مقایسه مقدار اتانول اندازه‌گیری‌شده به روش گاز کروماتوگرافی در نمونه‌های خون و ادرار اجساد

دکتر حسن توفیقی

دانشیار و مدیر گروه پزشکی قانونی و طب‌کار دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران

دکتر محمود قاضی‌خوانساری

استادیار گروه فارماکولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران

فائقه مقدم

کارشناس ارشد آزمایشگاه سم‌شناسی پزشکی قانونی

طره پریشان‌زاده

دکتر داروساز

خلاصه :

برخی از میکروارگانیسم‌ها با اثر بر موادی چون گلوکز، آمینواسیدها، گلیسرول و لاکتات موجود در جسد و خون می‌توانند موجب تولید الکل اتیلیک گردند.

احتمال وجود غلظتهای مختلفی از اتانول با دو منشاء مصرف مشروبات الکلی (اتانول برون‌زا) و یا فعالیت میکروارگانیسم‌ها (اتانول درون‌زا) از مشکلات تفسیری اتانول موجود در نمونه‌های خون به‌ویژه در موارد پزشکی قانونی است.

به علت ویژگی‌های کینتیکی، اتانول پس از مصرف به سرعت در ادرار ظاهر می‌شود. از سوی دیگر عدم حضور سوبسترای لازم جهت تولید اتانول درون‌زا موجب آنست که بتوان از نمونه ادرار، برای اطمینان از منشاء تولید اتانول موجود در خون استفاده نمود.

هدف از این بررسی، اولاً تعیین درصد نمونه‌های حاوی اتانول درون‌زا، ثانیاً تعیین دامنه غلظت اتانول درون‌زا در نمونه‌های خون اجساد تحت بررسی است.

آزمایشات در ۳۶ نمونه خون و ادرار به روش تقطیر و با استفاده از دستگاه گاز کروماتوگراف مجهز به دتکتور F.I.D، ستون Chromosorb/101 و استاندارد داخلی n.Propanol، انجام گرفته است. نتایج نشانگر آنست که اتانول موجود در ۳۱ نمونه (۸۶/۲%) نتیجه فعالیت میکروارگانیسم‌ها بوده و در پنج نمونه (۲۳/۸%) ناشی از مصرف مشروبات الکلی است. دامنهٔ غلظت اتانول ناشی از فساد ۲/۶-۱۲۵/۵mg/dl بوده و پراکندگی نمونه‌ها از نظر درصد غلظت اتانول به‌قرار زیر می‌باشد:

n=23 (74%) ≤ 50mg/dl

n=28 (90.3%) ≤ 70mg/dl

n=31 (100%) ≤ 125.5 mg/dl

مقدمه:

تعیین غلظت اتانول خون و تعیین منشاء ایجاد آن یکی از مسائل مطرح در پزشکی قانونی است. براساس مطالعات انجام‌شده، اتانولی که در خون یافت می‌شود، دارای دو منشاء می‌باشد: برون‌زا (اگزوژن) در اثر مصرف الکل و درون‌زا (اندوژن) در اثر عمل میکروارگانیسم‌ها (1,4,5).

متجاوز از ۱۳ نوع میکروارگانیسم اعم از گرم مثبت، گرم منفی و مخمر، با اثر بر موادی چون گلوکز و به مقدار کمتر بر لاکتات، گلیسرول و آمینواسیدها می‌توانند الکل تولید نمایند (2,5).

برای جلوگیری از پیشرفت فساد و تولید الکل در خون استفاده از سدیم فلوراید (NaF) ۱٪ پیشنهاد می‌گردد. با استفاده از سدیم‌فلوراید می‌توان نمونه را به‌مدت ۲ ماه در دمای اتاق و به‌مدت بیشتر در یخچال نگهداری نمود. طبق مطالعات انجام‌شده این ماده با وجود آنکه قادر است تولید الکل توسط اکثر میکروارگانیسم‌ها را متوقف کند، ولی بر تولید آن توسط کاندیدا آلبیکانس مؤثر نیست.

به‌عبارت دیگر در دمای معمولی حتی در حضور سدیم فلوراید، کاندیدا آلبیکانس قادر به تخمیر و تولید الکل می‌باشد و تنها عامل برای متوقف‌نمودن فعالیت این مخمر کاهش دمای محیط است (۲).

تولید الکل درون‌زا در نمونه‌های خون میکروارگانیسم‌های مختلف راه‌های متفاوتی برای تولید بیوشیمیایی الکل دارند، که معمولترین مسیر این واکنشها به‌قرار زیر است:

در اثر تخمیر، گلوکز به پیرووات تبدیل می‌شود (از راه گلیکولیز) سپس پیرووات حاصل، تحت اثر آنزیم پیرووات دکربوکسیلاز و کوآنزیم تیامین پیروفسفات به استالدئید و نهایتاً استالدئید توسط آنزیم الکل دهیدروژناز و در حضور NADH به اتانول تبدیل می‌شود. این مراحل در نمودار زیر نشان داده شده است (9).

1) Glucose —Glycolysis→ Pyruvate

2) Pyruvate —H+ → Co2→ Acetaldhyde

3) Acetaldehyde —NADH → NAD+→ Ethanol

پژوهشگاه علوم انسانی و مطالعات فرهنگی
پرتال جامع علوم انسانی

یکی از مشکلات تفسیری سم‌شناسی پزشکی قانونی است و به‌ویژه در مورد مقدار تولید آن بحثهای دامنه‌داری وجود دارد.

به‌علت ویژگی‌های کینتیکی، اتانول پس از مصرف به سرعت در مایعات بیولوژیکی بدن نظیر ادرار، مایع زجاجیه و مایع مغزی ـ نخاعی پدیدار می‌گردد.

با توجه به این واقعیت که معمولاً نمونه ادرار (جز در موارد استثنایی)، فاقد گلوکز می‌باشد، شرایط آن حتی در صورت آلودگی با میکروارگانیسم‌ها، برای تولید اتانول مهیا نیست، بنابراین الکل موجود در آن صرفاً ناشی از مصرف مشروبات الکلی محسوب می‌شود. بدین‌ترتیب اگر جسدی دارای نمونه ادرار باشد، این نمونه می‌تواند جهت اطمینان از منشاء الکل موجود در نمونه خون فاسد مورد استفاده قرار گیرد (4,6).

این بررسی با استفاده از نمونه ثانوی ادرار به منظور تشخیص و تعیین درصد نمونه‌های خون حاوی اتانول درون‌زا و نیز دامنه غلظت اتانول موجود در آنها انجام پذیرفته است.

روش بررسی:

آماده‌سازی نمونه‌ها به روش تقطیر و آنالیز الکل با استفاده از گاز کروماتوگرافی و استاندارد داخلی n-Propanol انجام گرفته است.

۱- وسایل مورد استفاده:

الف) دستگاه تقطیر،

ب) دستگاه گاز کروماتوگراف مدل 3700-Varian ستون Chromosorb/101، دتکتور F.I.D، گاز حامل ازت با سرعت 40cm3/min.

شرایط دمایی: ستون 145°c، روزنه تزریق 170°c و شناساگر 250°c.

۲- مواد و محلولهای مورد استفاده:

الف) اسید پیکریک اشباع،

ب) n-Propanol 1% (Merck)

ج) استاندارد اتانول (ویال Merck). (Art.No. 89913) به غلظتهای: 2.0mg/ml

1.5mg/ml, 1.3mg/ml, 1.0mg/ml, 0.8mg/ml

۳- طریقه نمونه‌گیری:

نمونه‌های خون قلب اجسادی که در مدت ۵ ماه از تاریخ مهر ماه سال ۱۳۷۳ تا پایان بهمن ماه همان سال از مراکز پزشکی قانونی تهران و شهرستان جهت بررسیهای سم‌شناسی به این مرکز ارجاع گردیده بود، مورد بررسی اولیه الکل به روش گاز کروماتوگرافی قرار گرفت. این نمونه‌ها با دارابودن دو شرط به عنوان نمونه‌های این

بررسی انتخاب گردیدند:

۱- وجود اتانول در نمونه خون.

۲- وجود نمونه ادرار همان جسد علاوه بر نمونه خون.

بدین ترتیب ۳۶ نمونه خون دارای الکل با منشاء نامعلوم (برون‌زا یا درون‌زا) همراه با نمونه‌های ادرار هر یک مورد بررسی مجدد قرار گرفت. کلیه نمونه‌ها تا زمان آزمایش در یخچال دمای ۴ درجه نگهداری شده و ضمن نمونه‌گیری نیز هیچ نوع ماده محافظی به آنها اضافه نگردیده بود.

۴- روش آزمایش:

الف) کالیبراسیون دستگاه و تعیین فاکتور با استفاده از غلظتهای مختلف اتانول استاندارد و n.Propanol 1% به‌عنوان استاندارد داخلی.

ب) بر 2cc از هر یک از نمونه‌های خون و ادرار استاندارد داخلی افزوده شده و عمل تقطیر انجام گرفت. نمونه‌های خون قبل از تقطیر توسط اسید پیکریک ـ دپروتئینه شدند.

ج) مقادیر مساوی از نمونه‌های خون و ادرار تقطیر شده به دستگاه گاز کروماتوگراف تزریق و با درنظرگرفتن فاکتور همان روز مقدار اتانول نمونه‌ها تعیین گردید.

یافته‌ها:

۳۶ نمونه مورد بررسی همه مرد و دامنه سنی آنها ۵۷-۲۰ سال بوده است.

۸۶٪ نمونه‌های ارسال شده از تهران و ۱۴٪ آنها از شهرستانها می‌باشد.

جدول شماره ۱ نشانگر مقادیر الکل خون و ادرار نمونه‌های مورد بررسی می‌باشد.

همانطور که در جدول ۱ مشاهده می‌شود ۵ نمونه خون با شماره‌های ۳، ۲۴، ۲۷، ۲۸، ۳۵ که مجموعاً ۲۳/۸٪ مجموع نمونه‌ها را تشکیل می‌دهند دارای اتانول در هر دو نمونه بیولوژیکی می‌باشند، به‌عبارت دیگر اتانول موجود در ۵ نمونه ذکرشده احتمالاً اگزوژن می‌باشد. ۳۱ نمونه دیگر یعنی ۸۶/۲٪ فقط دارای اتانول در خون هستند. بنابراین اتانول موجود در این نمونه‌ها ناشی از فساد (آندوژن) می‌باشد.

جدول شماره ۲، نشانگر مقادیر اتانول اندوژن در نمونه‌های خون مورد بررسی است.

میانگین مقادیر ۲۶/۱ و انحراف معیار ۳۰/۱ در دامنه ۱۲۵/۵-۲/۶، میلیگرم در دسی‌لیتر می‌باشد.

میانگین غلظت خونی الکل در نمونه‌های فوق ۷۵/۳mg/dl با انحراف معیار ۳۷/۴ در دامنه ۱۱۲/۸mg/dl-۹ می‌باشد.

بحث و نتیجه‌گیری:

به علت هیدروفیل‌بودن مولکول اتانول، الگوی انتشار آن در بافتها و مایعات بدن به نسبت آب آنها می‌باشد. بنابراین در صورت اگزوژن‌بودن اتانول می‌توان غلظتهای

جدول شماره (۱): مقادیر (mg/dl) اتانول در نمونه‌های خون و ادرار مورد بررسی

شماره نمونه	درصد الکل خون	درصد الکل ادرار	شماره نمونه	درصد الکل خون	درصد الکل ادرار
۱	۱۰	۰	۱۹	۲/۶	۰
۲	۷۰	۰	۲۰	۱۱	۰
۳	۹	۵۶	۲۱	۷/۸	۰
۴	۵۲	۰	*۲۲	۶/۱	۰
۵	۶۰	۰	۲۳	۱۲	۰
۶	۱۴	۰	۲۴	۱۱۲/۸	۱۱۸/۸
۷	۵۸	۰	۲۵	۴/۶	۰
۸	۳۴	۰	۲۶	۱۲/۲	۰
۹	۵	۰	۲۷	۷۵	۶۸/۵
۱۰	۲۹	۰	۲۸	۷۰/۵	۱۱۷/۶
۱۱	۱۳	۰	۲۹	۵۱/۳	۰
۱۲	۲۲	۰	۳۰	۳/۸	۰
۱۳	۵	۰	۳۲	۴/۹	۰
۱۴	۱۲	۰	۳۳	۷۹	۰
۱۵	۳۸	۰	۳۴	۱۲۵/۵	۰
۱۶	۵	۰	۳۵	۱۰۹/۳	۷۴/۸
۱۷	۸/۱	۰	۳۶	۱۰۲/۹	۰
۱۸	۸/۷	۰			

* نمونه دارای ۹۱mg/dl متانول می‌باشد.

پژوهشگاه علوم انسانی و مطالعات فرهنگی
پرتال جامع علوم انسانی

مختلفی از آن را در بافتهای مختلف یافت. مطالعات محققان بسیاری وجود ضرایب نسبتاً مشخصی را بین درصد انتشار اتانول در بافتها و مایعات مختلف نشان می‌دهد که بر حسب این گزارشات نسبت الکل خون به ادرار، نزدیک به یک می‌باشد (8) (همانطور که در نمونه‌های شماره ۲۴ و ۲۷ دیده می‌شود) ولی عوامل مختلفی می‌تواند ضرایب پیشنهادی را تغییر دهد توجه به این عوامل می‌تواند در تفسیر یافته‌ها و حتی تعیین علت مرگ راهگشا باشد. مثلاً در نمونه شماره ۳، اتانول ادرار ۶/۲ برابر غلظت خونی آن می‌باشد. که این امر می‌تواند ناشی از دو علت باشد: یکی

جدول شماره (۲): مقادیر (mg/dl) اتانول درون‌زا در ۳۱ نمونه خون

شماره نمونه	درصد الکل خون	شماره نمونه	درصد الکل خون
۱	۱۰	۱۷	۸/۱۲
۲	۷۰	۱۸	۸/۷
۴	۵۲	۱۹	۲/۶
۵	۶۰	۲۰	۱۱/۱
۶	۱۴	۲۱	۷/۸
۷	۵۸	۲۲	۶/۱
۸	۳۴	۲۳	۱۲
۹	۵	۲۵	۴/۶
۱۰	۲۹	۲۶	۱۲/۲
۱۱	۱۳	۲۹	۵۱/۳
۱۲	۲۲	۳۰	۳/۸
۱۳	۵	۳۱	۳
۱۴	۱۲	۳۲	۴/۹
۱۵	۳۸	۳۳	۷/۹
۱۶	۵	۳۴	۱۲۵/۵
		۳۶	۱۰۲/۹

پژوهشگاه علوم انسانی و مطالعات فرهنگی
پرتال جامع علوم انسانی

جدول شماره (۳) : نشانگر درصد تجمعی مقدار الکل درون‌زا در نمونه‌های خون است.

درصد تجمعی تعداد نمونه‌ها	تعداد نمونه	دامنه غلظت الکل خون (mg/dl)
۷۴/۰	۲۳	۵۰
۹۰/۳	۳۸	۷۰
۱۰۰/۰	۳۱	۱۲۵/۵

جدول شماره (۴) : نشانگر اتانول برون‌زا (ناشی از مصرف مشروبات الکلی) در نمونه‌های خون و ادرار است.

شماره نمونه	درصد اتانول خون	درصد اتانول ادرار
۳	۹	۵۶
۲۴	۱۱۲/۸	۱۱۸/۸
۲۷	۷۵	۶۸/۵
۲۸	۷۰/۵	۱۱۷/۶
۳۵	۱۰۹/۳	۷۴/۸

احتباس ادرار به‌مدت طولانی سبب می‌شود که علیرغم کاهش اتانول خون در این‌گونه موارد (در اثر متابولیزاسیون الکل ـ اگزوژن) مقدار اتانول ادرار در زمان مرگ بسیار بیش از سطح خونی باشد و درواقع مقدار آن نمایانگر غلظت اتانول ادرار در مجموع ساعات ترشح ادراری است. این پدیده بخصوص در مورد افرادی که به‌دنبال یک دورهٔ کومای طولانی فوت می‌نمایند، مشاهده می‌شود. دلیل دیگر احتمال ابتلاء شخص به بیماری دیابت و وجود گلوکز در ادرار می‌باشد که در آنصورت پس از مرگ مهیابودن شرایط رشد میکروارگانیسمها سبب تخمیر گلوکز و تولید الکل ثانوی ادرار خواهد بود (1,4). نمونه ۲۸ نیز به میزان کمتری چنین تفاوتی را نشان می‌دهد.

در مورد نمونه شماره ۳۵ نوع دیگری از ارتباط بین غلظت اتانول خون و ادرار وجود دارد. همان‌طوری که در جدول شماره ۱ و ۴ مشاهده می‌شود غلظت خونی نمونه شماره ۳۵ بسیار بیشتر از غلظت ادراری آن است. علت این تفاوت غلظت در نمونه خون و ادرار می‌تواند ناشی از دو فاکتور باشد: اولین فاکتور، فاکتور احتمالی پیشرفت فساد در نمونه خون و تولید اتانول اندوژن علاوه بر وجود اتانول اگزوژن می‌باشد، از سوی دیگر غلظت اتانون خون افرادی که در فاز جذب فوت کرده باشند، معمولاً بیش از غلظت اتانول ادرار و سایر نمونه‌های بیولژیکی آنهاست (۷) بنابراین این فاکتور نیز باید به‌عنوان یک علت احتمالی دیگر مورد نظر قرار گیرد.

نتایج این بررسی نشانگر آن است که نمونه‌های دارای الکل اندوژن بیشترین درصد نمونه‌های حاوی الکل را در آزمایشگاه سم‌شناسی پزشکی قانونی تشکیل می‌دهند. لذا باید در تشخیص این نمونه‌ها از نمونه‌های اگزوژن دقت کافی بعمل آورد، بدین‌منظور:

۱- حفاظت از نمونه‌های خون سالم و جلوگیری از رشد میکروارگانیسم‌ها با استفاده از سدیم فلوراید ۱٪ و ارسال آن در بسته‌بندی‌های مناسب در دمای کمتر از ۴ درجه سانتیگراد امری است

ضروری.

۲- در صورت عدم استفاده از سدیم فلوراید درصد بزرگی از نمونه‌های مثبت در پزشکی قانونی (۸۷٪) دارای منشاء اتانول اندوژن خواهند بود و از سوی دیگر با توجه به دامنه وسیع غلظت اتانول درون‌زا در این بررسی (۲/۶-۱۲۵/۵mg/dl)، مقدار الکل موجود نمی‌تواند راهنمای قضاوت منشاء اتانول باشد، بلکه فقط استفاده از یک نمونه ثانوی مانند ادرار و مایع زجاجیه می‌تواند به تعیین منشاء واقعی اتانول کمک کند.

منابع:

1. Baker. R.C., Plsona, R.V., Sopher, I.n.
   The comparison of Alcohl Concentration in Postmortem fluids and Tissuses. J. of Forensic Sciences, 25:327-331 (1980).
2. Blume P., Lukutaa D.J. The effect of Microbial Contamination of the Blood sample in the determination of Ethanol level in serum. Am.J.Clin. Path. 60:700-702 (1973).
3. Briglia, E.g., and etal. The Distribution of Ethanol in Postmortem Blood specimens, J. of forensic sciences, 37: 991-998 (1992).
4. Badd, R.D. Ethanol levels in postmortem in body fluids. J. of chromatography, 52: 315-318 (1982).
5. Clark, M.Q., Jones J.W., studies on putrefactive Ethanol production, J. of forensic sciences, 27: 306-371 (1982).
6. Goodman & Gillman, The pharmacology Basis of Therapeutics (1991).
7. Heateg, M.K. The Blodd Alcohl concentration of postmortem in 145 Fatal cases of Alcohl intoxication. Med, scie. law, 30: 101-5 (1990).
8. Parikh's Texbook of Medical Jurisradance and Toxicology. p: 846-866 (1992).
9. Stryer, L. Biochemistry, Third Ed. Freaman and company (1988).