

บทที่ 2

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการวิจัย

2.1 วัสดุอุปกรณ์

- 1) Gas Chromatograph, 6890N Series GC system (Agilent Technologies, U.S.A)
 - a) GC capillary-column, HP - 5MS (30 m x 0.25 mm x 0.25 μ m) (J & W Scientific)
- 2) Mass spectrometer, 5973 inert Mass Selective Detector Series MS systems (Agilent Technologies, U.S.A)
 - a) Vacuum Turbo pumps
 - b) Electron ionization (EI) mode
 - c) Quadrupole mass analyzer
- 3) หลอดเจาะเลือดที่มีโซเดียมฟลูออไรด์ผสมกับสารโพแทสเซียมออกซาเลท (BD, U.S.A)
- 4) เครื่องปั่นความเร็วสูง (Jouan A14, Italy)
- 5) เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (pH meter, Oaklon, U.S.A)
- 6) เครื่องชั่งสาร (Adventurer, Ohaus, U.S.A)
- 7) เครื่องชั่งสารอย่างละเอียด (Mettler Toledo, Switzerland)
- 8) เครื่องผสมสาร (Vortex, Thermolyne, U.S.A)
- 9) ตู้อบ (Mettler, Germany)
- 10) หลอดแก้วขนาด 25x150 มิลลิลิตร (Pyrex, U.S.A)
- 11) บล็อกให้ความร้อน (Heat block, Pierce, U.S.A)
- 12) Microsyringe ขนาด 10 ไมโครลิตร (Gerstel, Australia)
- 13) เครื่องระเหยสาร (Evaporation Unit, Pierce, U.S.A)
- 14) Reacti-THERM (Heating Module, Pierce, U.S.A)
- 15) SPE Vacuum Manifold System (Agilent Technologies, U.S.A)
- 16) Solid phase extraction ขนาด 3 ml (Mixed mode phase200 mg, Vertical, Thailand)

- 17) เครื่องปั๊มสำหรับเครื่อง SPE (Pump, VCP 81010 SPARMAX)
- 18) Crimper, 20 mm cap (Supelco, U.S.A)
- 19) Crimper, 11 mm cap (Supelco, U.S.A)
- 20) Decrimper, 11 mm cap (Supelco, U.S.A)
- 21) 10 ml Vial, 18 mm screw top (Gertsel, Germany)
- 22) 2 ml Vial, 11 mm crimp top (Gertsel, Germany)
- 23) Screw caps with septa for 18 mm vials, magnetic, septum silicone blue transparent/
PTFE white (Gertsel, Germany)
- 24) Crimp caps for 11 mm vials, red silicone rubber/PTFE septa (La-Pha-Pack,
Germany)
- 25) Positive displacement pipette (Gilson SAS, France)
- 26) Capillaries and piston (Gilson SAS, France)

2.2 สารเคมี

- 1) Acetone, AR grade (B.D.H., UK)
- 2) Helium gas, 99.999% UHP grade (TIG, Thailand)
- 3) Nitrogen gas, 99.99% HP grade (TIG, Thailand)
- 4) N-methyl-N-(trimethylsilyl) trifluoroacetamide with 1% trimethylchlorosilane,
GC grad (Sigma-Aldrich, Switzerland)
- 5) Di-Sodium hydrogen orthophosphate, AR grade (Ajax Finechem, Australia)
- 6) Methanol, AR grade (Fisher Scientific, UK)
- 7) Hydrochloric acid, AR grade (Merck, Germany)
- 8) 2-Propanol, AR grade (Fisher Scientific, UK)
- 9) Dichloromethane, AR grade (Fisher Scientific, UK)
- 10) Ammonium Formate, AR grade (Merck, Germany)
- 11) 6-MAM.HCl, Lipomed Purity 99.08% (Arlesheim, Switzerland)
- 12) Morphine.HCl, Lipomed Purity 98.90% (Arlesheim, Switzerland)
- 13) Morphine-d₃.HCl, Lipomed Purity 98.28% (Arlesheim, Switzerland)

2.3 วิธีการเตรียมสารละลายมาตรฐาน

2.3.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน stock standard solution

ทำการเตรียมสารละลายมาตรฐานของ 6-MAM มอร์ฟีน และ MOR-d₃ ให้มีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยเตรียมสารมาตรฐาน 6-MAM.HCl (Lipomed, Purity 99.08%) morphine.HCl (Lipomed, Purity 98.90%) และ MOR-d₃.HCl (Lipomed, Purity 98.28%) ละลายในเมทานอลให้มีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วทำการเก็บไว้ที่อุณหภูมิ-20 องศาเซลเซียส

2.3.2 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน working standard solution

เตรียมโดยเจือจาง stock standard solution ของ 6-MAM มอร์ฟีน และ MOR-d₃ ให้มีความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรโดยละลายในเมทานอล จากนั้นนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ-20 องศาเซลเซียส

2.4 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรเมตรี (GC/MS) เพื่อตรวจวัดระดับความเข้มข้นของ 6-MAM และมอร์ฟีนในเส้นผมและเลือด

ทำการทดสอบหาสภาวะ GC/MS ที่เหมาะสมในการตรวจวัดหาระดับความเข้มข้นของ 6-MAM และมอร์ฟีน ในเส้นผมและเลือดโดยประยุกต์จากวิธีของ Lewis RJ. et al. [68] ซึ่งมีค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ดังนี้

- 1) คอลัมน์ที่ใช้ คือ HP-5MS ; 30 m x 0.25 mm x 0.25 μ m
- 2) เครื่องวิเคราะห์มวลคือ Quadrupole mass spectrometer
- 3) อัตราการเคลื่อนที่ของแก๊ส (flow rate) คือ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที
- 4) แหล่งผลิตไอออน คือ Electron impact (EI)
- 5) อุณหภูมิของ ion source ตั้งไว้ที่ 230 องศาเซลเซียส
- 6) interface ตั้งไว้ที่ 280 องศาเซลเซียส

7) ส่วนให้ความร้อน (oven) ได้ทำตามวิธีของ Lewis RJ. et al. [68] โดยทำการปรับปรุงรายละเอียดเล็กน้อยและตั้งโปรแกรมอุณหภูมิโดยแบ่งอุณหภูมิเป็น 3 ช่วง คือ ช่วงแรกทำการตั้งค่าอุณหภูมิ คือ 160-195 องศาเซลเซียส โดยมีอัตราการเพิ่มอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสต่อนาที ช่วงที่สองทำการตั้งค่าอุณหภูมิ 195-230 องศาเซลเซียส โดยมีอัตราการเพิ่มอุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียสต่อนาที ช่วงที่ 3 ทำการตั้งค่าอุณหภูมิ 230-290 องศาเซลเซียส โดยมีอัตราการเพิ่มอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสต่อนาที เมื่อถึงอุณหภูมิ 290 องศาเซลเซียส ให้คงอุณหภูมิไว้ 2.5 นาที รวมใช้เวลาทั้งหมด 12 นาที

8) การเก็บข้อมูลแบบสแกน (scan mode) ของ 6-MAM มอร์ฟีน และ MOR-d₃ โดยเลือกใช้ช่วงสแกนตั้งแต่ 40-500 amu. เพื่อศึกษา RT (Retention time) และผลจากการทำข้อมูลแบบสแกนจะนำไปเลือกค่ามวลต่อประจุของสาร จำนวนประมาณ 3 ไอออน เพื่อนำไปใช้ในการเก็บข้อมูลแบบ selected ion monitoring (SIM mode) ของ 6-MAM มอร์ฟีน และ MOR-d₃ เพื่อวิเคราะห์เชิงปริมาณต่อไป

2.5 การสร้างกราฟมาตรฐาน ของ 6-MAM และมอร์ฟีน

2.5.1 การสร้างกราฟมาตรฐานของเส้นผม

โดยการเติมสารละลายมาตรฐานลงในเส้นผม 20 มิลลิกรัมของอาสาสมัครบุคคลที่ไม่มีประวัติการใช้สารเสพติดให้ได้ความเข้มข้นที่ 0.5, 1, 2 และ 5 นาโนกรัมต่อมิลลิกรัมเส้นผม สำหรับ 6-MAM ส่วนมอร์ฟีนให้ได้ความเข้มข้นที่ 0.5, 1, 2, 5, 10 นาโนกรัมต่อมิลลิกรัมเส้นผม และเติม MOR-d₃ ความเข้มข้น 400 นาโนกรัมต่อมิลลิตรปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงไปเพื่อใช้เป็น Internal standard จากนั้นนำไปสกัดด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ Soerensen pH 7.4 ทำความสะอาดด้วย SPE และทำอนุพันธ์ด้วยสาร MSTFA+1%TMCS ปริมาตร 50 ไมโครลิตร และนำสารที่ผ่านการทำอนุพันธ์นี้มาทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC/MS โดยทำการฉีดที่ความเข้มข้นละ 2 ซ้ำ โดยในช่วงความเข้มข้นดังกล่าวของ 6-MAM และมอร์ฟีนต้องให้สมการเส้นตรงมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlation Coefficient, r^2) ไม่น้อยกว่า 0.99

2.5.2 การสร้างกราฟมาตรฐานของเลือด

โดยการเติมสารละลายมาตรฐานลงในเลือดของผู้เสียชีวิตติดธรรมชาติซึ่งได้รับการชันสูตรพลิกศพและมีผลการตรวจที่ยืนยันว่าตรวจไม่พบ 6-MAM และมอร์ฟีนในเลือด โดยใช้เลือดปริมาตร 1 มิลลิตรและเติม 6-MAM ให้ได้ความเข้มข้น 5, 10, 25, 50 และ 100 นาโนกรัมต่อมิลลิตร ส่วนมอร์ฟีนให้ได้ความเข้มข้น 5, 25, 100, 250, 500 และ 1000 นาโนกรัมต่อมิลลิตร และเติม MOR-d₃ ความเข้มข้น 2 ไมโครกรัมต่อมิลลิตรปริมาตร 50 มิลลิตร ลงไปในเลือดเพื่อใช้เป็น Internal standard จากนั้นนำไปสกัดด้วย 0.05 M borate buffer pH 8.5 และนำไปทำความสะอาดด้วย SPE และทำอนุพันธ์ด้วยสาร MSTFA+1% TMCS 50 ไมโครลิตร และนำสารที่ผ่านการทำอนุพันธ์นี้มาทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC/MS โดยทำการฉีดที่ความเข้มข้นละ 2 ซ้ำ โดยในช่วงความเข้มข้นดังกล่าวของ 6-MAM และมอร์ฟีนจะต้องให้สมการเส้นตรงที่มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlation Coefficient, r^2) ไม่น้อยกว่า 0.99

2.6 กลุ่มตัวอย่างที่ทำการศึกษา

การศึกษาในกลุ่มตัวอย่างทั้ง 4 กลุ่มในการวิจัยนี้ได้รับการอนุมัติให้ศึกษารวมทั้งดำเนินการเก็บตัวอย่างวิจัยโดยผ่านมติของคณะกรรมการจริยธรรมของคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เมื่อวันที่ 27 กุมภาพันธ์ 2550 กลุ่มที่ทำการศึกษาประกอบด้วย

- 1) กลุ่มควบคุมที่ไม่มีประวัติการเสพยาเสพติดอื่น จำนวน 10 ราย
- 2) กลุ่มผู้เสพยาเสพติดเฮโรอีน (Heroin addict) โดยต้องมีประวัติการเสพยาเสพติดต่อเนื่องกันไม่น้อยกว่า 3 เดือน ในกลุ่มนี้ได้ทำการเก็บเส้นผมจากอาสาสมัคร จำนวน 24 ราย ที่เป็นสมาชิกของบ้านโอโซนซึ่งเป็นองค์กรเอกชนทำหน้าที่ลดความเสี่ยงจากการใช้สารเสพติดโดยวิธีฉีด
- 3) กลุ่มผู้เสียชีวิตจากการเสพยาเสพติดอื่นเกินขนาด โดยผ่านการวินิจฉัยของแพทย์ที่ทำการชันสูตรพลิกศพของภาควิชานิติเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จำนวน 8 ราย
- 4) กลุ่มผู้บำบัดรักษาโรคด้วยมอร์ฟีน โดยเป็นผู้ป่วยที่ได้รับมอร์ฟีนเพื่อการบำบัดรักษาลดอาการเจ็บปวดติดต่อกันอย่างน้อยเป็นเวลา 3 เดือน จากหน่วยระงับความเจ็บปวด ภาควิชาวิสัญญีวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จำนวน 12 ราย

ในการวิจัยนี้กลุ่มตัวอย่างได้ผ่านการคำนวณหาขนาดตัวอย่างที่เหมาะสม ซึ่งพบว่าขนาดตัวอย่างที่เหมาะสม คือ จำนวน 8 ราย และที่มาของสูตรการคำนวณได้มาจากงานวิจัยที่ใช้ตัวอย่างกลุ่มการทดลองที่ใกล้เคียงกัน คือ งานวิจัย Tagliaro F. et al. [64] ดังนั้นจึงได้ใช้ตัวเลขในงานวิจัยนี้มาแทนในสูตรการคำนวณ จากข้อมูลของ Tagliaro F. et al. พบว่าผลการทดลองเป็นแบบต่อเนื่องและวัดค่าผลการทดลองในรูปของค่าเฉลี่ย รวมทั้งขนาดกลุ่มตัวอย่างในการทดลอง คือ กลุ่มผู้เสพยาเสพติดเกินขนาดจนเสียชีวิตและกลุ่มผู้เสพยาเสพติดต่อเนื่องนั้นเป็นอิสระต่อกัน จึงเลือกใช้สูตรคำนวณ [69] คือ

$$\text{ขนาดตัวอย่าง} = \frac{2[(Z_\alpha + Z_\beta)\sigma]^2}{(\mu_c - \mu_t)^2}$$

เมื่อ Z_α = ค่า Z ที่ได้จากรายการแจกแจงปกติมาตรฐานเมื่อกำหนดขนาดของ type I error ให้ปกติ กำหนดให้ α error เท่ากับ 5% ได้เท่ากับ 1.96

เมื่อ Z_β = ค่า Z ที่ได้จากรายการแจกแจงปกติมาตรฐานเมื่อกำหนดขนาดของ type II error ให้ปกติ กำหนดให้ β error เท่ากับ 20% ได้เท่ากับ 0.84

μ_c = ค่าเฉลี่ยของข้อมูลในประชากรผู้เสพยาเสพติดเกินขนาดจนเสียชีวิต เท่ากับ 6.07 ng/mg [64]

μ_t = ค่าเฉลี่ยของข้อมูลในประชากรผู้เสพยาเสพติดต่อเนื่อง 1.15 ng/mg [64]

σ = ความแปรปรวนของข้อมูล ซึ่งต้องหามาจากสูตร pooled variance ซึ่งหาได้จากสูตรดังนี้

$$\text{Pooled } SD^2 = \frac{(N_1 - 1)S_1^2 + (N_2 - 1)S_2^2}{N_1 + N_2 - 2}$$

N_1 = จำนวนของประชากรผู้เสพเฮโรอีนต่อเนื่อง เท่ากับ 37 ราย [64]

S_1^2 = ค่าเฉลี่ยของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของประชากรผู้เสพเฮโรอีนต่อเนื่อง เท่ากับ 4.29 ng/mg [64]

N_2 = จำนวนของประชากรในประชากรผู้เสพเฮโรอีนเกินขนาดจนเสียชีวิต เท่ากับ 37 ราย [64]

S_2^2 = ค่าเฉลี่ยของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานในประชากรผู้เสพเฮโรอีนเกินขนาดจนเสียชีวิต เท่ากับ 2.35 ng/mg [64]

แทนค่าลงไปในสูตร

$$\text{Pooled } SD^2 = \frac{(37 - 1)(4.29)^2 + (37 - 1)(2.35)^2}{37 + 37 - 2}$$

$$SD^2 = 11.96$$

$$\sigma = \sqrt{SD^2} = 3.45$$

ดังนั้น σ เท่ากับ 3.45

เมื่อได้ตัวแปรครบให้แทนค่าต่าง ๆ ลงไปในสูตรการคำนวณขนาดตัวอย่าง คือ

$$\text{ขนาดตัวอย่าง} = \frac{2[(1.96) + (0.84)3.45]^2}{(6.07 - 1.15)^2}$$

$$\text{ขนาดตัวอย่าง} = 7.71 \text{ ราย}$$

ดังนั้นจะใช้ขนาดกลุ่มตัวอย่างกลุ่มละ 8 ราย เป็นอย่างน้อย

2.7 การสัมภาษณ์ข้อมูลทั่วไป

ทำการสัมภาษณ์ข้อมูลประวัติของกลุ่มตัวอย่างทั้ง 4 กลุ่ม ตามแบบสอบถามที่ได้จัดเตรียมไว้ มีรายละเอียดประกอบด้วยข้อมูลทั่วไปได้แก่

- 1) เพศ อายุ
- 2) สีย้อมและลักษณะการทำผม
- 3) ชนิดของสารเสพติดและยารักษาโรคที่ใช้
- 4) วิธีเสพสารเสพติด
- 5) ขนาดที่ใช้สารเสพติดและยารักษาโรค และความถี่ของการใช้สารเสพติดและยา รักษาโรค

- 6) สาเหตุของการใช้ยารักษาโรค

การสัมภาษณ์ในครั้งนี้ผู้ทำการทดลองได้ทำการสัมภาษณ์ด้วยตนเอง ยกเว้นกลุ่มของผู้บำบัดรักษาโรคด้วยมอร์ฟิน เจ้าหน้าที่พยาบาลของภาควิชาวิสัญญีวิทยา คณะแพทยศาสตร์ เป็นผู้สัมภาษณ์เก็บข้อมูล ซึ่งรายละเอียดใบยินยอมเข้าร่วมโครงการของกลุ่มต่างๆ แสดงไว้ในภาคผนวก ก และแบบสอบถามแสดงไว้ในภาคผนวก ข

2.8 การเก็บตัวอย่าง

2.8.1 การเก็บตัวอย่างเส้นผม

ทำการเก็บเส้นผมจากผู้เสียชีวิตจากการเสพยาเฮโรอีนเกินขนาด ผู้เสพยาเฮโรอีน ผู้บำบัดรักษาโรคด้วยมอร์ฟิน และกลุ่มควบคุม โดยใช้กรรไกรสะอาดตัดเส้นผมชิดโคนจากบริเวณส่วนหลังของศีรษะที่เรียกว่า vertex posterior ประมาณ 5-10 กลุ่มให้ได้เส้นผมมีน้ำหนักมากกว่า 20 มิลลิกรัม โดยเก็บบนกระดาษแข็งแล้วใช้เทปกาว 2 หน้าแปะติดพร้อมกับระบุส่วนโคนผมไว้ จากนั้นนำกระดาษฟอยล์มาห่อหุ้มและนำมาเก็บใส่ซองจดหมาย ระบุหมายเลขรหัสและเก็บ ไว้ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อรอการวิเคราะห์ในขั้นต่อไป

2.8.2 การเก็บตัวอย่างเลือด

ทำการเจาะเก็บเลือดของกลุ่มผู้เสียชีวิตจากการเสพยาเฮโรอีนเกินขนาดโดยเจาะเก็บเลือดจากบริเวณหัวใจและกลุ่มผู้บำบัดรักษาโรคด้วยมอร์ฟินเจาะเก็บจากเส้นหลอดเลือดดำ จากนั้นเก็บใส่ในหลอดเจาะเลือด ที่มีโซเดียมฟลูออไรด์กับสารโพแทสเซียมออกซาเลท จำนวน 2 หลอด พร้อมระบุหมายเลขรหัสก่อนนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

2.9 การตรวจวิเคราะห์หาระดับความเข้มข้นของ 6-MAM และมอร์ฟินในกลุ่มตัวอย่าง

2.9.1 การตรวจวิเคราะห์ในเส้นผม

นำเส้นผมที่เก็บได้จากกลุ่มตัวอย่างทั้ง 4 กลุ่ม ตัดให้มีความยาวของเส้นผมประมาณ 3 เซนติเมตรโดยทำการวัดจากโคนผมไปปลายผม เพื่อให้สอดคล้องกับประวัติการเสพยาของผู้ที่เสพติดสารเฮโรอีนและผู้บำบัดรักษาโรคด้วยมอร์ฟินตลอดในระยะ 3 เดือน จากนั้นทำตามขั้นตอนดังนี้

1) การล้างเส้นผม [70]

1.1) นำเส้นผมที่ตัดใส่หลอดแก้วทดลอง ล้างด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 5 มิลลิลิตร และเขย่าวน (vortex) 1 นาที

1.2) เทน้ำกลั่นทิ้ง จากนั้นซับด้วยกระดาษทิชชูให้แห้งและทำซ้ำตามข้อ 1.1 3 ครั้ง

1.3) ล้างเส้นผมด้วย acetone ปริมาตร 5 มิลลิลิตรเขย่าวน (vortex) 1 นาที เททิ้งและซับเส้นผมด้วยกระดาษทิชชูให้แห้ง

1.4) นำเส้นผมไปอบด้วยตู้อบลมร้อน (hot air oven) ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ประมาณ 1 ชั่วโมงจนเส้นผมแห้ง

1.5) ทำการเก็บเส้นผมไว้ที่อุณหภูมิห้องจนกว่าจะทำการตรวจวิเคราะห์เส้นผม

2) การเตรียมตัวอย่างเส้นผมหลังผ่านกระบวนการล้างเส้นผม

นำเส้นผมของกลุ่มตัวอย่าง 3 เซนติเมตร ที่ผ่านขั้นตอนการล้างเรียบร้อยแล้ว ใ้กรรไกรที่สะอาดตัดโดยมีความยาวประมาณ 1-2 มิลลิเมตร จากนั้นเก็บไว้ในขวดแก้วที่สะอาดและปิดฝาให้แน่นเพื่อรอการวิเคราะห์ต่อไป

3) การสกัดสารออกจากเส้นผม [46]

3.1) นำเส้นผมที่ตัดมาทำการชั่งให้มีน้ำหนัก 20 มิลลิกรัม ใส่ในขวดแก้วชนิดฝาเกลียวขนาด 10 มิลลิลิตร

3.2) เติมน้ำละลายบัฟเฟอร์ Soerensen pH 7.4 ปริมาตร 4 มิลลิลิตร เพื่อทำการสกัดสาร 6-MAM และมอร์ฟิน ออกจากเส้นผมตัวอย่าง

3.3) เติมน้ำ MOR-d₃ ความเข้มข้น 400 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร 50 ไมโครลิตร ลงไปในเส้นผม (Internal standard)

3.4) หมุนปิดฝาเกลียวขวดแก้วให้แน่น

3.5) นำขวดแก้วไปอบในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ประมาณ 18 ชั่วโมง

4) การทำความสะอาดสารสกัดเส้นผมด้วยตัวดูดซับของแข็ง (SPE) [46]

นำสารละลายที่สกัดจากเส้นผมมาผ่านขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างก่อนวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC/MS โดยนำสารละลายที่สกัดได้ผ่านกระบวนการ SPE (mixed-mode phase, 200 มิลลิกรัมต่อปริมาตร 3 มิลลิลิตร Vertipak TM, Thailand) ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

4.1) การปรับสภาพ (condition) โดยเติมสารละลายเมทานอลปริมาตร 200 ไมโครลิตรลงในคอลัมน์ จากนั้นเติมสารละลายบัฟเฟอร์ Soerensen pH 6 ปริมาตร 200 ไมโครลิตรลงไป

4.2) เติมสารละลายที่สกัดจากเส้นผมลงในคอลัมน์ (loading)

4.3) การชะล้างสิ่งสกปรก (washing) เป็นการล้างสิ่งสกปรกออกจากสารละลายที่สกัดได้ซึ่งดูดซับอยู่ในคอลัมน์ โดยใช้ น้ำกลั่น ปริมาตร 500 ไมโครลิตร จากนั้นเติมสารละลาย 0.1 M HCl ปริมาตร 500 ไมโครลิตรลงไปและเติมสารละลายเมทานอลปริมาตร 500 ไมโครลิตรตามลำดับ จากนั้นปล่อยให้คอลัมน์แห้งประมาณ 5 นาที

4.4) การชะล้างสารสกัดออกจากคอลัมน์ (elution) โดยเติมสารละลายผสมระหว่าง dichloromethane: 2-propanol: 25% NH_4OH ในอัตราส่วนคือ 80: 20: 2 (v/v) ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตรใส่ลงในคอลัมน์เพื่อชะสาร 6-MAM และมอร์ฟีนออกมา จากนั้นนำสารละลายเส้นผมที่ผ่านการทำ SPE มาระเหยแห้งภายใต้แก๊สไนโตรเจนที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ประมาณ 5 นาที จนเหลือแต่คราบตะกอนติดกันตลอดหลอด จากนั้นทำการปิดด้วยพาราฟิล์มให้แน่นและนำไปเก็บที่ -20 องศาเซลเซียสจนกว่าจะทำการทดลองขั้นต่อไป

5) การทำอนุพันธ์ (derivatization) [46]

นำหลอดทดลองออกจากที่ -20 องศาเซลเซียสและตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเติมสารละลายเมทานอล 100 ไมโครลิตรละลายคราบตะกอนจนหมด และนำสารละลายที่ได้ย้ายใส่ขวดแก้ว (vial) ขนาด 2 มิลลิลิตร แล้วนำมาระเหยภายใต้แก๊สไนโตรเจนอีกรอบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ประมาณ 5 นาที จนเหลือแต่คราบตะกอนติดกันขวดแก้ว ทำการเติม derivatizing agent คือ MSTFA (N-methyl-N-trimethylsilyltrifluoroacetamide) +1% TMCS (Tichloromethylsilane) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร และปิดฝาขวดให้แน่นจากนั้นนำไปอุ่นในบล็อกรักษาความร้อนที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส 20 นาที เมื่อครบเวลาที่กำหนดให้ใช้เข็มไมโครไซริงค์ดูดสารละลายในขวดแก้ว ปริมาตร 1 ไมโครลิตรฉีดเข้าเครื่อง GC-MS

2.9.2 การตรวจวิเคราะห์ในตัวอย่างเลือด

1) การเตรียมตัวอย่างเลือดเพื่อการตรวจวิเคราะห์ [71]

นำตัวอย่างเลือดออกจากที่ -20 องศาเซลเซียส และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อให้เลือดละลายแล้วนำมาวิเคราะห์ได้

2) การสกัดเลือด [71]

2.1) นำตัวอย่างเลือด (whole blood) 1 มิลลิลิตรใส่ในหลอดแก้วขนาด 10 มิลลิลิตร ที่มีฝาเกลียวปิด

2.2) เติม MOR-d, ความเข้มข้น 2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร 50 มิลลิลิตร เติมลงไปเลือด (Internal standard)

2.3) เติม 1 มิลลิลิตรของสารละลาย 0.05 M borate buffer pH 8.5 ลงไป

2.4) นำไปเขย่าและปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 g เป็นเวลา 5 นาที จะได้ตะกอนอยู่ด้านล่างและสารละลายใสอยู่ข้างบน

2.5) คูณสารละลายใสใส่ลงในขวดแก้วขนาด 10 มิลลิลิตร เพื่อนำไปสกัดด้วยเทคนิคการสกัดด้วยตัวดูดซับของแข็ง (SPE)

3) การทำความสะอาดสารสกัดเลือดด้วยตัวดูดซับของแข็ง (SPE) [71]

นำสารละลายเลือดที่สกัดได้มาผ่านขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างก่อนวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC/MS โดยนำเลือดที่สกัดได้มาผ่านกระบวนการ SPE (mixed-mode phase, 200 มิลลิกรัมต่อปริมาตร 3 มิลลิลิตร Vertipak TM, Thailand) ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

3.1) การปรับสภาพ (condition) โดยเติมสารละลายเมทานอลปริมาตร 5 มิลลิลิตรลงในคอลัมน์ จากนั้นเติมน้ำกลั่นปริมาตร 5 มิลลิลิตร และตามด้วยสารละลาย 0.05 M borate buffer pH 8.5 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ตามลำดับ

3.2) การเติมสารตัวอย่าง (loading) หลังจากผ่านขั้นตอนการปรับสภาพคอลัมน์แล้วจึงเติมสารละลายเลือดที่สกัดได้ 1.5 มิลลิลิตร ลงในคอลัมน์

3.3) การชะล้างสิ่งสกปรก (washing) โดยใช้น้ำกลั่นปริมาตร 2 มิลลิลิตร จากนั้นจึงเติมสารละลาย 0.1 M acetate buffer pH 4.0 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และเติมสารละลายเมทานอลปริมาตร 2 มิลลิลิตร จากนั้นปล่อยคอลัมน์ให้แห้งประมาณ 5 นาที

3.4) การชะล้างสารสกัดออกจากคอลัมน์ (elution) โดยเติมสารละลายผสม dichloromethane: 2-propanol: 25% NH₃ อัตราส่วนคือ 80: 20: 2 (v/v) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ลงในคอลัมน์เพื่อสกัดสารตัวอย่างออกมา จากนั้นให้เตรียมทำตามขั้นตอนต่อไป

4) การทำอนุพันธ์ (derivatization) [71]

ทำตามขั้นตอนเหมือนกับการ derivatization ในเส้นผม คือ นำสารละลายเลือดที่ผ่านการทำ SPE มาระเหยแห้งภายใต้แก๊สไนโตรเจนที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ประมาณ 5 นาที จนเหลือแต่คราบตะกอนติดกันตลอดทดลอง ทำการเติมสารละลายเมทานอล 100 ไมโครลิตร ละลายคราบตะกอนจนหมด จากนั้นนำสารละลายที่ได้ย้ายใส่ขวดแก้ว (vial) ขนาด 2 มิลลิลิตร นำมาระเหยโดยใช้แก๊สไนโตรเจน จากนั้นเติมสาร MSTFA+1%TMCS 50 ไมโครลิตร ปิดฝาให้สนิทโดยใช้ฝาแคลมป์ อุณหภูมิบล็อก 80 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที

2.10 สถิติที่ใช้ในการทดลอง

1) Descriptive statistics สถิติที่ใช้ คือค่าเฉลี่ย ค่าสูงสุด ค่าต่ำสุด ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย และ 95% Confidence Intervals; (95%CI) เพื่อนำมาใช้อธิบายระดับของสาร 6-MAM และมอร์ฟินที่ตรวจพบในเส้นผมและเลือดของกลุ่มตัวอย่าง

2) เปรียบเทียบระดับความเข้มข้นของ 6-MAM และมอร์ฟินที่ตรวจพบในเส้นผมของกลุ่มตัวอย่างผู้เสียชีวิตจากการเสพยาโรอินเกินขนาดเปรียบเทียบกับในกลุ่มผู้เสพยาโรอินที่ไม่เสียชีวิต และในกลุ่มผู้บำบัดรักษาโรคด้วยมอร์ฟิน ด้วย nonparametric เพื่อดูว่าระดับสารทั้ง 2 ตัวมีระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกันหรือไม่ในแต่ละกลุ่มตัวอย่างและกำหนดระดับความเชื่อมั่นที่ 95% ($\alpha = 0.05$)

3) เปรียบเทียบระดับความเข้มข้นของ 6-MAM และมอร์ฟินที่ตรวจพบในเลือดของกลุ่มผู้เสียชีวิตจากการเสพยาโรอินเกินขนาดกับกลุ่มผู้บำบัดรักษาโรคด้วยมอร์ฟิน ด้วย nonparametric เพื่อดูว่าระดับความเข้มข้นของสารทั้ง 2 ตัวมีระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกันหรือไม่ในแต่ละกลุ่มตัวอย่างและกำหนดระดับความเชื่อมั่นที่ 95% ($\alpha = 0.05$)

4) ศึกษาความสัมพันธ์ระดับความเข้มข้นของมอร์ฟินที่ตรวจพบในเส้นผมและเลือดของกลุ่มผู้เสียชีวิตจากการเสพยาโรอินเกินขนาดกับกลุ่มผู้บำบัดรักษาโรคด้วยมอร์ฟิน และทำการศึกษาหาความสัมพันธ์ของระดับความเข้มข้นของ 6-MAM ที่ตรวจพบในเส้นผมและเลือดของกลุ่มผู้เสียชีวิตจากการเสพยาโรอินเกินขนาด โดยใช้ค่า linear regression analysis