

### บทที่ 3

#### วัสดุและวิธีการศึกษา

#### 3.1 เครื่องมือ วัสดุ อุปกรณ์ และสารเคมีที่ใช้ในการศึกษา

##### 3.1.1 เครื่องมือ

- Gas chromatography ผลิตภัณฑ์ Agilent ผลิตโดยบริษัท Agilent Technologies ประเทศสหรัฐอเมริกา (ภาพ 7)
- Liquid chromatography ผลิตภัณฑ์ Agilent 1100 ผลิตโดยบริษัท Agilent Technologies ประเทศสหรัฐอเมริกา (ภาพ 8)
- Centrifuge รุ่น Legend RT+ ผลิตภัณฑ์ Sorvall บริษัท thermo scientific ประเทศเยอรมนี (ภาพ 9)
- Rotator รุ่น SB3 ผลิตภัณฑ์ Stuart ประเทศอังกฤษ (ภาพ 10)
- Freezing bath รุ่น FP40-MC ผลิตภัณฑ์ Julabo ประเทศเยอรมนี (ภาพ 11)
- Shaker รุ่น GFL3018 ประเทศเยอรมนี (ภาพ 12)
- Vortex รุ่น VX100 ผลิตภัณฑ์ Labnet ประเทศญี่ปุ่น
- Biohazardhood รุ่น HF-saft-1200 ผลิตภัณฑ์ Heal Force ประเทศจีน
- Chemical hood รุ่น ADC5A1 ผลิตภัณฑ์ Esco ประเทศเยอรมนี
- เครื่องดูดจ่ายสารแบบ Positive pipette ขนาด 1000  $\mu$ l ผลิตโดยบริษัท GILSON ประเทศสหรัฐอเมริกา
- Autopipette ขนาด 200 และ 1000  $\mu$ m ผลิตโดยบริษัท GILSON ประเทศสหรัฐอเมริกา

##### 3.1.2 เครื่องแก้วและอุปกรณ์

- หลอดแก้วสกัดพร้อมจุก
- บีกเกอร์ ขนาด 10, 50, 100 และ 250 มิลลิลิตร
- Erlenmeyer flask
- Glass funnel และ Filter paper
- Separating funnel
- Cylinder ขนาด 10 มิลลิลิตร

- กระดาษลิตมัส สีแดงและสีน้ำเงิน
- Nylon filter 0.2 และ 0.45 ไมครอน ขนาด 4 มิลลิเมตร
- Glass insert 250 ไมโครลิตร
- Vial ขนาด 2 มิลลิลิตร

### 3.1.3 สารเคมี

- Lorazepam (Ativan®) เบิกจากห้องจ่ายยา งานเภสัชกรรม โรงพยาบาลมหาราชนคร เชียงใหม่
- Formalin (Formaldehyde 40%) ผลิตโดยบริษัท Merck
- Acetonitrile isocratic HPLC grade ผลิตโดยบริษัท Scharlau Chemie S.A
- Methanol supergradient HPLC grade ผลิตโดยบริษัท Scharlau Chemie S.A
- Formic acid MS grade ผลิตโดยบริษัท Fluka
- Tris-(hydroxymethyl)-aminomethane AR grade ผลิตโดยบริษัท Scharlau Chemie S.A
- Hydrochloric acid AR grade ผลิตโดยบริษัท Merck
- Butylchloride AR grade ผลิตโดยบริษัท Lab-Scan
- Sodium chloride AR grade ผลิตโดยบริษัท Merck
- Ethylacetate GC grade ผลิตโดยบริษัท Merck
- De-ionize water ultra pure

### 3.2 สัตว์ทดลอง

หนูขาวสายพันธุ์ Wistar (*Rattus norvegicus*) เพศผู้ อายุ 8 สัปดาห์ จำนวน 6 ตัว น้ำหนัก ระหว่าง 250-300 กรัม จากหน่วยสัตว์ทดลอง คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ งานวิจัยนี้ ได้รับความเห็นชอบจากคณะกรรมการจริยบรรณการใช้สัตว์ทดลอง คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ หนังสืออนุมัติเลขที่ 5/2554 เมื่อคราวประชุมคณะกรรมการวันที่ 24 กุมภาพันธ์ 2554



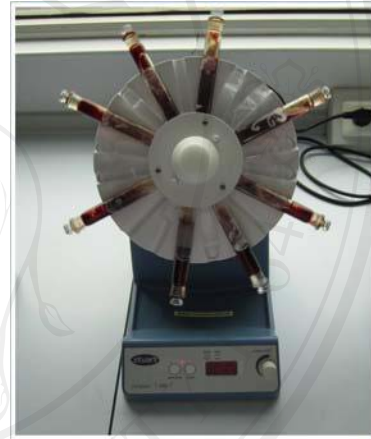
ภาพ 8 เครื่อง GC/MS



ภาพ 9 เครื่อง LC/MS



ภาพ 10 เครื่อง Centrifuge



ภาพ 11 เครื่อง Rotator



ภาพ 12 เครื่อง Freezing bath



ภาพ 13 เครื่อง Shaker

### 3.3 การให้ยาลอราซีแพมและสารละลายรักษาสภาพศพฟอร์มาลิน

ให้ยาลอราซีแพมกับหนูขาวทุกตัวทางปากขนาด 60 mg/kg โดยใช้ gavage tube ซึ่งเป็นขนาดของยาที่ได้จากการเปรียบเทียบขนาดของยาที่ใช้ในคน โดยปกติในคนให้ยาลอราซีแพม 1-4 mg หรือประมาณ 8 เม็ด เม็ดละ 0.5 mg โดยคิดต่อน้ำหนักตัวของคน 70 kg (8 x 0.5 mg/70 kg เท่ากับ 0.06 mg/kg) ในการทดลองนี้ให้ยาลอราซีแพมประมาณ 25-30 เม็ดต่อหนูขาวหนึ่งตัว เพื่อให้หลับโดยเร็วโดยคำนวณให้ได้ 1,000 เท่าของขนาดที่ให้กับคน

แบ่งหนูขาวออกเป็น 3 กลุ่ม ๆ ละ 2 ตัว ดังนี้

กลุ่มที่ 1 (หนูขาว หมายเลข 1 และ 2) - ได้รับยาลอราซีแพม แต่ไม่มีการฉีดฟอร์มาลิน หลังตายเพื่อใช้เป็นกลุ่มเปรียบเทียบ

กลุ่มที่ 2 (หนูขาว หมายเลข 3 และ 4) - ได้รับยาลอราซีแพมจนแน่นิ่งไป และฉีดฟอร์มาลินเข้าเส้นเลือดที่คอจนร่างหนูขาวแข็งทั้งตัว จากนั้นทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชั่วโมง ก่อนการผ่าซาก

กลุ่มที่ 3 (หนูขาว หมายเลข 5 และ 6) - ได้รับยาลอราซีแพมจนแน่นิ่งไป และฉีดฟอร์มาลินเข้าเส้นเลือดที่คอจนร่างหนูขาวแข็งทั้งตัว จากนั้นทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 24 ชั่วโมง ก่อนการผ่าซาก

ฟอร์มาลินที่ใช้เป็นสารละลายฟอร์มาลดีไฮด์ 40% ที่นำมาผสมกับน้ำในอัตราส่วน 2 ต่อ 1 ซึ่งเป็นปริมาณและความเข้มข้นที่หน่วยรักษาสภาพศพ โรงพยาบาลมหาราชนครเชียงใหม่ใช้กับศพคนที่เสียชีวิตแล้ว และญาติประสงค์ให้มีการฉีดสารรักษาสภาพศพก่อนรับศพไปบำเพ็ญกุศลต่อไป ซึ่งงานวิจัยนี้ได้ใช้สารละลายฟอร์มาลินที่ผสมแล้วประมาณ 200 มิลลิลิตรต่อหนูขาว 1 ตัว

### 3.4 การเก็บตัวอย่าง

เมื่อหนูขาวสลบถึงจนเสียชีวิตแล้วทำการเก็บตัวอย่างดังนี้

- เก็บสารในกระเพาะอาหารทั้งหมด
- เก็บเลือดจากเส้นเลือดที่คอ
- เก็บตับทั้งหมด
- เก็บปัสสาวะโดยใช้เข็มดูดจากกระเพาะปัสสาวะ

นำตัวอย่างใส่ในหลอดหรือถุงพลาสติก ปิดอย่างมิดชิด แล้วเก็บรักษาไว้ในอุณหภูมิ  $-10^{\circ}\text{C}$  เพื่อรอการตรวจวิเคราะห์ต่อไป

### 3.5 การเตรียมตัวอย่างสำหรับการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค GC/MS หรือ LC/MS

#### 3.5.1 สารในกระเพาะอาหาร

- เตรียมสารในกระเพาะอาหารที่ต้องการวิเคราะห์มาทำการตรวจสอบ บันทึกลงและทำเครื่องหมายกำกับ
- นำสารในกระเพาะอาหาร 10 มิลลิลิตร ใส่ใน separating funnel และหยด 25% sodium hydroxide ปรับให้ได้ pH 9-10
- เติม chloroform 30 มิลลิลิตร แล้วนำไปเขย่าด้วยเครื่อง shaker ที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที
- ถ่ายสารละลายส่วนใสลงในบีกเกอร์ ทิ้งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง
- ละลายกลับด้วย ethylacetate 200 ไมโครลิตร แล้วกรองด้วย filter membrane ขนาด 0.45 ไมครอน จากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC/MS

#### 3.5.2 เลือด

- นำตัวอย่างเลือดที่ต้องการวิเคราะห์มาทำการตรวจสอบ บันทึกลงและทำเครื่องหมายกำกับ
- เตรียมหลอดแก้วสกัดพร้อมจุกแก้วขนาด 15 มิลลิลิตร
- ดูดเลือด 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดแก้ว
- เติม trizma buffer (pH 9.2) 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดแก้วจากนั้น เขย่าด้วยเครื่อง vortex ให้เป็นเนื้อเดียวกัน
- เติม butyl chloride 8 มิลลิลิตร ลงในหลอดแก้วจากนั้นนำไปสกัดเป็นเวลา 30 นาทีด้วย rotator ที่ 40 รอบต่อนาที
- นำไปปั่นด้วยความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นนำไปแช่เย็นใน freezing bath ที่อุณหภูมิ -30°C ประมาณ 5 นาที
- ถ่ายสารละลายส่วนใสลงในบีกเกอร์ ทิ้งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง
- ละลายกลับด้วย methanol 200 ไมโครลิตร แล้วกรองด้วย filter membrane ขนาด 0.2 ไมครอน ใส่ใน glass insert จากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง LC/MS

### 3.5.3 ตับ

- เตรียมเนื้อเยื่อตับที่ต้องการวิเคราะห์มาทำการตรวจสอบ บันทึกลงและทำเครื่องหมายกำกับ
- นำเนื้อเยื่อตับ ผสมกับน้ำกลั่น นำไปบดด้วยเครื่อง homogenizer ให้ละเอียด
- เติมกรดโดยใส่ hydrochloric acid จนได้ pH 2-3
- เติมผง ammonium sulphate ลงไปมาก ๆ จนกระทั่งสารละลายอิมตัว ซึ่งโปรตีนจะจับกันเป็นก้อน
- นำไปอุ่นบน water bath ที่อุณหภูมิ 65°C นานครึ่งชั่วโมง เพื่อให้โปรตีนจับกันหมด
- นำไปปั่นด้วยความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที แยกสารละลายส่วนใสออกใส่บีกเกอร์
- นำสารละลายดังกล่าวประมาณ 10 มิลลิลิตร ใส่ใน separating funnel แล้วเติม 25% sodium hydroxide ปรับให้ได้ pH 9-10
- เติม chloroform 30 มิลลิลิตร แล้วนำไปเขย่าด้วยเครื่อง shaker ด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที
- ถ่ายสารละลายส่วนใสลงในบีกเกอร์ ทิ้งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง
- ละลายกลับด้วย methanol 200 ไมโครลิตร แล้วกรองด้วย filter membrane ขนาด 0.2 ไมครอน จากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง LC/MS

### 3.5.4 ปัสสาวะ

ปั่นแยกปัสสาวะเอาส่วนใสไปวิเคราะห์ ที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำส่วนใสกรองด้วย filter membrane ขนาด 0.2 ไมครอน ใส่ใน glass insert จากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง LC/MS

### 3.6 การวิเคราะห์ลอร่าซีแพมด้วยเทคนิค GC/MS หรือ LC/MS

ปรับสภาวะของเครื่อง GC/MS หรือ LC/MS ตามรายละเอียดในตาราง 2 และ 3 ตามลำดับ จนเครื่องอยู่ในสภาวะ equilibrium ก่อนการฉีดสารตัวอย่าง

ตาราง 2 สภาวะของเครื่อง GC/MS

GC column	HP-1MS, 30x0.32 mm. ID x 0.25 $\mu$ m film thickness
Carrier gas	Helium 99.999 % Mode : Constant flow Gas flow : 2 ml/min Gas saver : on Saver flow : 20.0 ml/min Saver time : 2.00 min
Injection	Initial time : 230 $^{\circ}$ C Mode : Split Injection volume : 1 $\mu$ l Split ratio : 10:1
Temperature program	Initial temperature : 50 $^{\circ}$ C for 1 min Program : 25 $^{\circ}$ C/min to 150 $^{\circ}$ C for 1 min 10 $^{\circ}$ C/min to 180 $^{\circ}$ C for 2 min 10 $^{\circ}$ C/min to 300 $^{\circ}$ C for 5 min Run time : 28 min
Mass spectrometer	Auxiliary temperature : 305 $^{\circ}$ C Mass Quad temp : 150 $^{\circ}$ C MS source temp : 230 $^{\circ}$ C Acquisition Mode : Scan Mass Range : 50-500 m/z Solvent delay : 3.5 min

ตาราง 3 สภาวะของเครื่อง LC/MS

LC column	Water Atlantis dC18 (2.1x150 mm. i.d.) particle size 3 $\mu$ m			
Condition LC	Mobile phase	: 0.1% Formic acid in de-ionize water (B) 0.1% Formic acid in Acetonitrile (D)		
	Flow rate	: 0.220 ml/min		
	Injection volume	: 5 $\mu$ l		
	Run time	: 36 min		
Pump Gradient program	Time	Solvent B	Solvent D	Pressure Limit
	00.00	70 %	30 %	250
	01.00	70 %	30 %	250
	27.00	0.0 %	100 %	250
	28.00	0.0 %	100 %	250
	28.10	70 %	30 %	250
Mass parameter	Mass Range Mode	: Ultra scan 50-500		
	Target Mass	: 250 m/z		
	Ion Polarity	: positive		
	Ion source type	: ESI		
	Dry Temp (set)	: 280 $^{\circ}$ C		
	Nbulizer (set)	: 35 psi		
	Dry gas (set)	: 8 L/min		
	Abs. Threshold AutoMS (2)	: 5000		
Active Exclude After	: 3 spectra			
	MS/MS Frag Ampl	: 0.8 Volt		