# การพัฒนาชุดทดสอบอย่างง่ายในการตรวจวิเคราะห์แกมมา–ไฮดรอกซีบูเทอริก แอซิด (Gamma–hydroxybutyric acid, GHB) และแกมมา–บิวทีโรแลคโทน (Gamma–butyrolactone, GBL) ในเครื่องดื่มสำหรับการประยุกต์ใช้ทางนิติวิทยาศาสตร์

# Development of a test kit for gamma–hydroxybutyric acid (GHB) and Gamma–butyrolactone (GBL) in beverages for forensic application

**ศิริรัตน์ ชูสกุลเกรียง[1], ศุภชัย ศุภลักษณ์นารี[2], ปิยาภา จันทร์มล[3] และ อรทัย เขียวพุ่ม[4]**

**Sirirat Choosakoonkriang[1], Supachai Supaluknari[2], Piyapa Junmon[3] and Orathai Kheawpum[4]**

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร

Faculty of Science, Silpakorn University, Thailand

Corresponding Author, E–mail: [1]Choosakoonkrian_s@silpakorn.edu

**Received** September 24, 2022; **Revised** February 20, 2023; **Accepted** February 25, 2023

## บทคัดย่อ

บทความนี้มีวัตถุประสงค์ 1) เพื่อศึกษาและพัฒนาชุดทดสอบอย่างง่ายในการตรวจวิเคราะห์สาร Gamma–hydroxybutyric acid (GHB) และ Gamma–butyrolactone (GBL) ในเครื่องดื่ม 2) เพื่อศึกษาผลของสภาวะการวิเคราะห์ที่เหมาะสม และการรบกวนของสีของเครื่องดื่มในการวิเคราะห์ด้วยชุดทดสอบอย่างง่าย รูปแบบการวิจัยเป็นการวิจัยเชิงทดลองโดยใช้วิธีการวัดสีเพื่อตรวจหาสารประกอบเชิงซ้อนสีม่วงจากปฏิกิริยาของการทดสอบเฟอริกไฮดรอกซาเมตของ GHB และ GBL ได้สารประกอบที่มีสีม่วง ตัวอย่างที่ใช้เป็น GHB และ GBL ที่เติมลงในเครื่องดื่มที่นำมาทดสอบประกอบไปด้วย น้ำเปล่า, เครื่องดื่มแอลกอฮอล์ 5%, น้ำโซดา และน้ำอัดลมสีต่าง ๆ รวมทั้งสิ้น 10 ชนิด ผลการวิจัยพบว่า

1. ชุดทดสอบสามารถตรวจวิเคราะห์ได้ทั้ง GHB และ GBL

2. ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่วิเคราะห์ได้ (LOD) คือ 0.47 มก./มล. และ 1.05 มก./มล. สำหรับ GHB และ GBL ตามลำดับ

3. ผลการทดสอบพบว่าไม่มีการรบกวนของแอลกอฮอล์ คาร์บอนไดออกไซด์ที่ละลายในน้ำสารให้ความหวาน และสีของเครื่องดื่มภายใต้สภาวะการวิเคราะห์

ชุดทดสอบที่พัฒนาขึ้นเป็นวิธีที่รวดเร็ว ใช้งานง่าย และพกพาสะดวก ผลจากการวิจัยนี้แสดงให้เห็นศักยภาพของชุดทดสอบในการตรวจวิเคราะห์ทางนิติวิทยาศาสตร์ของ GHB และ GBL ที่เติมลงในเครื่องดื่ม

**คำสำคัญ:** ชุดทดสอบเบื้องต้น; แกมมา–ไฮดรอกซี บูเทอริก แอซิด; แกมมา–บิวทีโรแลคโทน; นิติวิทยาศาสตร์

## Abstract

The objectives of this study are to (1) develop a rapid color test kit for the screening of gamma–hydroxybutyric acid (GHB) and its precursor, gamma–butyrolactone (GBL) in beverages and (2) examine the suitable condition and the effect of beverage color on the detection of GHB and GBL. The colorimetric method was employed to detect the purple–color complex from the reaction of ferric hydroxamate test of GHB and GBL. The samples studied prepared by adding GHB and GBL into the beverages. The beverages included water, green tea, 5% alcohol and variety of soda pops of difference colors. The research results were found as follows;

1. The test kit is capable of detecting both GHB and GBL.

2. The detection limits (LOD) were 0.47 mg/mL and 1.05 mg/mL for GHB and GBL respectively.

3. The test results were free from interferences of alcohol, dissolved CO2, sweetener and color of the beverage under the analysis condition.

The test kit is a rapid method, simple to use and convenient to carry around. The results from this study have demonstrated the potential of the test kit in forensic examination of GHB and GBL present in beverages.

**Keywords:** Test Kit; Gamma–hydroxybutyric acid (GHB); Gamma–butyrolactone (GBL); Forensic Science

## บทนำ

ตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบันมีการรายงานเกี่ยวการใช้สารเสพติดควบคู่ไปกับการมีเพศสัมพันธ์ เพื่อเพิ่มความมั่นใจ และระยะเวลาในการมีเพศสัมพันธ์ และในบางรายอาจเสพติดจนกลายเป็นผลเสียตามมา และในข่าวอาชญากรรมทางเพศส่วนใหญ่ ผู้กระทำความผิดมักมีการใช้ยาเสพติดบางประเภท

เพื่อให้เหยื่อเกิดความรู้สึกมึนงงและสับสน สูญเสียการควบคุมและความทรงจำระยะสั้น โดยหากเหยื่อถูกมอมเมาด้วยสารเสพติดมักสังเกตได้ยาก เนื่องจากส่วนใหญ่จะผสมในเครื่องดื่ม ดังนั้นในการป้องกันตนเองขณะไปสถานบันเทิงในช่วงเวลากลางคืน ควรดื่มเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ในระดับที่สามารถควบคุมตนเองได้ ไม่รับเครื่องดื่มจากคนแปลกหน้า หรือควรสังเกตอาการของตนเองหลังดื่ม เพื่อป้องกันการถูกก่อเหตุอาชญากรรมทางเพศที่เกิดขึ้น (Musikatavorn, 2020) โดยในการตรวจสอบหาสารเสพติดที่ผสมอยู่ทำได้ยาก และมักจะพบหลังจากเกิดเหตุอาชญากรรมทางเพศไปแล้ว ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีความสนใจในการพัฒนาชุดทดสอบเบื้องต้น เพื่อใช้ในการตรวจสอบสารเสพติดที่อาจผสมอยู่ในเครื่องดื่ม

ซึ่งประเภทของสารเสพติดที่นำมาใช้ในการพัฒนาชุดทดสอบอย่างง่าย นั้นคือ แกมมา–ไฮดรอกซีบูเทอริก แอซิด (GHB) จัดเป็นวัตถุออกฤทธิ์ประเภท 1 ตามพระราชบัญญัติวัตถุที่ออกฤทธิ์ต่อจิตและประสาท พ.ศ. 2518 ออกฤทธิ์ทำให้ระบบการทำงานของสมองและประสาทส่วนกลางทำงานช้าลง ในทางการแพทย์เคยใช้เป็นยาในการวางสลบ หรือรักษาโรคบางโรค แต่มีการควบคุมการใช้ที่เข้มงวดโดยแพทย์ผู้เชี่ยวชาญ อย่างไรก็ตามยาตัวนี้ถูกถอนออกจากบัญชียาตั้งแต่ปี พ.ศ. 2533 (Kiatburanakul, 2016) แต่ในปัจจุบันมีการนำไปใช้ในสถานบันเทิง เพื่อวัตถุประสงค์ในการคุกคามทางเพศ จึงถูกเรียกว่า “ยาเสียสาว” มีหลากหลายรูปแบบ เช่น เม็ด ผงแป้ง และของเหลวซึ่งไม่มีสี ไม่มีกลิ่น ง่ายต่อการนำไปผสมกับเครื่องดื่มต่างๆ เนื่องจากไม่สามารถสังเกตได้ด้วยตาเปล่า และเมื่อเข้าสู่ร่างกายจะออกฤทธิ์ในระยะเวลาประมาณ 10–20 นาที และออกฤทธิ์นานกว่า 4 ชั่วโมง ผลข้างเคียงในระยะสั้น จะทำให้เกิดอาการมึนงง วิงเวียนศีรษะ คลื่นไส้ อาเจียน ความจำเสื่อมชั่วขณะ ซึมเศร้า มีอารมณ์ทางเพศ มีปัญหาทางด้านการมองเห็น หากเสพอย่างต่อเนื่องเป็นระยะเวลานานจะพบอาการนอนไม่หลับ มีปัญหาเกี่ยวกับความทรงจำ เกิดภาวะซึมเศร้า มีปัญหาทางจิต และมีปัญหาเกี่ยวกับระบบทางเดินหายใจ (Bangkok Business, 2019) และแกมมา–บิวทีโรแลคโทน (GBL) ซึ่งจัดเป็นวัตถุอันตรายชนิดที่ 3 ตามพระราชบัญญัติวัตถุอันตราย พ.ศ. 2535 อยู่ในการดูแลของกรมโรงงานอุตสาหกรรม กระทรวงอุตสาหกรรม มีการนำไปใช้ประโยชน์ทางอุตสาหกรรมจำนวนมาก เช่น ใช้ในการกระบวนการสังเคราะห์โพลิเมอร์ ใช้เป็นตัวทำละลายและเป็นสารชะล้างสี หมึกพิมพ์ กาว ใช้ในโรงงานประกอบชิ้นส่วนอิเลคทรอนิคส์ เป็นต้น โดยเมื่อเข้าสู่ร่างกายจะถูกเมตาบอไลต์โดยเอนไซม์แลคโตเนสซึ่งมีอยู่ในเลือด กลายเป็น GHB อย่างรวดเร็วซึ่งออกฤทธิ์เช่นเดียวกัน (Narcotics Control Division Food and Drug Administration, n.d.)

โดยในบทความวิจัยนี้นำเสนอการศึกษาอุปกรณ์ทดสอบอย่างง่ายสำหรับตรวจสอบ GHB และ GBL เพื่อให้สามารถพกพานำไปใช้นอกห้องปฏิบัติการได้ ใช้ทดสอบในผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มชนิดต่าง ๆ โดยอาศัยปฏิกิริยา Ferric hydroxamate ที่สามารถเกิดกับสารประกอบเชิงซ้อนกับหมู่ฟังก์ชันเอสเทอร์ได้ โดยเมื่อให้ความร้อน และทำปฏิกิริยากับ Hydroxylamine จะได้เป็นกรด Hydroxamic ซึ่งทำให้เกิดสารประกอบ

เชิงซ้อนกับ $Fe^{3+}$ และมีสีน้ำตาลเข้ม (Alston et al., 2002) เพื่อใช้ในการตรวจวิเคราะห์สาร GHB และ GBL และนำไปประยุกต์ใช้ในทางนิติวิทยาศาสตร์

## วัตถุประสงค์การวิจัย

1. เพื่อศึกษาและพัฒนาชุดทดสอบอย่างง่ายในการตรวจวิเคราะห์สาร GHB และ GBL
2. เพื่อศึกษาผลของการรบกวนในการวิเคราะห์ด้วยชุดทดสอบอย่างง่าย

## การทบทวนวรรณกรรม

การวิจัยการพัฒนาชุดทดสอบอย่างง่ายในการตรวจวัดคือ แกมมา–ไฮดรอกซี บูเทอริก แอซิด (GHB) และแกมมา–บิวทีโรแลคโทน (GBL) สำหรับการประยุกต์ใช้ทางนิติวิทยาศาสตร์นั้น ผู้วิจัยได้ทำการศึกษาข้อมูลงานวิจัยจากแหล่งต่าง ๆ ให้ได้มาซึ่งองค์ความรู้ที่จะนำไปพัฒนางานงานวิจัย ดังนี้

Mesmer et al. (1998) พัฒนาการตรวจวิเคราะห์ Gamma–hydroxybutyrate (GHB), Gamma–butyrolactone (GBL) หรือส่วนผสมของสารสองชนิด โดยวิธี HPLC/UV–VIS spectrophotometric สำหรับการแยกและการหาปริมาณของ GHB และ GBL ในตัวอย่างที่สังเคราะห์แบบผิดกฎหมายที่มีขายอยู่ในตลาดมืด ซึ่งให้ผลการตรวจพบที่ต่ำสุดโดยประมาณคือ 50 ng.

Ciolino et al. (2001) ได้ทำการศึกษาการเปลี่ยน GBL เป็น GHB โดยศึกษาผลของค่า pH และเวลาของสารละลายที่มีการเติม GHB หรือ GBL ลงในน้ำบริสุทธิ์และสารละลายที่เป็นบัฟเฟอร์ การเกิดปฏิกิริยา Hydrolysis จะศึกษาผลของอุณหภูมิและเวลา วิเคราะห์ผลโดยใช้เทคนิค High performance liquid chromatography (HPLC), Chromatography–mass spectrometry (GC–MS) และ infrared spectroscopy (IR) จากการศึกษาพบว่า pH เวลาและอุณหภูมิการเก็บรักษาเป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่ออัตราและการเกิดปฏิกิริยา Hydrolysis ภายใต้สภาวะที่เป็นด่างอย่างรุนแรง (pH 12.0) GBL จะถูกเปลี่ยนเป็น GHB อย่างสมบูรณ์ภายในระยะเวลาอันสั้น

Alston et al. (2002) ศึกษาวิธีการทดสอบการเปลี่ยนสีสำหรับใช้ตรวจวิเคราะห์ Gamma–hydroxybutyric acid (GHB) โดยการทดสอบกับ ferric hydroxamate ที่ใช้สำหรับการตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์ของหมู่เอสเทอร์ ซึ่งมีการดัดแปลงเพื่อตรวจวิเคราะห์ GHB ในตัวอย่างปัสสาวะของผู้หญิงที่มีสุขภาพดีและเป็นผู้ชายที่มีสุขภาพดี จากการทดสอบสามารถทำได้ภายใน 5 นาที โดยผลการทดลอง GHB ในปัสสาวะ 0.3 ml. ให้ผลการตรวจพบที่ต่ำสุดเท่ากับ 0.5 mg/ml และ GHB ในปัสสาวะ 1 ml. ให้ผล detection limit เท่ากับ 0.1 mg/ml. จากการทดสอบสีของ GHB เกิดเป็นสีม่วง และจากการทดลองไม่มี interference จาก alcohol, สารประกอบ phenolic และสารเคมีชีวภาพอื่น ๆ

Elliott and Burgess (2005) ศึกษาเกี่ยวกับการหาปริมาณ Gamma–hydroxybutyric acid (GHB) และสารตั้งต้นคือ gamma–butyrolactone (GBL) ซึ่งมักพบในยาที่ลักลอบขายในท้องตลาดและใช้ในเครื่องดื่มที่ซื้อในสหราชอาณาจักรมากกว่า 50 รายการ ได้รับการวิเคราะห์ว่ามี GHB และ GBL ในเครื่องดื่มไวน์ที่หมักตามธรรมชาติจากองุ่นแดงและขาว แต่ไม่พบในเครื่องดื่มอื่นๆเช่น เบียร์ น้ำผลไม้ สุรา หรือเหล้า โดยตรวจพบ GHB/GBL ในไวน์แดงเวอร์มุต (8.2 mg/L) เชอร์รี่ (9.7 mg/L) พอร์ต (GBL) ไวน์แดง (4.1–21.4 mg/L) และไวน์ขาว (<3–9.6 mg/L) โดยไม่มีการรบกวนของแอลกอฮอล์หรือ pH ของเครื่องดื่ม

LeBeau et al. (2000) ได้ศึกษาการหาปริมาณ Gamma–hydroxybutyrate (GHB) ในตัวอย่างปัสสาวะ โดยตัวอย่างปัสสาวะนำมาจากอาสาสมัครที่ไม่เคยใช้ GHB จำนวน 31 คน ตัวอย่างถูกเก็บไว้ภายใต้สภาวะมาตรฐานของการแช่เย็น คือ 5 องศาเซลเซียส โดยไม่มีการใส่สารกันเสียเพิ่มลงไป ตัวอย่างทั้งหมดนั้นถูกนำมาวิเคราะห์ซ้ำๆ สำหรับการมีอยู่ของ GHB ในระยะเวลา 6 เดือนโดยใช้เทคนิค GC–MS

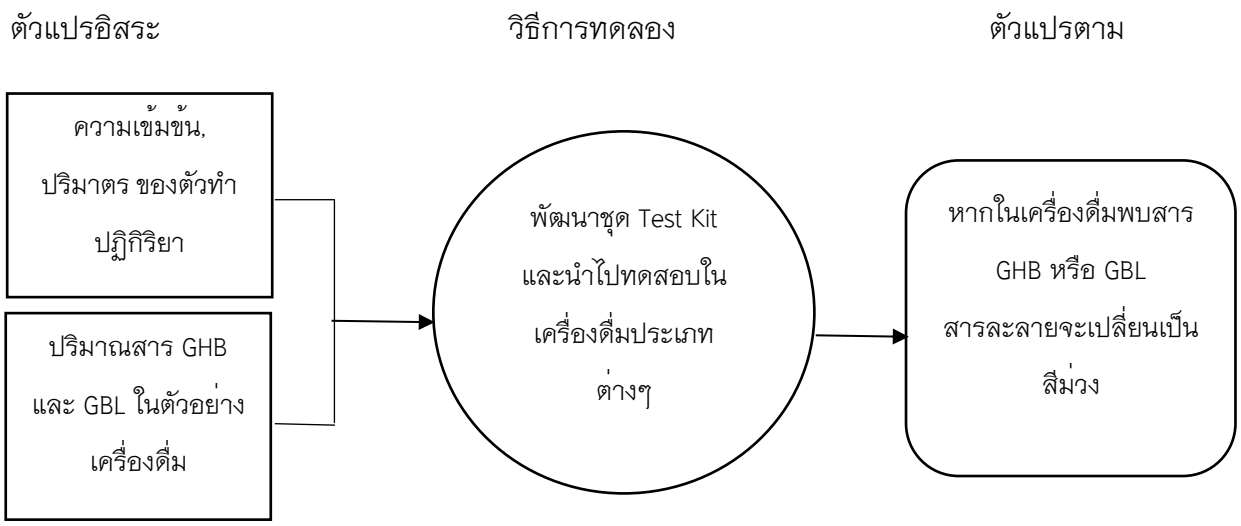
Rosi et al. (2013) ได้ทำการศึกษาปริมาณ GHB และ GBL และ 1,4–butanediol ในผลิตภัณฑ์อาหารเสริมที่มีจำหน่ายในท้องตลาด โดยทำการสกัดอย่างง่ายด้วย acidic acetonitrile จากนั้นวิเคราะห์ด้วยเทคนิค gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS) วิธีการที่พัฒนาขึ้นให้ความเป็นเส้นตรงในช่วง 1–20 mg/mL มีความแม่นยำ 88–99% และมีความเที่ยงอยู่ระหว่าง 2.9–7.3%

Sirisupakritku et al. (2017) ได้ศึกษาจากตัวอย่างของกลางที่ได้รับในปี พ.ศ. 2558–2559 เพื่อตรวจหา GHB ทั้งนี้ ตัวอย่างที่ได้รับจำนวน 10 ตัวอย่าง มีลักษณะเป็นของเหลวใส ผลการตรวจ ตัวอย่างทั้งหมดไม่พบ GHB แต่พบ GBL และ 1,4–BD จำนวน 4 และ 6 ตัวอย่าง ตามลำดับ การศึกษานี้แสดงถึงแนวโน้มการแพร่ระบาดของ GBL และ1,4–BD ทดแทน GHB ในประเทศไทยและผลการศึกษานี้จะเป็นประโยชน์กับหน่วยงานทั้งด้านการปราบปรามและควบคุมกฎหมายเพื่อแก้ปัญหายาเสพติดของประเทศ

จากการศึกษางานวิจัยดังกล่าวข้างต้นเห็นได้ว่า GHB และ GBL ต้องใช้เครื่องมือวิเคราะห์ที่ไม่สามารถใช้นอกห้องปฏิบัติการได้ และยังต้องใช้ผู้เชี่ยวชาญในการตรวจวิเคราะห์ ดังนั้นจึงมีความสนใจพัฒนาชุดทดสอบเบื้องต้น ที่ใช้งานง่าย และบุคคลทั่วไปสามารถใช้ได้ ถือว่าเป็นประโยชน์และน่าสนใจเป็นอย่างยิ่งในงานวิจัยทางนิติวิทยาศาสตร์

## กรอบแนวคิดการวิจัย

งานวิจัยนี้เป็นการวิจัยเชิงทดลอง ผู้วิจัยกำหนดกรอบแนวคิดการวิจัยตามแนวคิดการเปลี่ยนแปลงของสารเมื่อทำปฏิกิริยาและเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่สามารถมองเห็นสีที่เปลี่ยนแปลงได้ด้วยตาเปล่า (Colorimetric method) โดยมีรายละเอียดดังนี้




**ภาพที่ 1** กรอบแนวคิดในการวิจัย

## ระเบียบวิธีวิจัย

งานวิจัยนี้เป็นงานวิจัยเชิงทดลอง ซึ่งสารเคมีที่ใช้ในการพัฒนาชุดทดสอบอย่างง่าย ประกอบไปด้วย Gamma–butyrolactone (GBL), Sodium hydroxide (NaOH), Hydroxylamine hydrochloride ($NH_3OHCl$), Ferric chloride ($FeCl_3$), Sulfuric acid ($H_2SO_4$) และตัวอย่าง 10 ชนิด คือ น้ำเปล่า, เครื่องดื่มแอลกอฮอล์ 5%, น้ำโซดา, น้ำชาเขียว, น้ำอัดลมสีต่าง ๆ คือ สีส้ม, สีแดง, สีเขียว, สีม่วง, สีน้ำตาล และใสไม่มีสี โดยมีการแบ่งขั้นตอนการวิจัยออกเป็น 3 ขั้น ตอนดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 การศึกษาการเปลี่ยน Gamma–butyrolactone (GBL) เป็น Gamma–hydroxybutyric acid (GHB) เนื่องจากสารเคมี Gamma–hydroxybutyric acid หรือ GHB เป็นสารควบคุมดังนั้นจึงไม่สามารถหาซื้อได้ทั่วไป จึงต้องมีการสังเคราะห์โดยมีสารตั้งต้นคือ Gamma–butyrolactone หรือ GBL ซึ่งสามารถทำได้โดยเริ่มจากนำสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้น 6 โมลาร์ ปริมาตร 47.80 มิลลิลิตร ใส่บีกเกอร์แล้วนำไปให้ความจนมีอุณหภูมิอยู่ในช่วง 70–75 °C จากนั้นเติมสารละลาย GBL ปริมาตร 2.20 มิลลิลิตร และทิ้งไว้ 30 นาที จะได้สารละลาย GHB

จากนั้นตรวจสอบยืนยันด้วยเทคนิค Gas Chromatography – Mass Spectrometer (GC–MS) โดยใช้เครื่อง Gas Chromatograph ยี่ห้อ Thermo scientific รุ่น Trace 1300 คอลัมน์ที่ใช้คือ TG–5MS (30.00 m x 0.250 mm ID x 0.250 µm) ใช้ก๊าซฮีเลียม (He) เป็นเฟสเคลื่อนที่ ตั้งอัตราการไหลที่ 1.0 mL/min อุณหภูมิคอลัมน์เริ่มต้น 70 ˚C ค้างไว้ 2 นาที แล้วเพิ่มขึ้นจนถึงอุณหภูมิ 100 ˚C โดยใช้อัตรา 15 ˚C /min แล้วเพิ่มขึ้นจนถึงอุณหภูมิ 300 ˚C โดยใช้อัตรา 35 ˚C /min แล้วค้างไว้ที่ 300 ˚C เป็นเวลา 3 นาที เวลาวิเคราะห์รวม 12.750 นาที และส่วน Mass Spectrometer ยี่ห้อ Thermo scientific รุ่น ISQ 7000 ชนิด Single Quadrupole

ซึ่งผ่านส่วนเชื่อมต่อ (Transfer Line) ที่ตั้งอุณหภูมิไว้ที่ 250 ˚C และอุณหภูมิของ Ion Source เป็น 250 ˚C ใช้การทำให้สารแตกตัวเป็นไอออนด้วย Electron Impact Ionization (EI) และใช้ระบบ Scan Mode โดยวัดมวล m/z ที่ 42, 56 และ 86

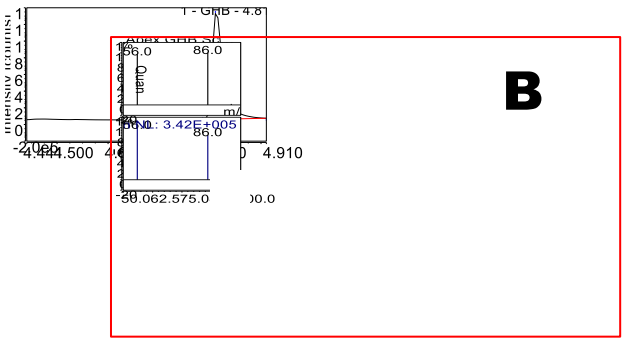
ขั้นตอนที่ 2 การศึกษาความเข้มข้น ปริมาตร ที่เหมาะสมสำหรับชุด Test Kit จากการทดลองการศึกษาหาสาร GHB และ GBL ด้วยวิธี Colorimetric test ได้มีการใช้ความเข้มข้นกรด–เบส ที่สูงมาก จึงได้ทำการทดลองเพื่อหาสัดส่วนและความเข้มข้นของ NaOH และ $H_2SO_4$ ที่เหมาะสม พบว่าความเข้มข้นของ NaOH และ $H_2SO_4$ ที่เหมาะสมคือ 2 M $H_2SO_4$ และ 3 M NaOH โดยสภาวะที่เหมาะสมในการตรวจสอบ GBL ด้วยวิธี colorimetric test คือ ใช้เครื่องดื่มที่มีสาร GBL ผสมอยู่มา 1.0 mL เติม 2 M $H_2SO_4$ 0.5 mL แล้วเติมสารละลาย 0.5 M $NH_3OHCl$ 1.0 mL จากนั้นปรับ pH ให้เป็น 10 ด้วยการเติม 3 M NaOH 1.0 mL แล้วปรับ pH ให้เป็น 2 ด้วยการเติม 2 M $H_2SO_4$ 0.5 mL สุดท้ายเติม 0.7 M $FeCl_3$ 0.5 mL

ขั้นตอนที่ 3 การนำชุด Test Kit มาทดสอบกับเครื่องดื่มประเภทต่าง ๆ เพื่อตรวจสอบการรบกวนของสีและส่วนผสมต่าง ๆ

หลังจากได้ชุดทดสอบแล้ว นำมาทดสอบกับเครื่องดื่มตัวอย่างเพื่อตรวจสอบการรบกวนในการตรวจพบสีหากเครื่องดื่มมีสาร GHB หรือ GBL โดยตรวจสอบสีของเครื่องดื่ม ประเภทของเครื่องดื่ม โดยใช้การถ่ายภาพและวิเคราะห์ค่าความเข้มสี RGB ด้วยโปรแกรม ImageJ

## ผลการวิจัย

วัตถุประสงค์ที่ 1 ผลการวิจัยพบว่าการพัฒนาชุดทดสอบอย่างง่ายในการตรวจวิเคราะห์สาร Gamma–hydroxybutyric acid (GHB) และ Gamma–butyrolactone (GBL) เบื้องต้นในการวิจัยได้ทำการเปลี่ยน GBL ให้เป็น GHB ในสภาวะที่เป็นเบส เนื่องจากสาร GHB เป็นสารควบคุมซึ่งหาซื้อได้ยาก ซึ่งผลการเปลี่ยนแปลงทำได้โดยนำสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้น 6 โมลาร์ ปริมาตร 47.80 มิลลิลิตร ใส่บีกเกอร์แล้วนำไปให้ความจนมีอุณหภูมิอยู่ในช่วง 70–75 °C จากนั้นเติมสารละลาย GBL ปริมาตร 2.20 มิลลิลิตร และทิ้งไว้ 30 นาที ทำการตรวจสอบผลที่ได้โดยเทคนิค GC–MS ได้โครมาโทแกรมดังนี้



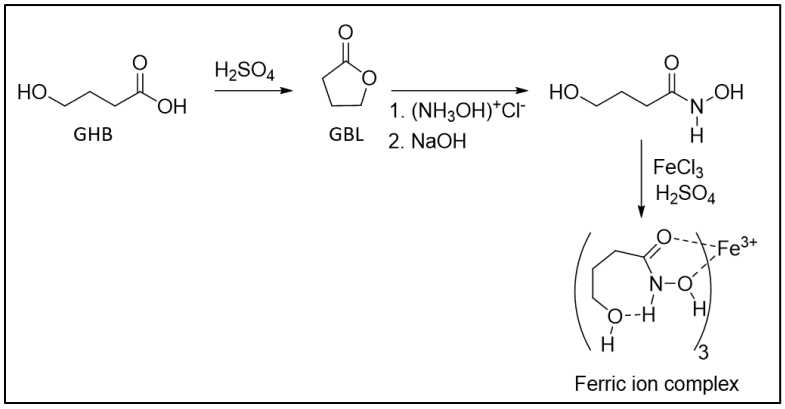

**ภาพที่ 2** A: โครมาโทแกรมแสดงตำแหน่งพีค GHB ที่เวลา 4.810 นาที
B: การแตกมวลของสาร GHB

จากภาพที่ 2 แสดงโครมาโทแกรมของ GHB ที่ได้จากเทคนิค GC–MS โดยเมื่อทำการวิเคราะห์การแตกมวลเทียบกับฐานข้อมูล ผลที่ได้จากโครมาโทแกรมจาก SIM Mode จะพบพีคของ GHB ที่ 4.810 นาที และแสดงการยืนยันผลที่ได้โดยดูจากการแตกมวลของสารเทียบกับฐานข้อมูลแสดงดังภาพที่ 1B ซึ่งจะพบมวลที่ 56 และ 86 m/z ใช้ยืนยันว่าเป็น GHB จริง จากนั้นได้นำสาร GHB และ GBL มาใช้ในการทดสอบเพื่อหาความเข้มข้น ปริมาตร ที่เหมาะสมในการทำชุดทดสอบ โดยได้ผลดังแสดงในตารางที่ 1

**ตารางที่ 1** ความเข้มข้นและปริมาตรสารเคมีที่เหมาะสมในการตรวจสอบหาสาร GHB และ GBL ด้วยวิธี colorimetric test ที่ดัดแปลงเป็นชุดทดสอบ (Test kit)

| สารเคมี | ปริมาตร | ผลการทดลอง | |
|---|---|---|---|
| Sample | 1.0 mL | | |
| 2 M $H_2SO_4$ | 0.5 mL | | |
| 0.5 M $NH_3OHCl$ + 3 M NaOH | 2.0 mL | | |
| 0.7 M $FeCl_3$ + 2 M $H_2SO_4$ | 0.5 mL | ไม่พบ | พบ |

จากตารางที่ 1 ถ้าหากตรวจพบสาร GHB และ GBL (Positive) จะปรากฏสีม่วง หรือสีม่วงอมน้ำตาล โดยความเข้มสีจะเพิ่มขึ้นตามปริมาณ GHB และ GBL ที่มากขึ้น ถ้าหากไม่พบสาร GHB และ GBL (Negative) จะปรากฏสีเหลืองอ่อนของสารละลาย $FeCl_3$ โดยปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นแสดงดังภาพที่ 2




**ภาพที่ 3** สมการแสดงปฏิกิริยา Ferric hydroxamate สำหรับใช้ตรวจวิเคราะห์ GHB

อ้างอิงจาก “Rapid colorimetric screening test for gamma–hydroxybutyric acid (liquid X) in human urine,” โดย Alston and Ng, (2002). *Forensic Sci Int*, 126(2),114–117 (https://doi.org/10.1016/s0379–0738(02)00050–6)

สำหรับตารางที่ 2 ได้นำสาร GHB และ GBL ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เติมลงในน้ำเปล่าที่ใสไม่มีสี และไม่มีส่วนผสมอย่างอื่น เพื่อใช้ในการทดสอบการเปลี่ยนแปลงของสีของสารละลายที่เปลี่ยนแปลงไปตามความเข้มข้นของสาร GHB และ GBL ที่เติมลงไป

**ตารางที่ 2** การทดสอบ GHB และ GBL ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ด้วยชุดทดสอบ (Test kit)

| **ตัวอย่าง** | **ก่อนทดสอบ** | **ความเข้มข้น** | | |
|---|---|---|---|---|
| | | **0 mg/mL** | **1 mg/mL** | **3 mg/mL** |
| **GHB** | | | | |

| ตัวอย่าง | ก่อนทดสอบ | ความเข้มข้น | | |
|---|---|---|---|---|
| | | 0 mg/mL | 1 mg/mL | 3 mg/mL |
| GBL | | | | |

จากตารางที่ 2 พบว่าในการใช้ชุดทดสอบในการตรวจหาสาร GHB และ GBL ในเครื่องดื่ม เมื่อมีปริมาณของสารที่เติมลงไปสูงขึ้นสีของสารละลายที่ได้จะเห็นเป็นน้ำตาลไปจนถึงม่วง นอกจากนี้ในการทดลองยังมีการทดสอบประสิทธิภาพของชุดทดสอบ (Test kit) โดยการถ่ายภาพสารละลายที่ได้ แล้วนำไปวัดค่าสี RGB ด้วยโปรแกรม ImageJ แล้วพล็อตกราฟหาความสัมพันธ์ของสารตัวอย่างที่ตรวจพบที่ความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่าจากสมการความสัมพันธ์ระหว่างค่าสี RGB กับความเข้มข้นของ GHB หรือ GBL ที่เติมลงไป จะได้ว่าเมื่อนำไปหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่วิเคราะห์ได้ LOD (Limit Of Detection) ได้ดังตารางที่ 3

**ตารางที่ 3** ค่า LOD (Limit Of Detection) ของชุดทดสอบอย่างง่าย

| Analyte | LOD (mg/mL) |
|---|---|
| GHB | 0.47 |
| GBL | 1.05 |

วัตถุประสงค์ที่ 2 ผลการวิจัยพบว่าการศึกษาผลของการรบกวนสีของสารละลายที่จะมีผลต่อการการเกิดสีของสารละลายเมื่อนำมาใช้ในการวิเคราะห์ด้วยชุดทดสอบ(Test kit) กับเครื่องดื่มประเภทต่าง ๆ ทั้ง 10 ชนิด โดยศึกษาสีของเครื่องดื่ม ส่วนผสมต่างๆ เช่น น้ำตาล แก๊ส $CO_2$ ซึ่งผลการทดลองมีการเปรียบเทียบสารละลายก่อนและหลังเติม GHB และ GBL ลงไป ผลที่ได้แสดงดังตารางที่ 4

**ตารางที่ 4** การทดสอบ GHB และ GBL กับเครื่องดื่มประเภทต่าง ๆ ด้วยชุดทดสอบ (Test kit)

| ตัวอย่าง | ก่อนทดสอบ | 0 mg/mL | GHB | GBL |
|---|---|---|---|---|
| | | | 1 mg/mL | 1 mg/mL |
| แอลกอฮอล์ 5% | | | | |
| น้ำโซดา | | | | |
| น้ำอัดลมใสไม่มีสี | | | | |
| น้ำอัดลมสีน้ำตาล | | | | |
| น้ำอัดลมสีส้ม | | | | |
| น้ำอัดลมสีแดง | | | | |

| ตัวอย่าง | ก่อนทดสอบ | 0 mg/mL | GHB | GBL |
|---|---|---|---|---|
| | | | 1 mg/mL | 1 mg/mL |
| น้ำอัดลม สีเขียว | | | | |
| น้ำอัดลม สีม่วง | | | | |
| น้ำชาเขียว | | | | |

จากตารางที่ 4 พบว่าประเภทของเครื่องดื่ม ที่มีส่วนผสมของน้ำตาล และแก๊ส $CO_2$ ที่ละลายในสารละลาย และ สีของสารละลายที่แตกต่างกัน ไม่มีมีผลกับการแสดงสีของสารละลายเมื่อตรวจพบสาร GHB หรือ GBL ที่ 1 mg/mL หรือมี หากในเครื่องดื่มมีสาร GHB หรือ GBL เจือปนอยู่จะสามารถสังเกตเห็นได้ จากสีของสารละลายจะแตกต่างกับสีก่อนที่จะทำการทดสอบ

## อภิปรายผลการวิจัย

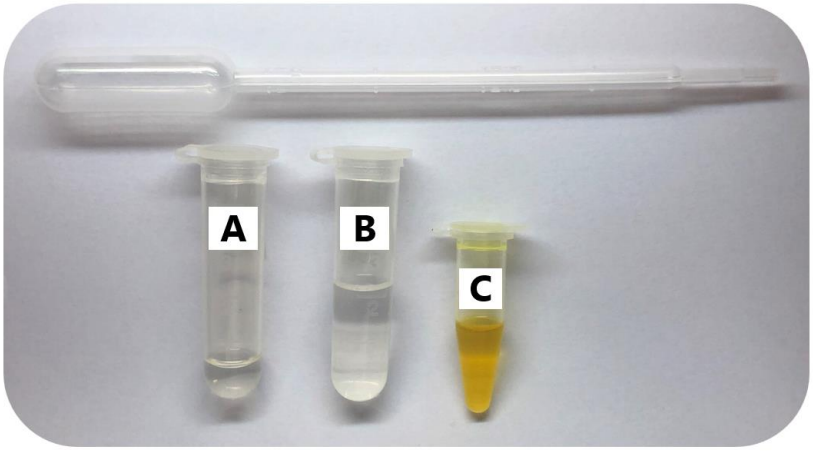
ผลจากการวิจัยวัตถุประสงค์ที่ 1 พบว่าในงานวิจัยนี้จำเป็นต้องใช้ GHB ในการทำการทดลองแต่ไม่สามารถหาซื้อได้เนื่องจากเป็นสารควบคุม จึงได้ศึกษาการเปลี่ยนจาก GBL เป็น GHB ภายใต้สภาวะที่เป็นเบส โดยตรวจสอบค่า pH และเวลาในการเกิดปฏิกิริยา Hydrolysis ซึ่งผลการทดลองที่ได้รับพบว่าสามารถเปลี่ยน GBL เป็น GHB ได้โดยอาศัยการยืนยันจากเทคนิค GC–MS โดยพิจารณาจากการแตกมวลของ mass spectrum โดยการเทียบจากฐานข้อมูลพบว่าสารที่เปลี่ยนโดยใช้ปฏิกิริยา Hydrolysis ได้ผลเป็น GHB จริง ซึ่งการเปลี่ยน GBL เป็น GHB ศึกษาจากงานวิจัยของ Ciolino et al. (2001) และงานวิจัยของ Bodson et al. (2008) ใช้เทคนิค GC–MS ในการตรวจสอบยืนยันว่าเป็นสาร GHB ที่ใช้ในการทดสอบ และในการทำชุดทดสอบใช้ปฏิกิริยา Ferric hydroxamate test โดยผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Alston et

al. (2002) ที่ให้ผลของสารละลายหากพบ GHB และ GBL จะได้สารละลายเป็นสีน้ำตาลอมม่วง หรือสีม่วง ทั้งนี้ความเข้มของสีขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของ GHB หรือ GBL ที่มีอยู่ในเครื่องดื่มตัวอย่าง

ผลจากการวิจัยวัตถุประสงค์ที่ 2 พบว่าในการทดลองใช้ชุดทดสอบตรวจวิเคราะห์สาร GHB และ GBL ในเครื่องดื่มประเภทต่าง ๆ ที่มีส่วนผสมของน้ำตาล แอลกอฮอล์ แก๊ส $CO_2$ และสีที่แตกต่างกันพบว่าเครื่องดื่มที่มีปริมาณ GHB และ GBL ที่เท่ากันให้ผลลัพธ์ของสีน้ำตาลอมม่วงหรือสีม่วงเฉดใกล้เคียงกัน มีความแตกต่างกันเพียงเล็กน้อย ซึ่งไม่ว่าเครื่องดื่มจะมีสีหรือส่วนผสมที่เป็นน้ำตาลหรือก๊าซ ยังคงสามารถตรวจวิเคราะห์ได้ เช่นเดียวกันกับงานวิจัยของ Haller et al. (2006) ที่ได้ศึกษาปริมาณของ GHB และ GBL ที่หลงเหลืออยู่ในปัสสาวะของอาสาสมัครที่ได้รับ GHB หรือ GBL ผ่านการบริโภคร่วมกับเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ โดยใช้เทคนิค GC–MS พบว่าตัวอย่างปัสสาวะที่เก็บหลังจากบริโภคจะมาตรวจวิเคราะห์ได้แม่นยำในระยะเวลาต่ำกว่า 12 ชั่วโมง และไม่มีผลการรบกวนจากสารชีววัตถุต่าง ๆ

## องค์ความรู้ใหม่จากการวิจัย

ผลการวิจัยในครั้งนี้ผู้วิจัยได้พัฒนาชุดทดสอบอย่างง่าย (Test Kit) ในการตรวจวิเคราะห์หาสาร GHB และ GBL ในเครื่องดื่มประเภทต่าง ๆ โดยชุดทดสอบที่ได้มีลักษณะดังภาพที่ 3




**ภาพที่ 4** ชุดทดสอบอย่างง่ายสำหรับตรวจวิเคราะห์หาสาร GHB และ GBL ในเครื่องดื่มประเภทต่าง ๆ

จากภาพที่ 4 ชุดทดสอบจะประกอบไปด้วยหลอดหยดพลาสติกขนาด 1 มิลลิลิตร หลอด A บรรจุสาร 2 M $H_2SO_4$ ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร หลอด B บรรจุสาร 0.5 M $NH_3OHCl$ และ 3 M NaOH ปริมาตรรวม 2 มิลลิลิตร และหลอด C บรรจุ 0.7 M $FeCl_3$ และ 2 M $H_2SO_4$ ปริมาตรรวม 0.5 มิลลิลิตร วิธีการใช้งานทำได้โดย ใช้หลอดหยดพลาสติกดูดเครื่องดื่มตัวอย่างที่คาดว่ามีสาร GHB หรือ GBL ผสมอยู่ ใส่ลงในหลอด A ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นเทสารหลอด B ลงในหลอด A และตามด้วยเทสารจากหลอด C

ลงในหลอด A จากนั้นเขย่าแล้วสังเกตสีที่เกิดขึ้น หากสีของสารละลายที่สังเกตเห็นเป็นสีน้ำตาลอมม่วงไปจนถึงม่วงแสดงว่ามี GHB หรือ GBL

## สรุป

จากการพัฒนาชุดทดสอบอย่างง่ายเพื่อใช้ในการตรวจวิเคราะห์ GHB และ GBL ซึ่งใช้ปฏิกิริยา Ferric hydroxamate test สำหรับการตรวจสอบหมู่ฟังก์ชันเอสเทอร์ มาใช้ในการตรวจสอบหาสาร GHB และ GBL โดยจะเกิดเป็นสารประกอบสีม่วง ซึ่งในการออกแบบชุดทดสอบสอบจะใช้เทคนิค Colorimetric method มาช่วยในการสังเกตการเปลี่ยนแปลงด้วยตาเปล่า ซึ่งจากการทดลองได้อุปกรณ์ทดสอบอย่างง่ายที่มีขนาด และปริมาตรน้อย สะดวกแก่การพกพาออกนอกสถานที่ ใช้สารเคมีทั่วไปในห้องปฏิบัติการ และใช้ปริมาณน้อยไม่สิ้นเปลืองสารเคมี และจากการทดลองทดสอบกับเครื่องดื่มหลายหลายชนิดพบว่าอุปกรณ์ชุดทดสอบที่จัดทำขึ้นสามารถตรวจสอบได้แม้เครื่องดื่มจะมีสีที่แตกต่างกัน มีแอลกอฮอล์ มีน้ำตาลปริมาณแตกต่างกัน หรือมีการอัดแก๊ส $CO_2$ อย่างไรก็ตามยังคงสามารถตรวจสอบหาสาร GHB และ GBL ได้ตามปกติ

## ข้อเสนอแนะ

จากผลการวิจัย ผู้วิจัยมีข้อเสนอแนะ ดังนี้

**1. ข้อเสนอแนะในการนำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์**

ผลจากการวิจัยวัตถุประสงค์ที่ 1 พบว่าในการใช้เทคนิค Colorimetric method มาใช้ในการตรวจสอบหาสาร GHB และ GBL โดยดัดแปลงเป็นชุดทดสอบโดยใช้ปฏิกิริยา Ferric hydroxamate เป็นวิธีที่ง่าย สะดวก และรวดเร็ว เหมาะแก่การนำไปใช้นอกสถานที่ ดังนั้นหากต้องการพกพาหรือนำไปใช้สามารถเตรียมได้ง่าย ด้วยตนเองเนื่องจากเป็นสารทั่วไปที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ

ผลจากการวิจัยวัตถุประสงค์ที่ 2 พบว่าชุดทดสอบอย่างง่ายที่ดัดแปลงความเข้มข้น และปริมาตรมาเพื่อให้สามารถใช้ได้ง่ายและสะดวก สามารถใช้ง่ายได้หลากหลายเหมาะกับเครื่องดื่มหลากหลายประเภท เนื่องจากสีหรือประเภทของเครื่องดื่มไม่ส่งผลกระทบการสีที่เกิดขึ้น

**2. ข้อเสนอแนะในการทำวิจัยครั้งต่อไป**

งานวิจัยนี้ได้ค้นพบความเข้มข้น และปริมาตรของตัวทำปฏิกิริยาของการพัฒนาชุดทดสอบอย่างง่าย หรือที่เรียกว่า Test Kit ที่สำคัญ สามารถนำไปประยุกต์ใช้กับงานทางด้านนิติวิทยาศาสตร์ได้ ซึ่งใช้เป็นอุปกรณ์การตรวจสอบเบื้องต้นสำหรับเจ้าหน้าที่หน่วยงานที่เข้าไปตรวจหากมีการแจ้งเหตุ และมีการสงสัยว่ามีการใช้สาร GHB และ GBL สำหรับประเด็นในการวิจัยครั้งต่อไปควรทำวิจัยในประเด็นเกี่ยวกับการ

พัฒนาชุดทดสอบให้สามารถพกพาง่าย สะดวก เพื่อให้สำหรับบุคคลทั่วไปสามารถนำไปใช้ได้ง่าย และสะดวกต่อการพกพา โดยอาจทำเป็นชุดทดสอบแบบกระดาษ ซึ่งสามารถพกพาและใช้งานได้สะดวก

## กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ “ทุนอุดหนุนการวิจัยโครงการหลักสูตรบัณฑิตศึกษา สาขานิติวิทยาศาสตร์ จากกองทุนพัฒนามหาวิทยาลัยศิลปากรในส่วนของคณะวิทยาศาสตร์ สาขานิติวิทยาศาสตร์” จากคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร สัญญาเลขที่ SC–FS–2564–01

## References

Alston, W.C. & Ng, K. (2002). Rapid colorimetric screening test for gamma–hydroxybutyric acid (liquid X) in human urine, *Forensic Sci Int*, *126*(2), 114–117.

Bangkok Business. (2019). *Warning for toxic drugs (GHB) that is very powerful and can be fatal*. https://www.bangkokbiznews.com/social/847976

Bodson, Q., Denooz, R., Serpe, P., & Charlier, C. (2008). Gamma–hydroxybutyric acid (GHB) measurement by GC–MS in blood, urine and gastric contents, following an acute intoxication in Belgium. *Acta Clin Belg*, 63(3), 200–208. https://doi.org/10.1179/acb.2008.033

Ciolino, L.A., Mesmer, M.Z., Satzger, R.D., Machal, A.C., McCauley, H.A., & Mohrhaus, A.S. (2001). The chemical interconversion of GHB and GBL: forensic issues and implications. *J Forensic Sci*, 46(6), 1315–1323.

Elliott, S. & Burgess, V. (2005). The presence of gamma–hydroxybutyric acid (GHB) and gamma–butyrolactone (GBL) in alcoholic and non–alcoholic beverages, *Forensic Sci Int*, 151(2–3), 289–92. https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2005.02.014

Haller, C., Thai, D., Jacob, P. & Dyer, J.E. (2006). GHB urine concentrations after single–dose administration in humans, *J Anal Toxicol*, 30(6), 360–364.

Kiatburanakul, S. (2016) *Get to know "GHB", a drug that loses a young man, loses a woman.* https://www.rama.mahidol.ac.th/ramachannel/article/รู้จัก–ghb–ยาเสียหนุ่ม–เส/

LeBeau, M.A., Montgomery, M.A., Miller, M.L., & Burmeister, S.G. (2000). Analysis of biofluids for gamma–hydroxybutyrate (GHB) and gamma–butyrolactone (GBL) by headspace GC–FID and GC–MS. *J Anal Toxicol*, 24(6), 421–428.

Mesmer, M.Z., & Satzger, R.D. (1998). Determination of Gamma–Hydroxybutyrate (GHB) and Gamma–Butyrolactone (GBL) by HPLC/UV–VIS Spectrophotometry and HPLC/Thermospray Mass Spectrometry. *Journal of Forensic Sciences*, 43, 489–492.

Musikatavorn, K. (2020, September 24). *Entertainment drugs life threatening.* https://chulalongkornhospital.go.th/kcmh/line/สารเสพติดเพื่อความบันท/

Narcotics Control Division Food and Drug Administration. (n.d.) *Gamma–butyrolactone (GBL) and 1,4 butanediol*. https://mnfda.fda.moph.go.th/narcotic/?p=6211

Rosi, L., Frediani, P. & Bartolucci, G. (2012). Determination of GHB and its precursors (GBL and 1,4–BD) in dietary supplements through the synthesis of their isotopologues and analysis by GC–MS method, *J Pharm Biomed Anal*, 74, 31–38.

Sirisupakritku, N., Muangchum, Y. & Phanburananont B. (2017). Detection of Gamma–butyrolactone (GBL) and 1,4–Butanediol (1,4–BD) in Illegal samples in Thailand. *Journal of Health Science*, *26*(3), 644–653.