับอัตราส่วนพื้นที่ได้ฟีก

(2) การทดสอบความจำเพาะของวิธี (Specificity) โดยเตรียมสารมาตรฐานเอทานอลกับเทอร์เชียรีบิวทานอล และเติมเมทานอล, แอซีโตน, ไอโซโพรพานอล และนอร์มัลโพรพานอล แล้วนำไปวิเคราะห์ดูค่าเวลาในการแยกของสารแต่ละชนิด และค่าการแยกของฟีก (Resolution)

(3) การทดสอบขีดจำกัดของการตรวจพบ โดยเตรียมตัวอย่างเลือดที่ความเข้มข้น 46, 147 และ 301 มิลลิกรัมเปอร์เซ็นต์ นำไปทดสอบความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ คำนวณหาค่าเฉลี่ย (mean) และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน สร้างกราฟมาตรฐานระหว่างค่าเฉลี่ย (แกน X) กับค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (แกน y) เพื่อหาค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของความเข้มข้นที่ 0 ( $S_b$ ) แล้วคำนวณหาค่าต่ำสุดที่ตรวจพบได้จากสูตร  $LOD = 3 S_b$

(4) การทดสอบขีดจำกัดของการตรวจพบเชิงปริมาณ โดยคำนวณค่า LOQ ทำนาย (Predicted LOQ) จากสูตร  $LOQ = 10 S_b$  และเตรียมตัวอย่างที่มีความเข้มข้น 2, 5 และ 7 มิลลิกรัมเปอร์เซ็นต์ นำไปทดสอบความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ แล้วคำนวณหาค่าความแม่นยำและความเที่ยงของแต่ละความเข้มข้น

(5) การทดสอบความแม่นยำ (Accuracy) โดยเตรียมตัวอย่างเลือดที่ระดับความเข้มข้น 46, 147 และ 301 มิลลิกรัมเปอร์เซ็นต์ นำไปทดสอบระดับความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ ในคราวเดียวกัน (Within run) แล้วคำนวณหาร้อยละการคืนกลับ

$$\%Recovery = \frac{(C1-C2)}{C3} \times 100$$

โดยที่ C1 = ค่าจากตัวอย่างที่เติมสารมาตรฐาน

C2 = ค่าจากตัวอย่างที่ไม่เติม

C3 = ค่าความเข้มข้นของสารมาตรฐานที่เติม

(6) การทดสอบความเที่ยง (Precision) โดยเตรียมตัวอย่างเลือดที่ระดับความเข้มข้น 46, 147 และ 301 มิลลิกรัมเปอร์เซ็นต์ นำไปทดสอบระดับความเข้มข้นละ 10 ซ้ำในคราวเดียวกัน และทดสอบความเข้มข้นละ 2 ซ้ำ จำนวน 10 วัน (Between run) แล้วคำนวณหาค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน



สัมพัทธ์ (%RSD), ค่าฮอร์วิทซ์ อาร์เอสดี ทำนาย (Predicted Horwitz RSD: %RSDr) และค่าฮอร์แรท (HORRAT) หรืออัตราส่วนฮอร์วิทซ์ (Horwitz's ratio) จากสูตร

$$\text{HORRAT (Horwitz's ratio)} = \frac{\% \text{ RSD}}{\text{Predicted Horwitz RSD}}$$

โดยที่ Predicted Horwitz RSD คำนวณมาจากสูตร

$$\% \text{RSDr} = 0.66 \times C^{-0.1505}$$

โดยที่ C = อัตราส่วนความเข้มข้น (concentration ratio)

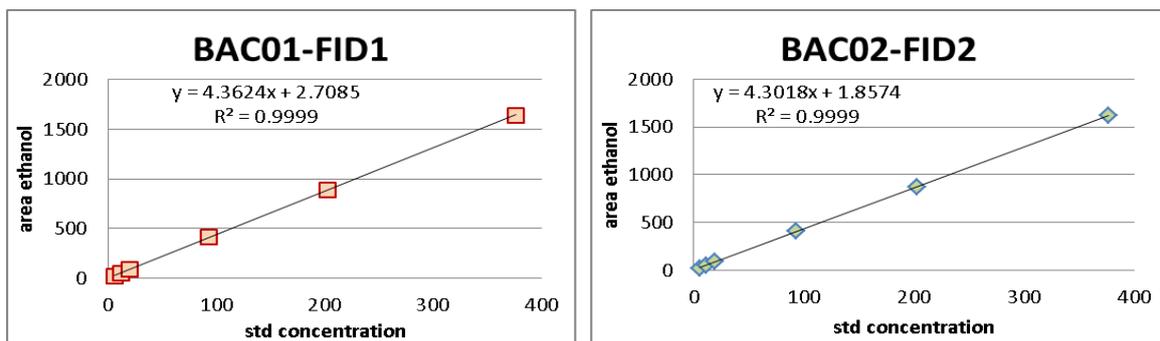
กำหนดเกณฑ์การยอมรับ ฮอร์แรท  $\leq 2$

(7) การทดสอบความคงทน (Ruggedness) และความทน (Robustness) โดยเตรียมตัวอย่างเลือดที่ระดับความเข้มข้น 48, 148 และ 300 มิลลิกรัมเปอร์เซ็นต์ นำไปทดสอบระดับความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ โดยทำการเปรียบเทียบความแตกต่างของผลการตรวจวิเคราะห์ระหว่างผู้ทดสอบ 2 คน และความแตกต่างของผลการตรวจวิเคราะห์ เมื่อมีการปรับเปลี่ยนอุณหภูมิของตู้อบ (Oven) จาก 40 องศาเซลเซียส เป็น 50 องศาเซลเซียส และเมื่อมีการเปลี่ยนชนิดของขวดบรรจุตัวอย่างจากขวดแบบฝาจิบเป็นขวดแบบฝาเกลียว

## ผลการวิจัย

### 1) ผลการทดสอบความเป็นเส้นตรงและพิสัย

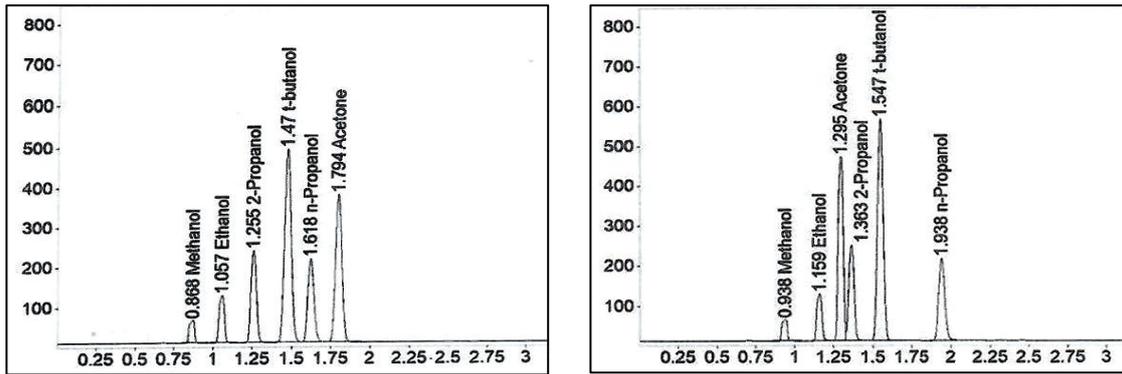
พบความสัมพันธ์มีลักษณะเป็นเส้นตรงตลอดช่วงพิสัย 5.7 - 376.02 มิลลิกรัมเปอร์เซ็นต์ ทั้งในคอลัมน์ ดีพี-พีเอซี1 และ ดีพี-พีเอซี2 โดยมีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ ( $R^2$ ) เท่ากับ 0.9999 ดังแสดงในภาพที่ 2



ภาพที่ 2 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐานกับอัตราส่วนพื้นที่ใต้พีค

### 2) ผลการทดสอบความจำเพาะของวิธี

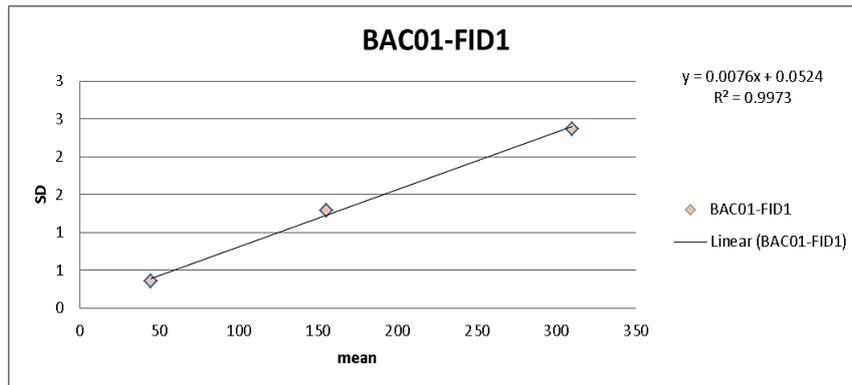
สามารถแยกพีคของเอทานอลและเทอร์เชียรีบิวทานอล ออกจากพีคของเมทานอล, นอร์มัลโพรพานอล, ไอโซโพรพานอล และแอซีโทน ได้อย่างชัดเจน ดังแสดงใน ภาพที่ 3



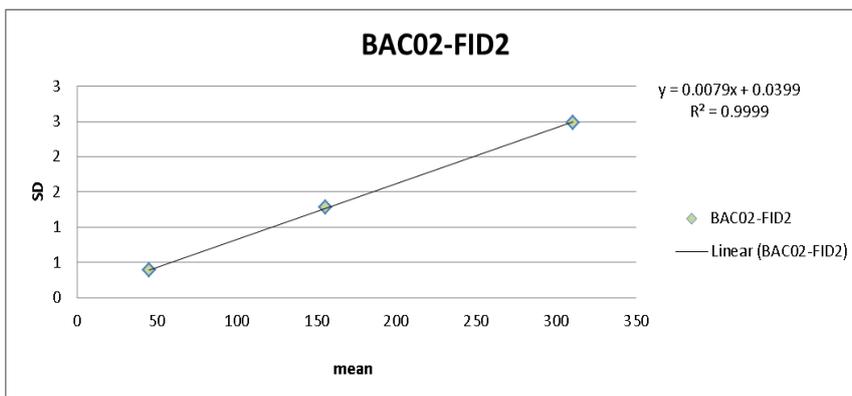
ภาพที่ 3 การแยกพีคของเอทานอลกับพีคของเมทานอล ไอโซโพรพานอล เทอร์เชียรีบิวทานอล นอร์มัลโพรพานอล และแอซีโตน ระหว่างคอลัมน์ดีบี-พีเอซี1 (ซ้าย) และดีบี-พีเอซี2 (ขวา)

### 3) ผลการทดสอบขีดจำกัดของการตรวจพบ

กราฟระหว่างค่าเฉลี่ย (แกน X) กับค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (แกน y) เพื่อหาค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของความเข้มข้นที่ 0 ( $S_b$ ) ของตัวอย่างเลือดที่ความเข้มข้น 46 mg% 147 mg% และ 301 mg% ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ ได้เป็นกราฟดังแสดงใน ภาพที่ 4 และภาพที่ 5



ภาพที่ 4 กราฟระหว่างค่าเฉลี่ยกับค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานจากคอลัมน์ดีบี-พีเอซี1



ภาพที่ 5 กราฟระหว่างค่าเฉลี่ยกับค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานจากคอลัมน์ดีบี-พีเอซี2



คำนวณขีดจำกัดของการตรวจพบ จากกราฟที่ได้จากคอลัมน์ดีปี-ปีเอซี1 และดีปี-ปีเอซี2 ได้ ดังนี้

LOD (ดีปี-ปีเอซี1)

จาก  $Y = 0.0076X + 0.0524$

โดย  $S_b =$  ค่า  $Y$  ที่  $x = 0$

ดังนั้น  $Y = 0.0076(0) + 0.0524$

ได้ค่า  $S_b = 0.0524$

$LOD = 3 S_b$

$= 3 \times 0.0524$

$= 0.1572$

LOD (ดีปี-ปีเอซี2)

$Y = 0.0079X + 0.0399$

$S_b =$  ค่า  $Y$  ที่  $x = 0$

$Y = 0.0079(0) + 0.0399$

$S_b = 0.0399$

$LOD = 3 S_b$

$= 3 \times 0.0399$

$= 0.1197$

**4) ผลการทดสอบขีดจำกัดของการตรวจพบเชิงปริมาณ**

คำนวณขีดจำกัดของการตรวจพบเชิงปริมาณ จากกราฟของคอลัมน์ดีปี-ปีเอซี1 และดีปี-ปีเอซี2 ได้ดังนี้

LOQ (ดีปี-ปีเอซี1)

$LOQ = 10 S_b$

$= 10 \times 0.0524$

$= 0.524$

LOQ (ดีปี-ปีเอซี2)

$LOQ = 10 S_b$

$= 10 \times 0.0399$

$= 0.399$

เนื่องจากพบว่าค่าขีดจำกัดของการตรวจพบ และค่าขีดจำกัดของการตรวจพบเชิงปริมาณที่คำนวณได้ มีระดับที่ต่ำเกินไปมาก เพื่อพิจารณาความไวและประสิทธิภาพของเครื่องมือที่แท้จริงแล้ว จึงทำการทดสอบค่าทั้งสองใหม่ ด้วยการเตรียมสารมาตรฐานเอทานอล ที่ความเข้มข้นระดับต่ำ ได้แก่ 2, 5 และ 7 มิลลิกรัมเปอร์เซ็นต์ นำไปทดสอบความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ แล้วคำนวณหาค่าความแม่นยำและความเที่ยงของแต่ละความเข้มข้น ปรากฏว่าตรวจไม่พบฟีกของเอทานอล ที่ระดับความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมเปอร์เซ็นต์ ส่วนที่ระดับความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมเปอร์เซ็นต์ พบฟีกทั้งหมด ผลการประเมินค่าความเที่ยงของคอลัมน์ทั้งสองได้ค่าฮอร์แรท เท่ากับ 0.5192 และ 0.5570 ตามลำดับ (เกณฑ์ยอมรับ ฮอร์แรท  $\leq 2$ ) แต่พบว่าค่าร้อยละการคืนกลับ เท่ากับ 88.45 และ 89.19 ซึ่งไม่ผ่านเกณฑ์การยอมรับที่ 90 - 107 สำหรับความเข้มข้นที่ระดับ 7 มิลลิกรัมเปอร์เซ็นต์ ได้ค่าฮอร์แรท เท่ากับ 0.3103 และ 0.3811 และค่าร้อยละการคืนกลับ เท่ากับ 104.18 และ 104.38 ตามลำดับ ซึ่งผ่านเกณฑ์การยอมรับทั้งความแม่นยำและความเที่ยง ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า วิธีทดสอบนี้มีค่าขีดจำกัดของการตรวจพบที่ระดับความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมเปอร์เซ็นต์ และค่าขีดจำกัดของการตรวจพบเชิงปริมาณที่ระดับความเข้มข้น 7 มิลลิกรัมเปอร์เซ็นต์

**5) ผลการทดสอบความแม่นยำ**

พบว่าค่าร้อยละการคืนกลับ ที่ความเข้มข้นทั้ง 3 ระดับ มีค่าอยู่ในเกณฑ์การยอมรับที่ร้อยละ 90 - 107 โดยมีค่าอยู่ในช่วงระหว่าง 96.83 - 105.76 ดังแสดงในตารางที่ 3



**ตารางที่ 3** ค่าร้อยละการคืนกลับจำนวน 10 ซ้ำ ที่ความเข้มข้น 46, 147 และ 301 มิลลิกรัม เปอร์เซ็นต์  
คำนวณเป็น ค่าเฉลี่ย ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์

จำนวนซ้ำ	ดีปี-ปีเอซี1			ดีปี-ปีเอซี2		
	ความเข้มข้น (มิลลิกรัมเปอร์เซ็นต์)			ความเข้มข้น (มิลลิกรัมเปอร์เซ็นต์)		
	46	147	301	46	147	301
1	95.2843	104.0497	101.8126	97.0337	104.5453	102.0852
2	96.0317	104.2388	102.0248	97.1174	104.2646	102.2885
3	96.5813	105.1906	102.2471	97.6920	105.6789	102.0229
4	96.8117	105.2716	102.5618	98.0961	105.7731	102.8390
5	96.9270	105.3786	102.9960	98.3963	105.5068	103.2457
6	96.9517	105.5300	103.0171	98.5163	105.5360	103.2863
7	97.0748	105.7999	103.1101	98.7691	106.1856	103.3853
8	97.1265	106.0111	103.6304	98.7933	106.4791	103.8472
9	97.3498	106.3266	103.6497	99.0113	106.5381	103.6630
10	98.1741	106.9103	104.2925	99.7180	107.0623	104.5883
ค่าเฉลี่ย	96.8313	105.4707	102.9342	98.3143	105.7570	103.1251
SD	0.7701	0.8738	0.7873	0.8464	0.8713	0.8258
%RSD	0.7953	0.8285	0.7649	0.8609	0.8239	0.8008

**6) ผลการทดสอบความเที่ยง**

ผลการทดสอบความเที่ยง ทั้งการทดสอบแบบคร่าวเดียวกัน และต่างวันต่างสภาวะกัน ที่ระดับความเข้มข้น 46, 147 และ 301 มิลลิกรัมเปอร์เซ็นต์ แสดงใน ตารางที่ 4 และ ตารางที่ 5

**ตารางที่ 4** ข้อมูลการทดสอบความเที่ยงแบบคร่าวเดียวกัน

จำนวนซ้ำ	ดีปี-ปีเอซี1			ดีปี-ปีเอซี2		
	ความเข้มข้น (มิลลิกรัมเปอร์เซ็นต์)			ความเข้มข้น (มิลลิกรัมเปอร์เซ็นต์)		
	46	147	301	46	147	301
1	43.8308	152.9531	306.4558	44.6355	153.6816	307.2766
2	44.1746	153.2311	307.0946	44.6740	153.2690	307.8883
3	44.4274	154.6302	307.7639	44.9383	155.3480	307.0890
4	44.5334	154.7493	308.7109	45.1242	155.4865	309.5455
5	44.5864	154.9066	310.0179	45.2623	155.0950	310.7696
6	44.5978	155.1291	310.0816	45.3175	155.1379	310.8917
7	44.6544	155.5258	310.3613	45.4338	156.0928	311.1897



จำนวนซ้ำ	ตีปี-ปีเอเชีย1			ตีปี-ปีเอเชีย2		
	ความเข้มข้น (มิลลิกรัมเปอร์เซ็นต์)			ความเข้มข้น (มิลลิกรัมเปอร์เซ็นต์)		
	46	147	301	46	147	301
8	44.6782	155.8363	311.9276	45.4449	156.5243	312.5801
9	44.7809	156.3001	311.9856	45.5452	156.6110	312.0257
10	45.1601	157.1581	313.9204	45.8703	157.3816	314.8108
<b>ค่าเฉลี่ย</b>	<b>44.5424</b>	<b>155.0420</b>	<b>309.8320</b>	<b>45.2246</b>	<b>155.4628</b>	<b>310.4067</b>
SD	0.3542	1.2845	2.3699	0.3893	1.2808	2.4857
%RSD	0.7953	0.8285	0.7649	0.8609	0.8239	0.8008
ฮอว์แรท	0.5360	0.6651	0.6840	0.5803	0.6614	0.7161

ตารางที่ 5 ข้อมูลการทดสอบความเที่ยงต่างวันต่างสภาวะกัน

จำนวนซ้ำ	ตีปี-ปีเอเชีย1			ตีปี-ปีเอเชีย2		
	ความเข้มข้น (มิลลิกรัมเปอร์เซ็นต์)			ความเข้มข้น (มิลลิกรัมเปอร์เซ็นต์)		
	46	147	301	46	147	301
1	43.4745	150.8248	301.2859	44.3651	151.3397	301.9796
2	43.4659	154.3539	305.4303	44.3914	154.9586	305.9503
3	43.4492	154.2155	302.8101	44.3711	154.7872	303.7014
4	43.3126	152.8696	301.4425	44.1401	153.6886	301.9683
5	43.3451	149.8423	299.5227	44.1609	150.3233	299.7336
6	42.1470	146.6794	294.7136	42.9665	147.6731	295.5874
7	43.0728	152.3149	302.2765	43.3910	152.9035	303.2138
8	42.9471	148.1969	295.1867	43.7772	148.9009	295.4733
9	42.8389	150.1906	300.0823	43.7199	150.9190	300.4302
10	43.0220	149.4580	301.0582	43.9895	150.0486	301.8609
<b>ค่าเฉลี่ย</b>	<b>43.1075</b>	<b>150.8946</b>	<b>300.3809</b>	<b>43.9272</b>	<b>151.5542</b>	<b>300.9899</b>
SD	0.4092	2.5305	3.2883	0.4695	2.4665	3.3518
%RSD	0.9493	1.6770	1.0947	1.0689	1.6275	1.1136
ฮอว์แรท	0.6336	1.3516	0.9786	0.7155	1.3126	0.9958

พบว่าในการทดสอบแบบคร่าวเดียวกัน ค่าที่ตรวจวัดได้ที่ระดับความเข้มข้น 147 และ 301 มิลลิกรัมเปอร์เซ็นต์ อยู่ในเกณฑ์สูงกว่าค่าจริงพอสมควร โดยมีแนวโน้มการเพิ่มสูงขึ้นในขวดตัวอย่างลำดับถัดไป อาจเป็นผลมาจากการเริ่มวิเคราะห์ในขณะที่สภาวะของเครื่องมือยังไม่คงที่หรือเส้นฐานของสัญญาณ (Baseline) ยังไม่ราบเรียบดี อย่างไรก็ตาม ค่าฮอว์แรท ที่คำนวณได้ พบว่ายังอยู่ในเกณฑ์การยอมรับคือ ฮอว์แรท  $\leq 2$



## 7) ผลการทดสอบความคงทนและความทน

การทดสอบความคงทน ทั้ง 3 แบบ ได้แก่ การเปรียบเทียบความแตกต่างของผลการตรวจวิเคราะห์เมื่อมีการเปลี่ยนผู้ทดสอบ 2 คน การเปรียบเทียบเมื่อมีการปรับเปลี่ยนอุณหภูมิของตัวอย่างจาก 40 องศาเซลเซียส เป็น 50 องศาเซลเซียส และการเปลี่ยนชนิดของขวดบรรจุตัวอย่างจากขวดแบบฝาจีบเป็นขวดแบบฝาเกลียว โดยใช้ตัวอย่างเลือดที่ระดับความเข้มข้น 48, 148 และ 300 มิลลิกรัมเปอร์เซ็นต์ เมื่อประเมินด้วยความแม่นยำและความเที่ยงโดยพิจารณาจากร้อยละการคืนกลับ และค่าฮอร์แรท แล้วพบว่าผลการทดสอบผ่านเกณฑ์การยอมรับทั้งหมด

## สรุปและอภิปรายผล

การพัฒนาวิธีครั้งนี้ มีจุดประสงค์เพื่อให้ได้วิธีการตรวจวิเคราะห์ระดับแอลกอฮอล์ในเลือดไว้ใช้ในงานประจำ ที่ให้ความน่าเชื่อถือและเป็นที่ยอมรับในความถูกต้องของผลการตรวจวิเคราะห์เพิ่มมากขึ้น ทดแทนวิธีเดิมซึ่งเป็นแบบคอลัมน์เดียว และใช้เวลาในการตรวจวิเคราะห์นานถึง 15 นาทีต่อหนึ่งขวด รวมทั้ง ต้องการเปลี่ยนมาตรฐานภายในจากเดิม คือ ไอโซโพรพานอล ไปใช้เทอร์เชียรีบิวทานอล วิธีวิเคราะห์แบบคอลัมน์คู่ สามารถยืนยันผลเทียบกันได้ระหว่าง 2 โครมาโทแกรม ทำให้มั่นใจในความถูกต้องของผลการตรวจวิเคราะห์เพิ่มมากขึ้น และด้วยเทคโนโลยีรวมถึงประสิทธิภาพของเครื่องมือและซอฟต์แวร์ที่ทันสมัยขึ้น ทำให้สามารถลดระยะเวลาการตรวจวิเคราะห์เหลือเพียง 4 นาทีต่อหนึ่งขวด เทียบกับวิธีการเดิมแล้วเร็วขึ้นเกือบ 4 เท่า โดยเอทานอลจะปรากฏพีคที่เวลาประมาณ 1.068 และ 1.175 นาที ในคอลัมน์ ดีบี-พีเอซี1 และดีบี-พีเอซี2 ตามลำดับ โดยอาจจะคลาดเคลื่อนได้บ้างเล็กน้อยจากการถอดประกอบอุปกรณ์ระหว่างการสอบเทียบเครื่องมือหรือมีการเปลี่ยนคอลัมน์ ทั้งนี้ หากพบว่ามีความคลาดเคลื่อนมากผิดปกติ จำเป็นต้องมีการทวนสอบเพิ่มเติมต่อไป ในส่วนของผลการทดสอบความถูกต้องของวิธี พบว่าวิธีการตรวจวิเคราะห์นี้ มีความถูกต้องและแม่นยำในการตรวจวิเคราะห์ระดับแอลกอฮอล์ในเลือด โดยวิธีการที่พัฒนาขึ้นมานี้มีความจำเพาะในการตรวจแยกสารที่ต้องการวิเคราะห์ มีค่าความเป็นเส้นตรง ความแม่นยำ ความเที่ยง และการทดสอบความทน อยู่ในเกณฑ์การยอมรับ มีค่าขีดจำกัดของการตรวจพบ เท่ากับ 5 มิลลิกรัมเปอร์เซ็นต์ และค่าขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ เท่ากับ 7 มิลลิกรัมเปอร์เซ็นต์ ซึ่งอยู่ในระดับที่เพียงพอต่อการทดสอบตัวอย่าง ดังนั้น วิธีการตรวจวิเคราะห์นี้มีความเหมาะสมที่จะนำไปใช้ในการตรวจวิเคราะห์ระดับแอลกอฮอล์ในเลือดและรายงานผลการวิเคราะห์ โดยมีข้อควรระวังคือ ควรรอให้เครื่องมืออยู่ในสภาวะคงที่ก่อนเริ่มการตรวจวิเคราะห์ และควรค้นตัวอย่างควบคุมคุณภาพภายใน (Internal quality control: IQC) ในลำดับของการทดสอบตัวอย่าง เพื่อเป็นการควบคุมคุณภาพในกระบวนการตรวจวิเคราะห์

## ข้อเสนอแนะ

นอกจากใช้ตรวจหาระดับแอลกอฮอล์ในเลือดแล้ว วิธีนี้ยังสามารถนำไปใช้ตรวจวิเคราะห์หาสารกลุ่มสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายชนิดอื่น ๆ รวมถึงการตรวจวิเคราะห์ในตัวอย่างชนิดอื่น ๆ นอกเหนือจากเลือด เช่น ซีรัม พลาสมา น้ำวุ้นลูกตา และปัสสาวะได้ แต่ต้องใช้มาตรฐานที่มีใบรับรองและทำการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์เพิ่มเติม ในส่วนของการพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์ครั้งนี้ ใช้ปริมาณเลือดตัวอย่างและสารมาตรฐานภายใน อย่างละ 200 ไมโครลิตร ผสมกันในสัดส่วน 1 ต่อ 1 ซึ่งตามปกติการเก็บตัวอย่างเลือดเพื่อส่งตรวจหาปริมาณแอลกอฮอล์ จะเก็บประมาณ 2 มิลลิลิตร จึงมี



ปริมาณตัวอย่างเพียงพอต่อการตรวจวิเคราะห์ตามปกติ หรือตรวจวิเคราะห์ใหม่แบบเจือจางตัวอย่าง ในกรณีที่ตรวจวิเคราะห์ครั้งแรกได้ค่าเกินกราฟมาตรฐาน หรือทำซ้ำในกรณีที่ค่าไม่ผ่านเกณฑ์การยอมรับทางสถิติที่ใช้ควบคุมคุณภาพในขั้นตอนการวิเคราะห์ อย่างไรก็ตาม บางกรณีอาจพบตัวอย่างเลือดที่ส่งตรวจมีปริมาณน้อยจนแทบไม่เพียงพอสำหรับการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่าง 2 ซ้ำได้ และอาจจำเป็นต้องลดปริมาณตัวอย่างและสารมาตรฐานภายในลงตามสัดส่วนของตัวอย่างเลือดที่ได้รับ ทั้งนี้ การเจือจางตัวอย่างและการลดปริมาณตัวอย่าง ย่อมมีผลกระทบต่อค่าที่ตรวจวิเคราะห์ได้ จึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติม เพื่อเปรียบเทียบผลของการเจือจางหรือลดปริมาณตัวอย่างลงไป ในส่วนของการรายงานผลระดับแอลกอฮอล์ในเลือดที่ตรวจวัดได้จากคอลัมน์คู่นั้น ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 6 ชลบุรี เลือกนำค่าที่ตรวจวัดได้จากคอลัมน์ดีบี-บีเอซี2 มาคำนวณค่าเฉลี่ยจากการทำ 2 ซ้ำ และพิจารณาโครมาโทแกรมที่ได้จากคอลัมน์ดีบี-บีเอซี1 เพื่อยืนยันเปรียบเทียบ ทั้งนี้ เนื่องจากผลการคำนวณค่าความไม่แน่นอนของการวัดจากคอลัมน์ดีบี-บีเอซี2 ได้ค่าที่ดีกว่าเล็กน้อย อย่างไรก็ตาม การตัดสินใจนำค่าที่ตรวจวัดได้จากคอลัมน์ทั้งคู่มาคำนวณและรายงานผลนี้ ห้องปฏิบัติการแต่ละแห่งสามารถพิจารณาได้ตามบริบทและความเหมาะสมของห้องปฏิบัติการเอง เพราะถึงแม้ว่าวิธีการตรวจวิเคราะห์จะได้รับการทดสอบความถูกต้องแล้วก็ตาม ห้องปฏิบัติการจะต้องมีกระบวนการควบคุมคุณภาพของห้องปฏิบัติการ มีการเข้าร่วมโปรแกรมการทดสอบความชำนาญ รวมถึงมีการรับรองความสามารถห้องปฏิบัติการตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025:2017 ซึ่งจะเป็นส่วนเสริมที่สำคัญในการสร้างความเชื่อมั่น ในผลการตรวจวิเคราะห์ด้วย

## เอกสารอ้างอิง

- Abercrombie, V. (2017). *Improved Resolution and Peak Shape Performance for Determination of Blood Alcohol Concentration Using Agilent J&W DB-BAC1 Ultra Inert and DB-BAC2 Ultra Inert Columns*. Retrieved January 16, 2019. from <https://www.agilent.com/cs/library/applications/5991-8206EN.pdf>
- Behnoush, B., Bazmi, E., Akhgari, M., Nazari, S. S. H., and Iravani F. S. (2010). Evaluation of Ethanol and n-Propanol in Victims. *Iranian Journal of Toxicology*, 3(3), 311-316
- Bernal, E. (2012). Determination of Volatile Substances in Forensic Samples by Static Headspace Gas Chromatography. In B. Salih (Ed.), *Gas Chromatography in Plant Science, Wine Technology, Toxicology and Some Specific Applications*. IntechOpen.
- Boswell, H., Dorman, F., and Lynam, K. (2013). *Determine Blood Alcohol with Dual Column/Dual FID for Precision and Reproducibility*. Retrieved January 16, 2019. from <https://sem.com.tr/wp-content/uploads/Determine-blood-alcohol-with-dual-columndual-FID-for-precision-and-reproducibility.pdf>
- Boumba, V., Kourkoumelis, N., Ziavrou, K S., Fragkouli, K., and Vougiouklakis, T. (2012). Patterns of the most abundant volatile detected in post-mortem blood. *Romanian Society of Legal Medicine*, 20, 147-154.



- Boumba, V., Ziavron. K. S., and Vougiouklakis, T. (2008). Biochemical pathways generating post-mortem volatile compounds co-detected during forensic ethanol analyses. *Forensic Science International*, 174, 133-151.
- Canfield, D. V., Smith, M. D., Adam, H. J., and Houston, E. R. (1998). *Selection of an Internal Standard for Postmortem ethanol Analysis*. Federal Aviation Administration. U.S. Department of Transportation.
- Jones, A. W. (1996). Measuring Alcohol in Blood and Breath for Forensic Purposes - A Historical Review. *Forensic Science Review*, 8(1), 13-44.
- Jumlongkul, A. (2016). Ethyl alcohol in forensic aspects. *Chulalongkorn Medical Journal*, 60(3), 283-296. (In Thai).
- Kongmebhol, V. (1986). The diagnosis of drinkers. *Chulalongkorn Medical Journal*, 30(8), 715-724. (In Thai).
- Ningnoi, T. (2006). A Practical Guide for Single Laboratory Method Validation of Chemical Methods. 1<sup>st</sup> Edition. Nonthaburi: Department of Medical Sciences. (In Thai).
- Okorocho, O. (2014). Flawed Blood Tests: The DUI Exception to Admissible Evidence. *Journal of Science and Technology*, 24(1), 211-231.
- Sharp, M. E. (2001). A Comprehensive Screen for Volatile Organic Compounds in Biological Fluids. *Journal of Analytical Toxicology*, 25, 631-636.
- Sreeganjant, P. (2019). *A Comparative Study of the Alcohol Concentration in Vitreous Humor and Blood with Headspace Gas Chromatography*. *Journal of Criminology and Forensic Science*, 6(1), 48-58. (In Thai).

### ประวัติผู้เขียน

คำนำหน้า ชื่อ-สกุล	นายวัชรชัย รุจิโรจน์กุล *
ตำแหน่ง/สถานะ	นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ชำนาญการ
ที่อยู่หน่วยงาน/สังกัด	ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 6 ชลบุรี ตำบลเสม็ด อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี 20000
ไปรษณีย์อิเล็กทรอนิกส์	watcharuj@gmail.com
คำนำหน้า ชื่อ-สกุล	นางสาวศุภิสรา สุขเกษม
ตำแหน่ง/สถานะ	นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ปฏิบัติการ
ที่อยู่หน่วยงาน/สังกัด	ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 6 ชลบุรี ตำบลเสม็ด อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี 20000
ไปรษณีย์อิเล็กทรอนิกส์	supisara.s@dmsc.mail.go.th

