

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

ประชากรและกลุ่มตัวอย่าง

การศึกษานี้ได้ทำการเก็บตัวอย่างเลือด ปัสสาวะ เศษอาหารในกระเพาะอาหาร และเศษอาหารจากลำไส้เล็กส่วนต้น จากศพที่เข้ามาชันสูตร ณ ภาควิชานิติเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัย เชียงใหม่ แพทย์ชันสูตรว่าตายมีปรากฏเหตุและมีประวัติการได้รับสารพิษหรือยา จำนวนทั้งสิ้น 30 ราย โดยอ้างอิงข้อมูลจากข้อมูลทางสถิติของการเก็บตัวอย่างเพื่อส่งตรวจทางพิษวิทยาตั้งแต่ปี 2554-2555 ในการชันสูตรศพ ภายใน 1 เดือน มีจำนวนศพที่ถูกชันสูตรทั้งหมด ประมาณ 70 ราย ซึ่งเป็นรายกรณีที่เกี่ยวข้องกับแอลกอฮอล์ประมาณ 21 ราย เป็นรายกรณีทางพิษวิทยาประมาณ 30 ราย ดังนั้นจึงเลือกจำนวนในการเก็บตัวอย่างจำนวน 30 ราย ที่เป็นกรณีทางพิษวิทยามาทำการศึกษา

สถานที่ที่ใช้ในการดำเนินการวิจัยและรวบรวมข้อมูล

ห้องปฏิบัติการพิษวิทยา ภาควิชานิติเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

วัสดุและอุปกรณ์ในการทดลอง

1. หลอดทดลองฝาเกลียว ขนาด 20 ml
2. หลอดทดลองขนาดเล็ก ขนาด 13x100 mm
3. หลอดฉีดขนาดเล็ก
4. Microcentrifuge tube ขนาด 0.5 ml
5. Micropipette
6. Micro tips
7. Beaker
8. Measuring pipette ขนาด 5 ml
9. เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge)
10. เครื่องเขย่าวน (Vortex)
11. เครื่องเขย่า (Shaker)
12. นาฬิกาจับเวลา
13. ถุงมือ
14. หัวกรองสาร

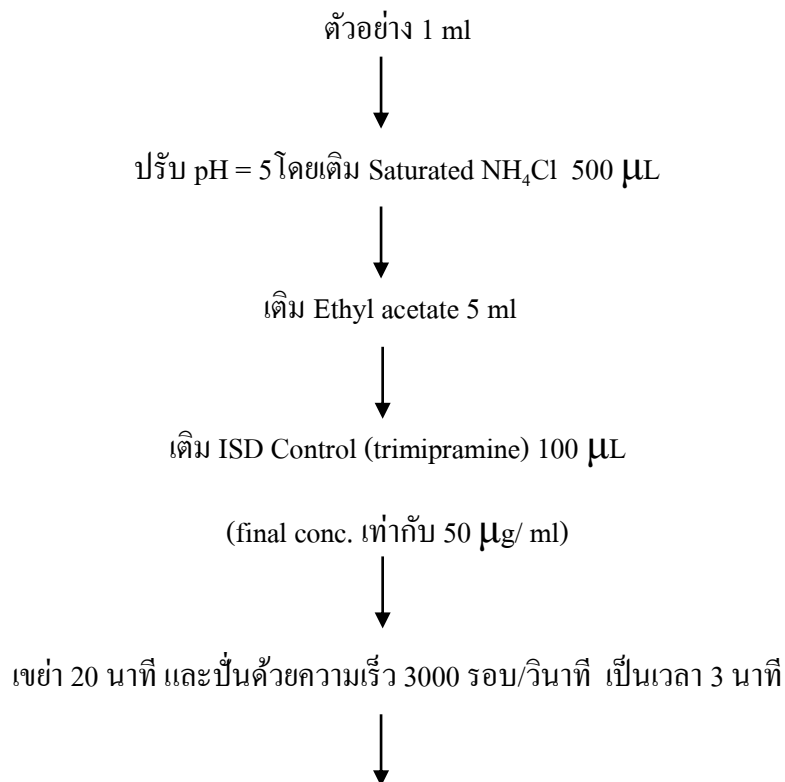
สารเคมีในการทดลอง

1. น้ำกลั่น
2. NH_4Cl
3. Ethyl acetate (RCI Labscan, HPLC Grade)
4. Trimipramine
5. Buffer A
6. Buffer B
7. Sodium Borate
8. 1-Chlorobutane
9. ตัวอย่างชีวภาพจากศพ ได้แก่ เลือด ปัสสาวะ เศษอาหารในกระเพาะอาหาร เศษอาหารในลำไส้เล็กส่วนต้น

วิธีการทดลอง

- 1) นำตัวอย่างเลือด ปัสสาวะ เศษอาหารในกระเพาะอาหาร เศษอาหารในลำไส้เล็กส่วนต้นที่เก็บจากศพมาสกัดด้วยวิธีกรดและเบสเช่นเดียวกัน ตามวิธีของ Gloria^[15] ดังนี้

1.1) การสกัดตัวอย่างด้วยกรด



ทำการแยกส่วนใส Supernatant ใส่หลอดใหม่เพื่อทำการระเหยแห้งด้วยแก๊สไนโตรเจน



ละลายคราบด้วย Buffer A:B (9:1) 200 μ L

(Buffer A : 5mM Ammoniumformate หรือ 0.01% Formic in water, Buffer B : 0.01% Formic in Acetonitrile)

1.2) การสกัดตัวอย่างด้วยเบส

ตัวอย่าง 1 ml



ปรับ pH = 11 โดยเติม Saturated Sodium Borate 500 μ L



เติม 1-Chlorobutane 5 ml



เติม ISD Control (trimipramine) 100 μ L

(final conc. เท่ากับ 50 μ g/ ml)



เขย่า 20 นาที และปั่นด้วยความเร็ว 3000 รอบ/วินาที เป็นเวลา 3 นาที



ทำการแยกส่วนใส Supernatant ใส่หลอดใหม่เพื่อทำการระเหยแห้งด้วยแก๊สไนโตรเจน



ละลายคราบด้วย Buffer A:B (9:1) 200 μ L

(Buffer A : 5mM Ammoniumformate หรือ 0.01% Formic in water, Buffer B : 0.01% Formic in Acetonitrile)

- 2) นำตัวอย่างที่สกัดฉีดเข้าเครื่อง LC-MS (Agilent Technologies 1290 infinity LC ใช้คู่กับ 6460 Triple Quadrupole LC/MS, Column : Eclipse plus C18, 2.1mm.x100mm., Mobile phase A : 5mM Ammoniumformate/0.01% Formic in water, Mobile phase B : 0.01% Formic in Acetonitrile, Flow rate 0.3 mL/min, Injection 5 μ L) เพื่อวิเคราะห์หาสารหรือกลุ่มยาที่พบในตัวอย่าง
- 3) เปรียบเทียบผลการตรวจเศษอาหารในลำไส้เล็กส่วนต้นกับตัวอย่างเลือด ปัสสาวะ และเศษอาหารในกระเพาะอาหารที่เก็บมาพร้อมกันในแต่ละราย เพื่อแสดงถึงการตรวจพบสารหรือยาในลำไส้เล็กส่วนต้น

การวิเคราะห์ข้อมูล

นำผลการตรวจที่ได้ตามตารางในบทที่ 4 ทั้งหมดไปหาค่าความไว (sensitivity) ความจำเพาะ (specificity) และความแม่นยำ (accuracy) และวิเคราะห์ผลทางสถิติ โดยใช้ไคสแควร์ (Chi-square test) เพื่อหาความสัมพันธ์ตามสมมติฐาน

สรุปผลการศึกษา

ผู้ศึกษาสรุปผลการศึกษา และการวิเคราะห์ผลทางสถิติ ดังรายละเอียดในบทที่ 5