پژوهشی

بررسی تاثیر دما، زمان و غلظت سدیم فلوراید بر روی نتایج حاصل از آنالیز الکل در نمونه‌های خون حیوان موش صحرایی، نژاد ویستار

احمدرضا حیدری*- دکتر محمد جواد خشنود**

* کارشناس ارشد سم شناسی، اداره کل پزشکی قانونی استان چهارمحال و بختیاری، شهرکرد، ایران

** متخصص فارماکولوژی و سم شناسی دانشیار و عضو هیات علمی دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی شیراز، گروه سم شناسی، شیراز، ایران

چکیده

زمینه و هدف: سنجش الکل در نمونه‌های زیستی مانند خون امروزه حجم وسیعی از ارجاع به آزمایشگاه سم شناسی قانونی را شامل می‌شود. تشخیص اتانول در نمونه‌های خون و تفسیر آن یکی از مسائل ضروری در پزشکی قانونی است. عوامل متعدد بیوشیمیایی و بیولوژیک بر تغییر غلظت اتانول در نمونه‌های زیستی مؤثرند. قرارگیری نمونه‌ها در شرایط نامساعد (سپری شدن زمان طولانی تا انجام آزمایش، مقدار ناکافی ماده نگهدارنده به نمونه و دمای نامساعد) بر روی غلظت اتانول تاثیرگذار است. هدف از این مطالعه بررسی اثر دما، زمان و میزان سدیم فلوراید افزوده شده (به عنوان ماده نگهدارنده) بر روی نتایج حاصل از آنالیز کمی الکل در نمونه‌های خون می‌باشد.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی، از ۳۶ سر موش صحرایی نر، نژاد ویستار در سه گروه دوازده تایی استفاده شد. سه ساعت قبل از نمونه‌گیری به میزان ۳ میلی لیتر اتانول (۳۰٪ با آب مقطر) گاواژ گردید. به منظور بررسی اثر ماده نگهدارنده سدیم فلوراید (غلظت‌های ۰/۵٪، ۱٪، ۱/۵٪ وزنی – حجمی) ، دما (منهای ۸ ، ۴ و ۲۵ درجه سانتی گراد) و زمان (صفر، ۱۰و ۲۰ روز بعد از نمونه‌گیری)، از هر گروه نمونه خون اخذ شد و با استفاده از دستگاه گازکروماتوگرافی مجهز به headspace اتانول مورد سنجش قرار گرفت به منظور ارزیابی نتایج، از آزمون one-way ANOVA و پس آزمون‌های LSD و SNK جهت مقایسه گروه‌ها استفاده شد. از روش general liner model و Repeated measure نیز جهت تشخیص تفاوت غلظت‌ها در زمان‌های مختلف استفاده گردید.

یافته‌ها: نتایج نشان دادند که در دماهای منهای ۸ و ۲۵ درجه سانتی گراد با سدیم فلوراید ۱٪ وزنی – حجمی پس از سپری شدن زمان ۱۰و ۲۰ روز، کاهش غلظت اتانول دیده می‌شود ولی افزایش یا کاهش غلظت اتانول در دمای ۴ درجه سانتی گراد به همراه سدیم فلوراید ۱٪ پس از ۲۰ روز معنی‌دار نبود. کاهش غلظت اتانول در نمونه‌های خون دارای غلظت ماده محافظ کمتر، بیشتر بود.

نتیجه‌گیری: جهت نگهداری نمونه‌های خون به منظور بررسی اتانول بهتر است نمونه‌ها در دمای ۴ درجه سانتی گراد قرار گیرد و سدیم فلوراید به میزان ۱٪ وزنی – حجمی مورد استفاده واقع شود.

کلمات کلیدی: خون، اتانول، گاز کروماتوگرافی ،سدیم فلوراید، دما و مدت زمان نگهداری

وصول مقاله: ۹۲/۰۷/۲۱ تایید مقاله: ۹۲/۱۰/۲۲

نویسنده پاسخگو: کارشناس ارشد سم شناسی – اداره کل پزشکی قانونی استان چهارمحال و بختیاری- شهرکرد – ایران- شماره تماس: ۲- ۳۳۳۸۸۰۰- ۰۳۸۱

پست الکترونیک : arheidari88@yahoo.com

مقدمه

سنجش الکل و بررسی سوء مصرف آن امروزه حجم وسیعی از ارجاع‌ها به آزمایشگاه سم شناسی قانونی را شامل می‌شود. تشخیص اتانول در نمونه‌های خون و تفسیر آن یکی از مسائل ضروری در موارد پزشکی قانونی است و نقش مهمی در سرنوشت پرونده‌های قضایی دارد. عوامل متعدد بیوشیمیایی و بیولوژیک بر غلظت اتانول در نمونه‌های زیستی موثرند. وجود عوامل مداخله‌گر، تفسیر نتایج حاصل از آنالیز الکل را با مشکل مواجه می‌کند (۳-۱).

دما و مدت زمان نگهداری نمونه‌های زیستی نقش مهمی در تولید و یا از دست رفتن اتانول از نمونه‌ها ایفا می‌کند (۱،۴).

Lewis و همکارانش در سال ۲۰۰۴ نشان دادند که فعالیت متابولیک

[Downloaded from sjfm.ir on 2024-07-17]

میکروارگانیسم‌ها در دمای پایین کمتر است. در نمونه خون، تولید اسیدهای ناشی از تخمیر کربوهیدرات‌ها، اسیدهای آمینه و الکل، pH نمونه را به سمت اسیدی برده و فعالیت میکروارگانیسم‌های حساس به pH کاسته می‌شود. همچنین در هر نمونه میزان مشخصی از مواد مغذی جهت فعالیت میکروارگانیسم‌ها وجود دارد و با تمام شدن این مواد مغذی میزان الکل در نمونه ثابت خواهد ماند (۴).

مطالعات قبلی نشان داده‌اند که برخی از میکروارگانیسم‌ها از اتانول به عنوان منبع کربن و انرژی استفاده می‌کنند و این میکروارگانیسم‌ها می‌توانند موجب کاهش غلظت الکل اتیلیک در نمونه شوند (۹-۵).

Olszowy و همکارانش در مطالعه‌ای جهت بررسی پایداری الکل اتیلیک در زجاجیه دریافتند که قرار دادن نمونه‌ها به مدت یک ماه و سه ماه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد تأثیری در غلظت الکل اتیلیک نداشته است و تنها در ۸ نمونه از ۵۰ نمونه مورد بررسی پس از سه ماه کاهش غلظت الکل اتیلیک گزارش شد (۱۰).

Amick و همکارانش نشان دادند که تولید اتانول در نمونه‌های خون که درون لوله‌های حاوی سدیم فلوراید جمع آوری و در دمای ۴ و۸- درجه نگهداری می‌شوند به وسیله ساکارومایسز سروویزیه۱ کاهش یافته است (۱۱) برخی از محققان نشان داده‌اند که غلظت اتانول در نمونه‌های زیستی در مواردی به جای افزایش، کاهش می‌یابد (۱۳،۱۲). با توجه به موارد فوق هدف از این مطالعه، تاثیر نگهداری نمونه‌ها بر پایداری الکل در نمونه‌های خون، غلظت سدیم فلوراید که به عنوان ماده محافظ و دما می‌باشند در شرایط دمایی مختلف مورد بررسی قرار گرفت. در این مطالعه تمامی این تغییرها به صورت همزمان بررسی شده‌اند زیرا به نظر می‌رسد بعضی از این عوامل تاثیرگذار بر روی غلظت الکل، اثر یکدیگر را تشدید می‌کنند.

روش بررسی

نمونه گیری: در این مطالعه تجربی، ۳۶ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار با وزن بین ۲۸۰ تا ۳۰۰ گرم که از محل تهیه حیوانات تهیه شدند در سه گروه دوازده‌تایی قرار داده شد سه ساعت قبل از نمونه‌گیری، ۳ میلی لیتر اتانول ۳۰٪ در آب مقطر گاواژ گردید. بعد از ۳ ساعت حیوانات را با دی اتیل اتر بیهوش نموده و نمونه خون آن‌ها به صورت مستقیم از قلب اخذ گردید. به نمونه‌های خون هر کدام از ۱۲حیوان گروه اول سدیم فلوراید (به عنوان ماده نگهدارنده) به میزان ۰/۵٪ (وزنی –حجمی) اضافه شد، به نمونه‌های خون هر کدام از ۱۲ حیوان گروه دوم سدیم فلوراید، به میزان ۱٪ (وزنی –حجمی) اضافه شد و به نمونه‌های خون هر کدام از ۱۲ حیوان گروه سوم، سدیم فلوراید به میزان ۱/۵٪ (وزنی –حجمی) اضافه شد. نمونه خون هر کدام از این گروه‌ها به سه قسمت تقسیم گردید و در دمای ۸- درجه سانتی‌گراد، ۴ درجه سانتی‌گراد و ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

1 -Sacharomyces Cervisae

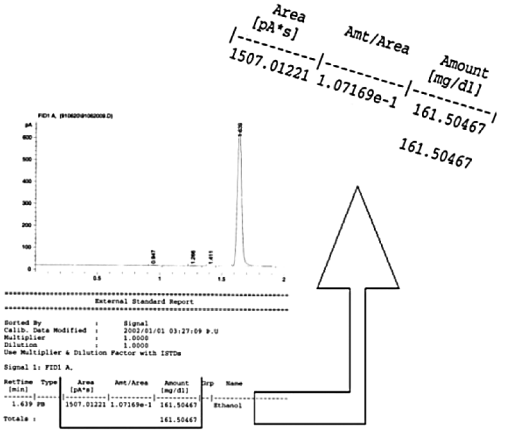
نمونه‌ها در زمان‌های (صفر، ۱۰و۲۰ روز بعد از نمونه‌گیری) مورد آنالیز اتانول قرار گرفت.

مواد و دستگاه‌ها: اندازه‌گیری غلظت الکل در خون با دستگاه Headspace Gas Chromatography (HS-GC-FID) ساخت کارخانه Agilent آمریکا که روش مرجع اندازه‌گیری اتانول و سایر مواد فرار در نمونه‌های زیستی است، انجام گردید. دستگاه GC، مدل Agilent technologies 6890N، مجهز به Headspace مدل Agilent technologies 1888، ستون با مشخصات JM Scientific با شماره کاتالوگ DB-ALC1،۱۲۳۹۱۳۴ و به طول ۳۰ متر، ضخامت ۰/۳۲ و قطر ۱/۸ میکرون می‌باشد.

شرایط دمایی: دمای دتکتور (FID)، ۳۰۰ درجه سانتی‌گراد، دمای آون ۳۵ درجه سانتی‌گراد.

سرعت جریان هیدروژن (H2 flow) ۴۰ میلی لیتر بر دقیقه ، جریان هوا، ۴۰۰ میلی‌لیتر بر دقیقه، split ratio معادل۱/۵ و make up flow برابر با ۱۵ میلی لیتر بر دقیقه می‌باشد.

اندازه‌گیری: محلول استاندارد اتانول در رقت‌های ۰، ۰,۰۰۰۱۹۵٪، ۰,۰۰۰۳۹٪ ، ۰,۰۰۰۷۸٪ ، ۰,۰۰۱۵۶٪ ، ۰,۰۰۳۱۲۵٪، ۰,۰۰۶۲۵٪ ،۰,۰۱۲۵٪، ۰,۰۲۵٪، ۰,۰۵٪ ،۰,۱٪، ۰,۲٪، ۰,۳٪، ۰,۴٪، ۰,۵٪ و ۰,۶٪،۰,۷٪ ، ۰,۸٪ حجمی–حجمی (V/V) با آب دو بار دیونیزه شده تهیه شد. که با توجه به این که چگالی اتانول 0.792Kg/L می‌باشد غلظت‌های آن‌ها به ترتیب 0 mg/dl، 0/154 mg/dl، 0/308 mg/dl، 0/617 mg/dl، 1/235 mg/dl ، 2/475 mg/dl، 4/95 mg/dl، 9/9 mg/dl، 19/8 mg/dl، 39/6 mg/dl و 79/2 mg/dl، 158 mg/dl، 237/6 mg/dl، 316/8 mg/dl، 396 mg/dl و 475/2 mg/dl ، 554/4 mg/dl و 633/6 mg/dl می باشند. هر کدام از رقت‌های مذکور سه بار به دستگاه تزریق شد و میانگین محاسبه شد. غلظت الکل نمونه سطح زیر منحنی توسط دستگاه محاسبه و منحنی کالیبراسیون ترسیم گردید. پیک استاندارد به دست آمده از دستگاه در شکل زیر نمایش داده شده است.



شکل ۱- پیک غلظت ۰/۲٪ اتانول

[Downloaded from sjfm.ir on 2024-07-17]

محدوده شناسایی (LOD) در این روش ۰/۱ میلی‌گرم در دسی لیتر و محدوده اندازه گیری LOQ برابر ۱میلی‌گرم در دسی‌لیتر و میزان الکل موجود در خون بر حسب میلی‌گرم درصد میلی لیتر محاسبه گردید.

محاسبات آماری: داده‌های غلظت اتانول در خون بر حسب میلی گرم درصد محاسبه گردید و به صورت میانگین و انحراف معیار(mean+SD) را به دست گزارش و به منظور ارزیابی نتایج، از آزمون one-way ANOVA و پس آزمون LSD و SNK جهت مقایسه گروه‌ها استفاده شد. از روش general liner model و بعد Repeated measure جهت تشخیص تفاوت غلظت در میان زمان‌های مختلف استفاده شد. تمامی آزمون‌ها توسط نرم افزار 18SPSS انجام شده و اختلاف میانگین‌ها با استفاده از p-value در مقایسه با مقدار α که برابر ۰،۰۵ می باشد معنی‌دار در نظر گرفته شد.

نتایج

ترسیم منحنی کالیبراسیون:

۱۸ نمونه استاندارد به دستگاه تزریق و و بعد از سه بار تزریق هر نمونه میانگین و انحراف معیار در هر مورد به دست آمد و سپس منحنی کالیبراسیون ترسیم گردید (نمودار ۱).

بعد از ترسیم منحنی کالیبراسیون، تمام داده‌های نمونه‌های تزریق شده به دستگاه در زمان‌های صفر، ۱۰ روز بعد و ۲۰ روز بعد جمع آوری شدند و میانگین و انحراف از معیار آن‌ها مطابق جدول ۱، ۲ و ۳ به دست آمد.

نمونه‌ها جهت بررسی در سه گروه قرار گرفتند که گروه ۱ شامل نمونه‌هایی است که دارای سدیم فلوراید ۰/۵٪، گروه ۲ شامل نمونه‌هایی است که دارای سدیم فلوراید ۱٪ و گروه ۳ شامل نمونه‌هایی است که دارای سدیم فلوراید ۱/۵٪ به عنوان ماده نگهدارنده می‌باشند.

جدول ۱- میانگین و انحراف از معیار غلظت الکل در زمان صفر، ۱۰ روز و ۲۰ روز بعد در شرایط نگهداری در دماهای مختلف با غلظت سدیم فلوراید ۰/۵٪ وزنی- حجمی

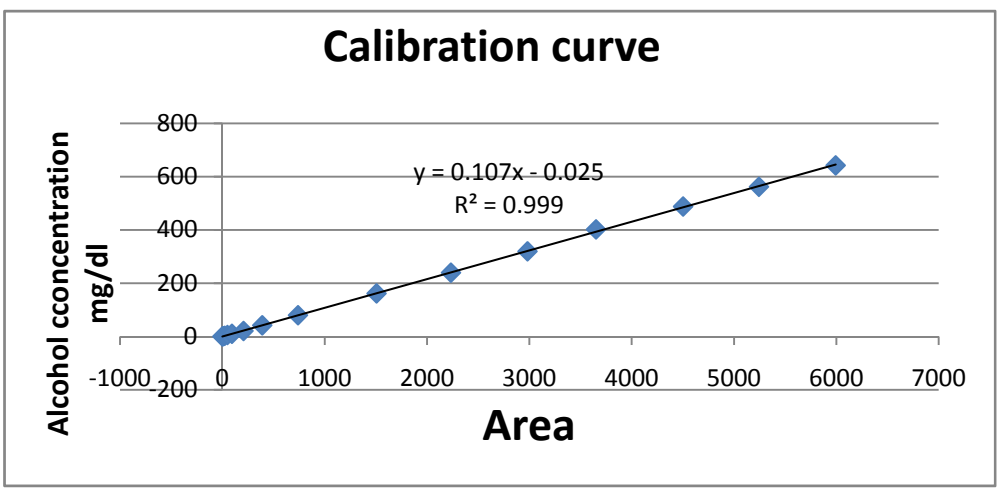
دما	غلظت اتانول (mg/dl) Mean ± SD (زمان صفر)	غلظت اتانول (mg/dl) Mean ± SD (۱۰ روز بعد)	غلظت اتانول (mg/dl) Mean ± SD (۲۰ روز بعد)
-۸°c	۵۷۴.۷۵±۲۸۰.۳۴	۱۳۹.۲۵±۹۳.۵۶ a	۴۶.۷۵±۴۲.۰۵ a,b
۴°c	۵۷۷.۲۵±۸۸.۲۶	۲۱۹.۲۵±۷۳.۴۰ a	۶۲.۲۵±۲۹.۶۰ a,b
۲۵°c	۴۴۰.۷۵±۱۷۲.۲۹	۱۶۰.۷۵±۱۱۶.۹ a	۲۲±۶.۴۴ a,b

نمونه‌های گروه ۱ که شامل ماده نگهدارنده ۰/۵٪ سدیم فلوراید می‌باشند ابتدا در زمان صفر غلظت الکل آن‌ها اندازه‌گیری شد و سپس بعد از انکوباسیون در دماهای ۸- و ۴ و ۲۵ درجه سانتی‌گراد طی زمان‌های ۱۰ روز و ۲۰ روز بعد مجددا غلظت الکل آن‌ها اندازه‌گیری شد.

a تفاوت معنی‌دار با گروه زمان صفر. ($p<0.05$)

b تفاوت معنی‌دار با گروه زمان ۱۰ روز بعد ($p<0.05$).

نمونه‌های گروه ۲ که شامل ماده نگهدارنده ۱٪ سدیم فلوراید می‌باشند ابتدا در زمان صفر غلظت الکل آن‌ها اندازه‌گیری شد و سپس بعد از انکوباسیون در دماهای ۸- و ۴ و ۲۵ درجه سانتی‌گراد طی زمان‌های



نمودار ۱- منحنی کالیبراسیون استاندارد اتانول (بر حسب میانگین و انحراف معیار)و اندازه سطح زیر منحنی

[Downloaded from sjfm.ir on 2024-07-17]

جدول ۲- میانگین و انحراف از معیار غلظت الکل در زمان صفر، ۱۰ روز و ۲۰ روز بعد در شرایط نگهداری در دماهای مختلف با غلظت سدیم فلوراید ۱٪ وزنی- حجمی

دما	غلظت اتانول (mg/dl) Mean ± SD (زمان صفر)	غلظت اتانول (mg/dl) Mean ± SD (۱۰ روز بعد)	غلظت اتانول (mg/dl) Mean ± SD (۲۰ روز بعد)
c°۸-	۹۱,۵۵ ± ۲۷۱,۶۶	۲۲,۳۳ ± ۸۴ a	۷,۳۷۱ ± ۱۰,۶۶ a,b
c°۴	۴۸,۶۱ ± ۲۲۹,۵	۴۸,۷۱ ± ۲۲۷	۱۰۹,۰۳ ± ۱۶۲,۷۵
c°۲۵	۱۸۷,۱۰ ± ۴۳۷	۲,۸۲ ± ۱۱۸,۶ a	۲,۰۰ ± ۱۹,۰۰ a,b

جـدول ۳ - میانگین و انحراف از معیار غلظت الکل در زمان صفر، ۱۰ روز و ۲۰ روز بعد در شـرایط نگهداری در دماهای مختلف با غلظت سـدیم فلوراید ۱/۵٪ وزنی- حجمی

دما	غلظت اتانول (mg/dl) Mean ± SD (زمان صفر)	غلظت اتانول (mg/dl) Mean ± SD (۱۰ روز بعد)	غلظت اتانول (mg/dl) Mean ± SD (۲۰ روز بعد)
-۸°c	۵۸۰±۶۸.۲۶	۴۰۳±۱۷.۷ a	۲۲۷.۲۵±۹۰.۱ a,b
۴°c	۳۷۹±۲۳.۴۹	۱۵۷.۷۵±۹۹.۳۶ a	۶۱.۷۵±۵۱.۰۷ a,b
۲۵°c	۴۷۹.۲۵±۸۳.۸	۲۰۷.۷۵±۴۸.۹۳ a	۶۹.۵±۹.۵۱ a,b

۱۰ روز و ۲۰ روز بعد مجددا غلظت الکل آن‌ها اندازه‌گیری شد.

a تفاوت معنی‌دار با گروه زمان صفر. ($p<0.05$)

b تفاوت معنی‌دار با گروه زمان ۱۰ روز بعد ($p<0.05$).

نمونه‌هـای گروه ۳ که شـامل مـاده نگهدارنده ۱/۵٪ سـدیم فلوراید می‌باشند ابتدا در زمان صفر غلظت الکل آن‌ها اندازه‌گیری شد و سپس بعد از انکوباسـیون در دماهـای ۸- و ۴ و ۲۵ درجه سـانتی‌گراد طی زمان‌هـای ۱۰ روز و ۲۰ روز بعد مجدداً غلظت الکل آن‌ها اندازه‌گیری شد.

a تفاوت معنی‌دار با گروه زمان صفر. ($p<0.05$)

b تفاوت معنی‌دار با گروه زمان ۱۰ روز بعد ($p<0.05$).

بحث و نتیجه‌گیری

تشخیص الکل در نمونه‌های بیولوژیک یکی از مهم‌ترین و متداول‌ترین روش‌های آزمون‌ها در سم‌شناسـی قانونی می‌باشد. نمونه‌های متداول که برای آنالیز الکل مورد اسـتفاده واقع شـده‌اند، معمولاً خون و ادرار می‌باشـند. اتانول وقتی در شـرایط مختلف، نگهداری می‌شود می‌تواند افزایش و یا کاهش یابد (۵،۱۳،۱۴).

کاهش غلظت اتانول به چندیـن فاکتور از جمله مدت زمان نگهداری، دمـای نگهـداری و غلظت سـدیم فلوراید، غلظت اتانـول و نوع ظرف نگهداری بستگی دارد (۱۵).

دمای نگهداری و مدت زمان نگهداری نمونه نقش مهمی در تولید و یا از دست رفتن اتانول از نمونه‌های زیستی ایفا می‌کند (۱،۴).

Lewis و همکارانش در سـال ۲۰۰۴ نشان دادند که فعالیت متابولیک میکروارگانیسـم‌ها در دمای پایین کمتر اسـت. طبق مطالعه ایشان بر روی نمونـه خون، تولید اسـیدهای ناشـی از تخمیـر کربوهیدرات‌ها، اسـیدهای آمینه و الکل pH نمونه را به سـمت اسیدی برده و فعالیت میکروارگانیسـم‌های حساس به pH کاسته می‌شـود. همچنین در هر نمونه میزان مشـخصی از مواد مغذی جهت فعالیت میکروارگانیسم‌ها وجود دارد و با تمام شـدن این مواد مغذی میزان الکل در نمونه ثابت خواهد ماند (۴)ثابت ماندن میزان الکل تولید شده در فاصله زمانی بعد از ۲۰ روز می‌توانـد بیانگر کاهش فعالیت میکروارگانیسـم‌ها و یا اتمام ذخایر مواد مغذی موجود در نمونه باشد.

همچنیـن مطابق با مطالعـه Kallirroe و همکارانـش تولید اتانول در نمونه‌ها به شـدت آلودگی میکروبی نمونه وابسـته است و می‌تواند به میـزان متغیر صورت گیرد (۱۶). Olszowy و همکارانش در مطالعه‌ای بر روی پایداری الـکل اتیلیک دریافتند که قرار دادن نمونه‌ها به مدت یک ماه و سـه ماه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد تأثیری در غلظت الکل اتیلیک نداشـت و تنها در ۸ نمونه از ۵۰ نمونه پس از سـه ماه کاهش غلظت الکل اتیلیک دیده شد (۱۰).

کاهـش غلظت الکل اتیلیک می‌تواند به دلایل مختلفی صورت گیرد. از آن‌جایی که الکل اتیلیک ماده‌ای فرار بوده و به جهت ماهیت ساختمانی خـود در دمای بالا به حالت گاز تبدیل می‌شـود خروج الکل اتیلیک از نمونه (با وجود بسـته بودن کامل درب ظرف) متحمل است. همچنین طبق مطالعات گذشته توسط Kugelberg و Jonse علاوه بر تولید اتانول در نمونه‌های زیستی برخی از میکروارگانیسم‌ها از اتانول به عنوان منبع کربن و انرژی استفاده می‌کنند. این میکروارگانیسم‌ها می‌توانند موجب کاهش غلظت الکل اتیلیک در نمونه شوند (۹-۵).

مطالعات گذشته تأکید کرده‌اند که اتانول و سایر داروها در نمونه خون پس از مدت زمان طولانی در ۴ درجه سـانتی‌گراد ناپایدارند و پایداری اتانول در نمونه خون را منوط به استفاده از سدیم فلوراید در این نمونه

[Downloaded from sjfm.ir on 2024-07-17]

جدول ۴ - میانگین و انحراف معیار غلظت الکل در زمان صفر، ۱۰ روز و ۲۰ روز بعد در شرایط نگهداری در دماهای مختلف با غلظت‌های مختلف سدیم فلوراید

گروه	دما	درصد سدیم فلوراید mg/dl	میانگین غلظت در زمان صفر mg/dl	انحراف از معیار زمان صفر	میانگین غلظت در زمان ۱۰ روز بعد mg/dl	انحراف از معیار در زمان ۱۰ روز بعد	میانگین غلظت در زمان ۲۰ روز بعد mg/dl	انحراف از معیار در زمان ۲۰ روز بعد
۱	-۸	۰.۵	۵۷۴.۷۵	۲۸۰.۳۴	۱۳۹.۲۵	۹۳.۵۶	۴۶.۷۵	۴۲.۰۵
	-۸	۱	۲۷۱.۶۶	۹۱.۵۵	۸۴	۲۲.۳۳	۱۰.۶۶	۷.۳۷۱
	-۸	۱.۵	۵۸۰	۶۸.۲۶	۴۰۳	۱۷.۷	۲۲۷.۲۵	۹۰.۱
۲	۴	۰.۵	۵۷۷.۲۵	۸۸.۲۶	۲۱۹.۲۵	۷۳.۴	۶۲.۲۵	۲۹.۶
	۴	۱	۲۲۹.۵	۴۸.۶۱	۲۲۷	۴۸.۷۱	۱۶۲.۷۵	۱۰۹.۰۳
	۴	۱.۵	۳۷۹	۲۳.۴۹	۱۵۷.۷۵	۹۹.۳۶	۶۱.۷۵	۵۱.۰۷
۳	۲۵	۰.۵	۴۴۰.۷۵	۱۷۲.۲۹	۱۶۰.۷۵	۱۱۶.۹	۲۲	۶.۴۴
	۲۵	۱	۴۳۷	۱۸۷.۱	۱۱۸.۶	۲.۸۲	۱۹	۲
	۲۵	۱.۵	۴۷۹.۲۵	۸۳.۸	۲۰۷.۷۵	۴۸.۹۳	۶۹.۵	۹.۵۱

در دمای ۸- درجه سانتی‌گراد (گروه ۱)، در بین گروه‌های با ماده محافظ ۰/۵ و ۱/۵٪ سدیم فلوراید تفاوت معنی‌دار دارد.($P<0.5$)
در دمای ۸- درجه سانتی‌گراد (گروه ۱)، در بین گروه‌های با ماده محافظ ۱ و ۱/۵٪ سدیم فلوراید تفاوت معنی‌دار دارد.($P<0.5$)
در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد(گروه۳)، در بین گروه‌های با ماده محافظ ۰/۵ و۱/۵٪ سدیم فلوراید تفاوت معنی‌دار وجود دارد($P<0.01$) .
در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد (گروه۳)، در بین گروه‌های با ماده محافظ ۱ و ۱/۵٪ سدیم فلوراید تفاوت معنی‌دار وجود دارد($P<0.01$)

دانسته‌اند (۲۰-۱۷).

در شـرایط نگهداری نمونه در ۴ درجه سانتی‌گراد از دست رفتن الکل از نمونه‌ها پس از ۱۰ و۲۰ روز در حضور ماده نگهدارنده ۱/۵٪ بیشـتر از زمانی بود که ماده نگهدارنده ۰/۵٪ اسـتفاده شده بود. به عبارتی در حضـور ماده نگهدارنده در دمای ۴ درجه سـانتی‌گراد تعداد بیشـتری از نمونه‌هـا از نظر وجود الکل کاهش یافتنـد. بنابراین می‌توان نتیجه گرفـت که در حضور ماده نگهدارنده سـدیم فلوراید در دمای ۴ درجه سـانتی‌گراد تولید اتانول مهار شـده و غلظت اتانول از سـطح پایه نیز کاهش یافته است.

داده‌های به دسـت آمده به تناسـب تعداد گروه‌ها توسط آزمون آنالیز واریانس یک طرفه و پس آزمون LSD برای بررسـی تاثیر زمان و ماده نگهدارنده به صورت همزمان مورد آنالیز قرار گرفتند که در نهایت سـه مورد جلب توجه نمود:

الف: تفاوت در غلظت تمام نمونه‌هایی که حاوی ۰/۵٪ و ۱/۵٪ فلوراید بـه عنوان ماده نگهدارنـده بودند بعد از گذشـت ۱۰ و ۲۰ روز در هر دمایی معنی‌دار بود. بنابراین غلظت‌های مذکور غلظت مناسـب جهت نگهداری نمونه‌های خون نمی‌باشند.

ب: تفاوت در غلظت نمونه‌هایی که حاوی سـدیم فلوراید ۱٪ به عنوان مـاده نگهدارنـده بودند پس از گذشـت ۱۰ و ۲۰ روز پس از نگهداری در دمای ۸- و ۲۵ درجه سـانتیگراد نسبت به غلظت همان نمونه‌ها در زمان صفر معنی‌دار بود ($p<0.05$).

ج: نمونه‌هایی که حاوی سـدیم فلوراید ۱٪ به عنـوان ماده نگهدارنده بودند و در دمای ۴ درجه سـانتیگراد نگهداری شـده بودند تفاوت در میان میانگین غلظت آن‌ها معنی‌دار نبود ($p>0.05$).

برای مقایسه تاثیر ۳ حالت نگهداری (زمان صفر، ۱۰ روز بعد و ۲۰ روز بعـد) و تأثیر دما به طور همزمان بـر روی غلظت الکل از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه و پس آزمون SNK صورت پذیرفت. با توجه به این آزمون در زمان صفر اختلاف معنی داری در بین گروه‌ها وجود ندارد.

در زمان ۱۰ روز پس از نمونه‌گیری، در دمای ۸- درجه سـانتیگراد، در بین گروه‌های با ماده محافظ ۰/۵ و ۱/۵٪ سـدیم فلوراید تفاوت معنی دار دارد($P<0.5$) و در بین گروه‌های با ماده محافظ ۱ و ۱/۵٪ سـدیم فلوراید نیز تفـاوت معنـی دار دارد($P<0.5$) . در دمای ۴ درجه و ۲۵ درجـه هیچ گونـه تفاوت معنی‌داری بین میزان الـکل در گروه های با غلظت متفاوت ماده محافظ دیده نشد.

در زمان ۱۰ روز پس از نمونه‌گیری، در دمای ۴ درجه هیچ گونه تفاوت معنی‌داری بین میزان الکل در گروه‌های با غلظت متفاوت ماده محافظ دیده نمی‌شود. در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، در بین گروه‌های با ماده محافظ ۰/۵ و۱/۵٪ سدیم فلوراید تفاوت معنی‌دار وجود دارد($P<0.01$)

[Downloaded from sjfm.ir on 2024-07-17]

و در بین گروه‌های با ماده محافظ ۱ و ۱/۵٪ سدیم فلوراید نیز تفاوت معنی‌دار وجود دارد (P<0.01).
آنالیز Repeated Measure با کنترل متغیرهای مقدار ماده نگهدارنده و دمای نگهداری برروی داده‌ها صورت پذیرفت.

نتایج در شرایط نگهداری در ۸- درجه سانتی‌گراد و ماده نگهدارنده سدیم فلوراید ۱٪ به شرح ذیل می‌باشد:
آزمون Mauchly نشان داد پیش فرض Sphericity برقرار نمی‌باشد (Pvalue =۰/۰۰۰ ،X^2(۵) =۴۸/۴۶). لذا درجه آزادی با استفاده از ضریب برآوردگر اپسیلون (∑=۰/۸۰) Greenhouse - Geisser تعیین گردید. نتایج نشان داد که اثر زمان معنی‌دار می‌باشد (Pvalue =۰/۰۰۰). یعنی بین غلظت الکل در ۳ دوره زمانی اندازه‌گیری شده تفاوت معنی‌داری وجود دارد لیکن بررسی trend نشان داد که تغییرات غلظت الکل هم از trend درجه ۲ تبعیت می‌کند.
نتایج در شرایط نگهداری در ۴ درجه سانتی‌گراد و ماده نگهدارنده سدیم فلوراید ۱٪ به شرح ذیل می باشد:
آنالیز نشان داد که نتایج تفاوت چندانی با هم ندارند و اختلاف آن‌ها معنی‌دار نمی‌باشد (Pvalue =۰/۰۶۵). البته Power مطالعه برای این بررسی کافی نیست ولی اثر زمان همچنان معنی‌دار می‌باشد و غلظت الکل در زمان‌های مختلف متفاوت است.
نتایج بررسی در شرایط نگهداری در ۲۵ درجه سانتی‌گراد همراه با افزودن ماده نگهدارنده سدیم فلوراید ۱٪ به شرح ذیل می‌باشد:
آزمون Mauchly نشان داد پیش فرض Sphericity برقرار نمی‌باشد (Pvalue=۰/۰۰۰ و۱۷۳= X^2(۵)). لذا درجه آزادی با استفاده از ضریب برآوردگراپسیلون (∑=۰/۵۵۳) Greenhouse – Geisser تعیین گردید. نتایج نشان داد که اثر زمان معنی‌دار می‌باشد (Pvalue =۰/۰۳۴). یعنی بین غلظت الکل در ۴ دوره زمانی مورد بررسی تفاوت معنی‌داری وجود دارد.

همان‌طور که از نتایج تحقیق حاصل به دست می‌آید، دما، زمان و استفاده از ماده محافظ سدیم فلوراید نقش مهمی در تولید و یا از دست رفتن اتانول از خون بازی می‌کنند.
نتایج حاصل از تحقیق حاضر نشان داد که قرار دادن نمونه‌های خون در هر دمایی، همراه با غلظت‌های متفاوت ماده محافظ سدیم فلوراید موجب کاهش غلظت الکل اتیلیک به صورت معنی دار (Pvalue < 0/05) می‌گردد. تنها در مورد نگه‌داری نمونه‌ها به مدت ۲۰ روز در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به همراه ماده محافظ ۱٪ افزایش یا کاهش غلظت الکل اتیلیک معنی‌دار نبود (Pvalue < 0/744).

نتیجه‌گیری

دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و غلظت سدیم فلوراید ۱٪ به عنوان شرایط مناسب جهت نگهداری نمونه‌های خون جهت آنالیز الکل می‌باشد بنابراین اتانول در غلظت سدیم فلوراید ۱٪ به عنوان ماده نگهدارنده که در دمای ۴ درجه نگهداری شده است پایدارترین حالت را در مقایسه با مواردی که در دمای ۸- درجه و دمای اتاق می‌باشد، دارد.

تشکر و قدردانی:
این پژوهش در قالب طرح تحقیقاتی و پایان نامه کارشناسی ارشد سم شناسی دانشگاه علوم پزشکی شیراز انجام پذیرفته است. بدین وسیله از مساعدت معاونت‌های آموزشی و پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شیراز، دکتر آریا حجازی، مدیر کل وقت پزشکی قانونی استان فارس، خانم دکتر مریم حسینی، سرپرست وقت آزمایشگاه پزشکی قانونی استان فارس، خانم دکتر مریم اخگری ریاست محترم بخش سم شناسی، خانم دکتر الهام بزمی و تمامی پرسنل بخش سم شناسی مرکز تشخیصی و آزمایشگاهی پزشکی قانونی استان تهران کمال تقدیر و تشکر به عمل می‌آید.

References

1- Clark, M. A. and J. W. Jones (1982). "Studies on putrefactive ethanol production. I: Lack of spontaneous ethanol production in intact human bodies." J Forensic Sci 27(2): 366-371.
2- Vasiliades, J. and K. Ford "Stability of ethanol in blood and urine. Toxicology and Clin Chem Labs." Inc., Omaha, NE 68132, USA.
3- Brown, G. A., D. Neylan, et al. (1973). "The stability of ethanol in stored blood. I. Important variables and interpretation of results." Anal Chim Acta 66(2): 271-283.
4- Lewis, R. J., R. D. Johnson, et al. (2004). "Ethanol formation in unadulterated postmortem tissues." Forensic Sci Int 146(1): 17-24.
5- Blackmore, D. J. (1968). "The bacterial production of ethyl alcohol." J Forensic Sci Soc 8(2): 73-78.
6- Chiarotti.M and Giovanni. N (1982). "Acetaldehyde accumulation during headspace

[Downloaded from sjfm.ir on 2024-07-17]

gas chromatographic determination of ethanol. ." Forensic Sci 20: 21-25.

7- Kristoffersen, L., L. E. Stormyhr, et al. (2006). "Headspace gas chromatographic determination of ethanol: the use of factorial design to study effects of blood storage and headspace conditions on ethanol stability and acetaldehyde formation in whole blood and plasma." Forensic Sci Int 161(2-3): 151-157.

8- Butzbach, D. M. (2010). "The influence of putrefaction and sample storage on post-mortem toxicology results." Forensic Sci Med Pathol 6(1): 35-45.

9- Takayasu, T., T. Ohshima, et al. (1995). "Postmortem degradation of administered ethanol-d6 and production of endogenous ethanol: experimental studies using rats and rabbits." Forensic Sci Int 76(2): 129-140.

10- Olszowy Z, Nowicka J, Grabowska T.(2006). "Study in the stability of the ethanol level in vitreous humor". Problems of Forensic Sciences, LXVI, 154–158.

11- Amick, G. D. and K. H. Habben (1997). "Inhibition of ethanol production by Saccharomyces cerevisiae in human blood by sodium fluoride." J Forensic Sci 42(4): 690-692.

12- Winek T, Winek CL, Wahba WW.(1996). "The effect of storage at various temperatures on blood alcohol concentration." Forensic Sci 78: 179-185.

13- Bogusz, M., M. Guminska, et al. (1970). "Studies on the formation of endogenous ethanol in blood putrefying in vitro." J Forensic Med 17(4): 156-168.

14- Petkovic, S. M., M. A. Simic, et al. (2005). "Postmortem production of ethanol in different tissues under controlled experimental conditions." J Forensic Sci 50(1): 204-208.

15- Ferrari, L. A., J. M. Triszcz, et al. (2006). "Kinetics of ethanol degradation in forensic blood samples." Forensic Sci Int 161(2-3): 144-150.

16- Kalliroe Ziavrou, Vassiliki A Boumba, TheodoreG Vougiouklakis.). "Insights into the origin of postmortem ethanol." International journal of toxicology 24: 69-77.

17- Kugelberg, F. C. and A. W. Jones (2007). "Interpreting results of ethanol analysis in postmortem specimens: a review of the literature." Forensic Sci Int 165(1): 10-29.

18- Holmgren, P., H. Druid, et al. (2004). "Stability of drugs in stored postmortem femoral blood and vitreous humor." J Forensic Sci 49(4): 820-825.

19- Olsen, T. and W. L. Hearn (2003). "Stability of ethanol in postmortem blood and vitreous humor in long-term refrigerated storage." J Anal Toxicol 27(7): 517-519.

20- De Lima IV, Midio AF.(1999)." Origin of blood ethanol in decomposed bodies." Forensic Science International 106(3): 157-62.

[Downloaded from sjfm.ir on 2024-07-17]

Effect of Temperature, Time and Sodium Fluoride Concentration on the Stability of Ethanol in Blood Samples from Male Wistar Rats

Ahmad Reza Heidari*† - Mohammad Javad Khoshnood**

*MSc in Toxicology, Member of Legal Medicine Research Center, Tehran, Iran

** MD, Specialist in Pharmacology and Toxicology, Associate Professor of Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran

Abstract

Background: *Assessment of alcohol abuse is included a large volume of references to the toxicology laboratory. Detection and interpretation of ethanol in blood samples are essential issues in forensic cases, they are important goals for courts. There are numerous biochemical and biological processes which may have significant influence on ethanol concentrations, conditions of the samples (out of the fridge and passed the test of time, temperature and amount of preservative) are effective factors on ethanol concentration. This study was designed to investigate the effects of temperature, time, and sodium fluoride (as a preservative) simultaneously over.*

Methods: *In this experimental study, 36 male Wistar rats were divided into three groups of twelve. Three hours before sampling, rates were fed orally with 3 ml of ethanol (diluted with distilled water to one-third). To investigate the effect of sodium fluoride (concentration of 1%, 0.5%, 1.5% w - v), temperature (- 8, 4 and 25° C) and time (zero, 10 and 20 days after sampling). Blood samples were taken from each group. And ethanol were measured with gas chromatography. In order to evaluate the results, the one-way ANOVA test followed by LSD and SNK tests were used to compare groups. And Repeated measure of general liner model was used to detect differences in concentration among different periods.*

Findings: *The results showed that at temperatures of -8 and 25° C with protective substances 1 % by weight - volume after the elapse of time, 10 and 20 days, reducing the ethanol concentration is seen. Increase or decrease of ethanol concentration at 4° C with sodium fluoride, 1% after 20 days was not significant. Decrease of ethanol concentration in samples with less protective was more.*

Conclusion: *To evaluate the concentration of ethanol, it is better to store samples of blood and samples at 4° C and sodium fluoride 1%w - v.*

Keywords: *Ethanol, Headspace, Gas Chromatography, Sodium Fluoride, Temperature*

Received: 13 oct 2013 *Accepted: 12 jan 2014*

†Correspondence: Shahr-e-Kord, Legal Medicine Center, Shahr-e-Kord, Iran. Tel: +98(381)3338800-2

Email: arheidari 88@yahoo.com

[Downloaded from sjfm.ir on 2024-07-17]