บทที่ 3

วัสดุและวิธีการดำเนินการวิจัย

1. ประชากร

เกณฑ์การคัดเลือกตัวอย่าง

1.1 เป็นศพคนไทย

1.2 มีอายุในช่วง 15-60 ปี

1.3 เป็นศพที่เสียชีวิตเนื่องจากอุบัติเหตุจราจรทางบกและไม่ผ่านการรักษามาก่อน

1.4 ระยะเวลานับจากเสียชีวิตจนถึงเก็บตัวอย่างชีววัตถุ ไม่เกิน 24 ชั่วโมง

1.5 ระดับของการเน่าเปื่อย (degree of decomposition) อยู่ในระดับไม่เกิน 3

หมายเหตุ ระดับการเน่าเปื่อยพิจารณาจากสภาพการแข็งตัวของกล้ามเนื้อทั้งร่างกาย โดยระดับ 1= สภาพศพยังไม่แข็งตัว 2=แข็งตัวบางส่วน 3=แข็งตัวเต็มที่ 4=เริ่มเน่า 5=เน่าเต็มที่ [57]

2. สารเคมีและวัสดุ

2.1 สารเคมี

1. standard ethanol solutions set (Sigma Diagnostics Inc.)
   ความเข้มข้น 50, 100 และ 300 มิลลิกรัมเปอร์เซ็นต์
2. isopropanol (MERCK) เตรียมเป็นสารละลายความเข้มข้น 195 มิลลิกรัมเปอร์เซ็นต์ ใช้เป็นสารละลายมาตรฐานภายใน(internal standard solution)
3. ethanol absoluted (MERCK) เตรียมเป็นสารละลายความเข้มข้น 79 มิลลิกรัมเปอร์เซ็นต์ ใช้เป็นสารละลายควบคุม (quality control solution) และความเข้มข้น 158 มิลลิกรัมเปอร์เซ็นต์ เป็นสารละลายมาตรฐาน (standard solution)
4. sodium chloride (Sigma Chemical Co.)
5. sodium fluoride (Sigma Chemical Co.)
6. potassium oxalate (Sigma Chemical Co.)

2.2 วัสดุ

1. ขวดแก้ว (vial) ขนาด 22 มิลลิลิตร พร้อมจุกยางและฝาครอบอลูมิเนียม
2. เครื่องบีบฝาครอบอลูมิเนียม (crimpper)
3. กระบอกฉีดยาขนาด 20 มิลลิลิตร
4. เข็มฉีดยาเบอร์ 20 G x1" (0.9 x 25 มิลลิเมตร)
5. หลอดแก้วสำหรับบรรจุตัวอย่างชีววัตถุและจุกยาง

3. เครื่องมือ

3.1 เครื่องแก๊ส โครมาโตกราฟี (gas chromatography; PU 4500, Pye Unicam) ซึ่งมีเครื่องตรวจวัดชนิด flame ionization detector และเครื่องประมวลผล (intregrator; C-R6A, Shimadzu)

3.2 เครื่องฉีดสารระเหยอัตโนมัติ (Automatic headspace injector; HSS 86.50, DANI)

3.3 ปิเปตแบบอัตโนมัติ (automatic pipet) ขนาด 200 ไมโครลิตร

รูปที่ 12 แสดงส่วนประกอบของเครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

ก. เครื่องแก๊ส โครมาโตกราฟีต่อกับเครื่องฉีดสารระเหยอัตโนมัติ เครื่องตรวจวัดและเครื่องประมวลผล

ข. เครื่องฉีดสารระเหยอัตโนมัติ

ค. เครื่องแก๊ส โครมาโตกราฟี

ง. เครื่องประมวลผล

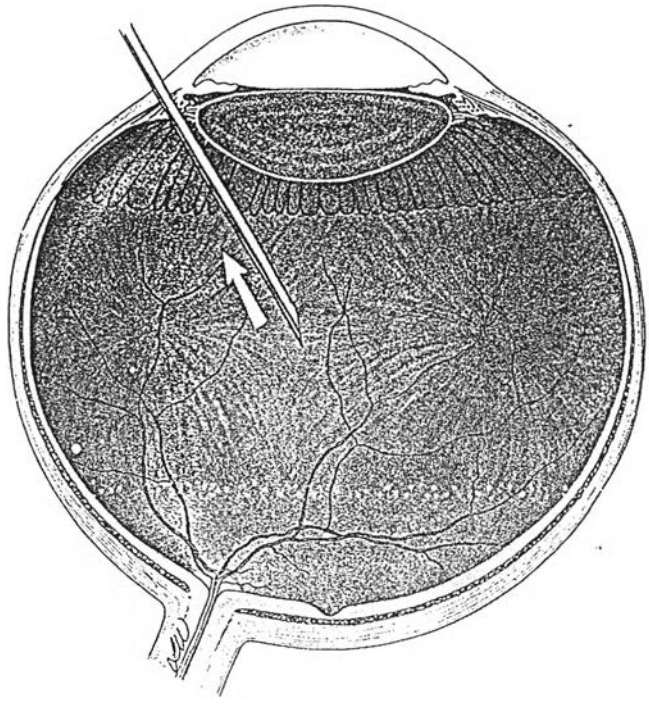
4. วิธีการดำเนินการวิจัย

4.1 เก็บตัวอย่างชีววัตถุและบันทึกข้อมูลประวัติศพ

4.1.1 การเก็บตัวอย่างชีววัตถุ

1. **ตัวอย่างเลือด** เก็บจากเส้นเลือดดำที่คอ (jugular vein) โดยใช้กระบอกฉีดยาขนาด 20 มิลลิลิตร พร้อมเข็มฉีดยาเบอร์ 20 G x 1" เจาะเก็บเลือด 10 มิลลิลิตร ถ่ายใส่หลอดแก้วที่บรรจุสารผสมระหว่างโซเดียม ฟลูออไรด์และโพแทสเซียม ออกซาเลตในอัตราส่วน 1 : 1 จำนวน 1 กรัม ปิดจุกให้สนิทแล้วผสมให้เข้ากัน นำไปเก็บในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 °C จนถึงเวลาวิเคราะห์

2. **ตัวอย่างวุ้นลูกนัยน์ตา** เก็บตัวอย่างโดยใช้ กระบอกฉีดยาขนาด 20 มิลลิลิตร พร้อมเข็มฉีดยาเบอร์ 20 G x 1" เจาะเข้าบริเวณตาขาว โดยแทงเข็มทแยงทำมุม 45 องศากับแนวราบ ที่ตำแหน่ง 10 นาฬิกา หรือ 2 นาฬิกา (รูปที่ 14) ดูดของเหลวใสออกมาประมาณ 2.5 มิลลิลิตร ถ่ายใส่หลอดแก้วที่มี สารผสมระหว่างโซเดียม ฟลูออไรด์และโพแทสเซียม ออกซาเลตในอัตราส่วน 1 : 1 จำนวน 0.2 กรัม ปิดจุกให้สนิทผสมให้เข้ากันเก็บในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 °C จนถึงเวลาวิเคราะห์ หลังจากนั้นทำการตกแต่งลูกนัยน์ตาโดยการฉีดน้ำเข้าแทนที่ เพื่อให้ลูกนัยน์ตากลับสู่สภาพเดิม



รูปที่ 13 แสดงวิธีการเก็บตัวอย่างวุ้นลูกนัยน์ตา

4.1.2 บันทึกข้อมูลประวัติศพ

บันทึกประวัติชื่อ เพศ อายุ วันและเวลาเกิดเหตุ วันและเวลาที่เก็บตัวอย่างชีววัตถุ สาเหตุการตาย ผ่านการรักษามาก่อนหรือไม่ ระดับของการเน่าเปื่อย

4.2 ทดสอบความเป็นเส้นตรง (linearity) ความแม่นยำ (precision)และความถูกต้อง (accuracy) ของวิธีการวิเคราะห์ความเข้มข้นแอลกอฮอล์

1. ทดสอบความเป็นเส้นตรงระหว่างอัตราส่วนของพื้นที่ใต้พีคของสารละลายมาตรฐานต่อพื้นที่ใต้พีคของสารละลายมาตรฐานภายในและความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน ความเข้มข้นต่าง ๆ

2. ทดสอบความแม่นยำของวิธีการวิเคราะห์ โดยทำการทดสอบความแม่นยำทั้งแบบ within run และ between run

3. ทดสอบความถูกต้องของวิธีการวิเคราะห์

4.3 วิเคราะห์ความเข้มข้นแอลกอฮอล์ในตัวอย่างชีววัตถุ

วิเคราะห์ความเข้มข้นแอลกอฮอล์ด้วยเครื่องแก๊ส โครมาโตกราฟี ต่อกับเครื่องฉีดสารระเหยอัตโนมัติ เตรียมตัวอย่างเพื่อการวิเคราะห์โดยใช้วิธีเทคนิคเฮดสเปซ ซึ่งดัดแปลงจากวิธีของ Winek *et al.* (1981)[9] ดังนี้

4.3.1 เติมสารลงในขวดแก้วขนาด 22 มิลลิลิตร ตามลำดับก่อน-หลัง ดังต่อไปนี้

4.3.1.1 สารละลายมาตรฐานภายใน	200 ไมโครลิตร
4.3.1.2 deionized water	200 ไมโครลิตร
4.3.1.3 สารละลายมาตรฐาน/สารละลายควบคุม/ชีววัตถุ	200 ไมโครลิตร
4.3.1.4 โซเดียม คลอไรด์	1 กรัม

ปิดจุกยางและฝาอลูมิเนียมแล้วบีบให้แน่นด้วยเครื่องบีบฝาครอบอลูมิเนียม ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาอย่างน้อย 15 นาที

4.3.2 นำขวดแก้วที่เตรียมเสร็จแล้วในข้อ 4.3.1 ใส่เครื่องฉีดสารระเหยอัตโนมัติ ตั้งโปรแกรมฉีดอัตโนมัติ ที่อุณหภูมิ 50 °C และตั้งเวลาให้ขวดแก้วอุ่นอยู่ในเครื่อง 17 นาที ก่อนเริ่มฉีด

4.3.3บันทึกค่าพื้นที่ใต้พีคของสารละลายมาตรฐาน/สารละลายควบคุม/ชีววัตถุ และพื้นที่ใต้พีคของสารละลายมาตรฐานภายในนำมาใช้ในการคำนวณ

4.3.4 การคำนวณ โดยคำนวณค่า K เฉลี่ย

ดำเนินการวิเคราะห์ตามวิธีในข้อ 4.3.1 ถึงข้อ 4.3.3 โดยในข้อ 4.3.1.3 ให้เติมสารละลายมาตรฐานลงในขวดแก้ว เตรียมทั้งหมด 5 ขวด นำค่าพื้นที่ใต้พีคของสารละลายมาตรฐาน และสารละลายมาตรฐานภายในที่ได้มาคำนวณค่า K ดังต่อไปนี้

$$K = \text{ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน} \times \frac{\text{พื้นที่ใต้พีคของสารละลายมาตรฐานภายใน}}{\text{พื้นที่ใต้พีคของสารละลายมาตรฐาน}}$$

นำค่า K ทั้ง 5 มาหาค่าเฉลี่ย

4.3.5 ทดสอบค่า K เฉลี่ย โดยการใช้สารละลายควบคุม (Q)

ดำเนินการวิเคราะห์ตามวิธีในข้อ 4.3.1 ถึงข้อ 4.3.3 โดยในข้อ 4.3.1.3 ให้เติมสารละลายควบคุมลงในขวดแก้ว เตรียมทั้งหมด 3 ขวด นำค่าพื้นที่ใต้พีคของสารละลายควบคุม และสารละลายมาตรฐานภายในที่ได้มาคำนวณค่า Q ดังต่อไปนี้

$$Q\ (\text{มิลลิกรัมเปอร์เซ็นต์}) = K\ \text{เฉลี่ย} \times \frac{\text{พื้นที่ใต้พีคของสารละลายควบคุม}}{\text{พื้นที่ใต้พีคของสารละลายมาตรฐานภายใน}}$$

ค่า K เฉลี่ยที่จะนำมาใช้ในการคำนวณความเข้มข้นแอลกอฮอล์ในชีววัตถุ ควรจะทำให้ค่าQ ที่คำนวณได้มีค่าความเข้มข้นแอลกอฮอล์ไม่เกินกว่า/น้อยกว่า ค่าความเข้มข้นแอลกอฮอล์ที่มีอยู่จริง มากกว่า 3 มิลลิกรัมเปอร์เซ็นต์

4.3.6 คำนวณความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ในชีววัตถุ

ดำเนินการวิเคราะห์ตามวิธีในข้อ 4.3.1 ถึงข้อ 4.3.3 โดยในข้อ 4.3.1.3 ให้เติมชีววัตถุลงในขวดแก้ว เตรียมทั้งหมด 2 ขวด นำค่าพื้นที่ใต้พีคของชีววัตถุและของสารละลายมาตรฐานภายในที่ได้มาคำนวณค่าความเข้มข้นแอลกอฮอล์ในชีววัตถุดังนี้

$$\text{ความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ในชีววัตถุ (มิลลิกรัมเปอร์เซ็นต์)} = K\ \text{เฉลี่ย} \times \frac{\text{พื้นที่ใต้พีคของชีววัตถุ}}{\text{พื้นที่ใต้พีคของสารละลายมาตรฐานภายใน}}$$

นำค่าความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ในชีววัตถุที่คำนวณได้ มาคำนวณค่าเฉลี่ย

4.4 การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ข้อมูลของการทดสอบวิธีการวิเคราะห์ความเข้มข้นแอลกอฮอล์ แบบเชิงพรรณนาในรูปของค่าเฉลี่ย (mean) ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation) ร้อยละของสัมประสิทธิ์แห่งการกระจาย (% coefficient of variation, % C.V.) ร้อยละการวิเคราะห์กลับคืน (% recovery)

วิเคราะห์ข้อมูลการทดสอบความเป็นเส้นตรงของวิธีการวิเคราะห์และวิเคราะห์ข้อมูลความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นแอลกอฮอล์ในเลือดและในวุ้นลูกนัยน์ตา โดยใช้สถิติเชิงอนุมาน หาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient, r) และวิเคราะห์การถดถอยเชิงเส้นตรง (linear regression analysis) ในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ในเลือดกับในวุ้นลูกนัยน์ตา ได้แบ่งข้อมูลเป็น 2 ชุด โดยชุดที่หนึ่ง เก็บตัวอย่างชีววัตถุระหว่างเดือนพฤษภาคม พ.ศ. 2542 ถึงเดือนกันยายน พ.ศ.2542 จำนวน 110 ราย นำมาใช้ในการหาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์และสมการถดถอยเชิงเส้นตรง (linear regression equation) ส่วนข้อมูลชุดที่สองเก็บตัวอย่างตั้งแต่เดือนกันยายน พ.ศ. 2542 ถึงเดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2542 จำนวน 84 ราย นำข้อมูลมาใช้ทดสอบสมการถดถอยที่ได้จากข้อมูลชุดที่หนึ่ง