การประยุกต์ใช้โฟโตเคมีในการตรวจพิสูจน์ฟลูไนตราซีแพม ในเครื่องดื่มแอลกอฮอล์

Application of Photochemistry on Detection of Flunitrazepam in Alcoholic Drink

ศิรินทิพย์ ผ่องอำไพ

Sirintip Pongampai

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชานิติวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Forensic Science
Prince of Songkla University
2553

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์ การประยุกต์ใช้โฟโตเคมีในการตรวจพิสูจน์ฟลูไนตราซีแพมในเครื่องดื่มแอลกอฮอล์

ผู้เขียน นางสาวศิรินทิพย์ ผ่องอำไพ

สาขาวิชา นิติวิทยาศาสตร์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก **คณะกรรมการสอบ**

…… ……ประธานกรรมการ

(ดร.นรารักษ์ หลีสกุล) (รองศาสตราจารย์ พ.ต.อ.สันต์ สุขวัจน์)

……..……..กรรมการ

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม (ดร.นรารักษ์ หลีสกุล)

……..…… ……..……..……กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.เพริศพิชญ์ คณาธารณา)(รองศาสตราจารย์ ดร.เพริศพิชญ์ คณาธารณา)

…….. .กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชิตชไม โอวาทพารพร)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชานิติวิทยาศาสตร์

...……...

(ศาสตราจารย์ ดร.อมรรัตน์ พงศ์ดารา)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อวิทยานิพนธ์ การประยุกต์ใช้โฟโตเคมี ในการตรวจพิสูจน์ฟลูไนตราซีแพม ในเครื่องดื่มแอลกอฮอล์

ผู้เขียน นางสาวศิรินทิพย์ ผ่องอำไพ

สาขาวิชา นิติวิทยาศาสตร์

ปีการศึกษา 2553

บทคัดย่อ

การตรวจพิสูจน์สารฟลูไนตราซีแพม ที่มีการนำมาใช้ในการก่อคดีอาชญากรรม สามารถวิเคราะห์เบื้องต้นได้ด้วยเทคนิคโฟโตเคมี ซึ่งเป็นเทคนิคที่มีความสะดวก รวดเร็วและประหยัดค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์ โดยการทดสอบคุณสมบัติเชิงแสงที่เปลี่ยนแปลงไปของสารมาตรฐานฟลูไนตราซีแพมและสารฟลูไนตราซีแพมในยาเม็ดโรฮิปนอล ในสารละลายเอทานอลและเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ สามารถแบ่งการวิเคราะห์ตามประเภทของเครื่องดื่มแอลกอฮอล์เป็น 2 ประเภท คือ เครื่องดื่มแอลกอฮอล์ที่มีสีและเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ที่ไม่มีสี โดยการวิเคราะห์ฟลูไนตราซีแพมในเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ที่ไม่มีสี (วอดก้าและเตกีล่าร์) วิเคราะห์จากคุณสมบัติการดูดกลืนแสงและการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์ ที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของสารฟลูไนตราซีแพมเป็นอนุพันธ์สารอะคริโดน (acridone) หลังจากเกิดปฏิกิริยาการเติมโปรตอน (protonation) ด้วยกรดเปอร์คลอริกเข้มข้น 2.0 โมลาร์ ในสารละลายเอทานอล และสารที่ได้หลังจากการโปรโตเนต สามารถเกิดเปล่งแสงขึ้นได้ที่ความยาวคลื่น 477 นาโนเมตร ที่อุณหภูมิห้อง

ในการตรวจพิสูจน์สารฟลูไนตราซีแพมในเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ที่มีสี (มาสเตอร์-เบลนด์ ฮันเดรดไพเพอร์ส และรีเจนซี) ทั้งสารมาตรฐานฟลูไนตราซีแพมและฟลูไนตราซีแพมจากยาเม็ดโรฮิปนอล ทำการศึกษาโดยการวัดการดูดกลืนแสงในช่วงแสงยูวี และช่วงแสงที่มองเห็นได้ หลังจากทำปฏิกิริยาโฟโตคะตะไลซิสโดยมีซิงค์ออกไซด์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา การมีอนุภาคของซิงค์ออกไซด์ในสารละลายฟลูไนตราซีแพม ที่มีแอลกอฮอล์และน้ำเป็นตัวทำละลายและฉายแสงยูวีผ่านสาร พบว่า สารฟลูไนตราซีแพมจะถูกเปลี่ยนไปเป็น 7-อะมิโนฟลูไนตราซี-แพม และปรากฏแถบการดูดกลืนแสงขึ้นที่ความยาวคลื่นใหม่ คือ 345 นาโนเมตร ภายใต้สภาวะการทดลองที่เหมาะสม ได้แก่ อุณหภูมิของการเกิดปฏิกิริยาที่ 80.0 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นของซิงค์ออกไซด์ 0.0080 กรัมต่อมิลลิลิตร และระยะเวลาการฉายแสง 30 นาที โดยเทคนิคทางโฟโตเคมีภายใต้สภาวะที่ใช้ในการทดลองนี้ สามารถตรวจวัดฟลูไนตราซีแพมจากยาเม็ดโรฮิปนอลในเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ ทั้งประเภทไม่มีสีและประเภทที่มีสีที่ความเข้มข้น

ต่ำสุดเท่ากับ 0.30 และ 0.57 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ถึงแม้ว่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ตรวจวัดได้ด้วยเทคนิคนี้จะมีค่าสูงกว่าเทคนิคที่มีความละเอียดอื่นๆ ก็ตาม แต่เคนนี้สามารถนำมาประยุกใช้ในการทดสอบเชิงคุณภาพวิเคราะห์นั้น เทคนิคนี้สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการทดสอบเพื่อตรวจหาสารฟลูไนตราซีแพมที่มีในเครื่องดื่มแอลกอฮอล์เบื้องต้นได้อย่างชัดเจน

Thesis Title	Application of Photochemistry on Detection of Flunitrazepam in Alcoholic Drinks
Author	Miss. Sirintip Pongampai
Major Program	Forensic Science
Academic Year	2010

ABSTRACT

Flunitrazepam, a sleeping pill which is frequently abused in criminal records, can be detected by photochemistry; a comfortable, rapid and cheap technique. The analysis focused on the changing of the optical properties of standard flunitrazepam and flunitrazepam from Rohypnol tablet in ethanol and alcoholic drinks. The analysis was separated into 2 types for colored spirits and colorless spirit. In colorless spirits (Vodka and Tequila), the detection of flunitrazepam was analyzed from the absorption and fluorescent emission of acridone derivative, a protonated product of flunitrazepam. After 2.0 M $HClO_4$ was added to the flunitrazepam solution, the protonated flunitrazepam emitted the fluorescence at 477 nm at room tempertaure.

The detection of flunitrazepam in colored spirits (Master Blend, 100 Pipers and Regency) was carried out via photocatalysis reaction. Zinc oxide was used as the photo-catalyst. The UV-Vis absorption spectroscopy was utilized to detect the standard flunitrazepam and flunitrazepam in Rohypnol tablet in colored spirits. The presence of zinc oxide in flunitrazepam solution was irradiated under UV light. The flunitrazepam was changed to the 7-aminoflunitrazepam. A new absorption band at 345 nm was observed. The optimal conditions of photocatalysis reaction were 80.0 ^{o}C of reaction temperature, 0.0080 $g.mL^{-1}$ of ZnO and 30 minutes of irradiation time. The detection limits of detected flunitrazepam concentrations in coleress and colored spirits were 0.30 and 0.57 $mg.L^{-1}$, respectively. Although the detection limit is higher than that of other effective techniques, photochemistry can be definitely applied to the qualitative screening test of the flunitrazepam in alcoholic drinks.

กิตติกรรมประกาศ

ด้วยความกรุณาจากบุคคลหลายๆ ท่าน และหน่วยงานจากฝ่ายต่างๆ เป็นผลให้รายงานวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงได้ด้วยดี ข้าพเจ้าจึงขอขอบคุณในความกรุณาไว้ ณ ที่นี้ ดังนี้

ขอขอบคุณอาจารย์ที่ปรึกษา ดร.นรารักษ์ หลีสกุล ที่ได้กรุณาให้ความรู้ คำปรึกษาและคำชี้แนะ ตลอดจนความช่วยเหลือในด้านต่างๆ ตลอดระยะเวลาที่ทำวิทยานิพนธ์ และอาจารย์ที่ปรึกษาร่วม รองศาสตราจารย์ ดร.เพริศพิชญ์ คณาธารณา ที่ได้กรุณาให้ความรู้และคำปรึกษาอันเป็นประโยชน์ต่อการทำวิทยานิพนธ์

ขอขอบคุณรองศาสตราจารย์ พ.ต.อ.สันต์ สุขวัจน์ ประธานกรรมการสอบ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชิตชไม โอวาทพารพร กรรมการสอบ ที่กรุณาให้เกียรติและสละเวลาเข้าร่วมการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ รวมถึงคำชี้แนะในการแก้ไขรายงานวิทยานิพนธ์ เพื่อให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณรองศาสตราจารย์ ดร.ฉัตรชนก กะระลัย ที่ได้กรุณาเขียนกลไกปฏิกิริยาเคมีของโครงสร้างโมเลกุล ขอขอบคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ยุทธนา ตันติรุ่งโรจน์ชัย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ประวิทย์ สุดแก้ว ที่ได้กรุณาช่วยสร้างแบบจำลองโครงสร้างและการดูดกลืนแสงทางเคมีคำนวณ อันเป็นประโยชน์ต่อการทำรายงานวิทยานิพนธ์

ขอขอบคุณ ดร.พรสวรรค์ อมรศักดิ์ชัย คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ที่ได้กรุณาอนุญาตให้ใช้โปรแกรม Gaussian 09 software

ขอขอบคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พงศธร อมรพิทักษ์สุข และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุเมธา สุวรรบูรณ์ สำหรับความอนุเคราะห์โลหะออกไซด์ และกล่องฉายแสงอัลตราไวโอเลต ในการทำวิทยานิพนธ์ รวมถึงคำชี้แนะอันเป็นประโยชน์ต่อการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

ขอขอบคุณ ดร.จงดี ธรรมเขต ดร.ชิตนนท์ บูรณชัย ดร.วรากร ลิ่มบุตร และดร.ฐิติมา รุจิราลัย ที่กรุณาให้คำชี้แนะอันเป็นประโยชน์ยิ่งต่อการทำรายงานวิทยานิพนธ์จนกระทั่งวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

ขอขอบคุณสำนักงานนิติวิทยาศาสตร์ตำรวจ กองวิทยาการ 4 วิทยาการเขต 41 ตำบลบ่อยาง อำเภอเมือง จังหวัดสงขลา สำหรับความอนุเคราะห์สารมาตรฐานฟลูไนตราซีแพม

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ สำหรับทุนอุดหนุนการวิจัยเพื่อวิทยานิพนธ์ และคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ สำหรับทุนผู้ช่วยนักวิจัย

ขอขอบคุณภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ และหน่วยเครื่องมือกลาง มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่อนุเคราะห์สถานที่ เครื่องมือ และอุปกรณ์ต่างๆ สำหรับการทำวิจัย

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ประจำหลักสูตรนิติวิทยาศาสตร์และเจ้าหน้าที่ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ทุกท่านเป็นอย่างยิ่ง ที่ได้คอยช่วยเหลือในงานด้านเอกสารต่างๆ

ขอขอบคุณพี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ ภาควิชานิติวิทยาศาสตร์ และภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ทุกท่าน ที่คอยเป็นกำลังใจและให้การสนับสนุนช่วยเหลือในด้านต่างๆ ด้วยดีมาโดยตลอด

และท้ายสุดนี้ข้าพเจ้าขอน้อมรำลึกถึงพระคุณคุณพ่อไพรัตน์ และคุณแม่ศรีนวล ผ่องอำไพ เป็นอย่างยิ่ง ที่ให้ความช่วยเหลือ สนับสนุนและส่งเสริมในทุกๆเรื่อง รวมถึงคอยให้คำปรึกษาและเป็นกำลังใจให้แก่ข้าพเจ้า อย่างดียิ่งเสมอมา จนสำเร็จการศึกษา

ศิรินทิพย์ ผ่องอำไพ

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	(3)
Abstract	(4)
กิตติกรรมประกาศ	(5)
สารบัญ	(8)
รายการตาราง	(11)
รายการภาพประกอบ	(14)
สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ	(18)
บทที่	
1 บทนำ	1
1.1 บทนำต้นเรื่อง	1
1.2 การตรวจเอกสาร	6
1.2.1 ข้อมูลทางเคมี	6
1.2.2 ข้อมูลทางเภสัชวิทยา	8
1.2.3 ความรู้พื้นฐานทางสเปกโทรสโกปี	11
1.2.4 ปฏิกิริยาโฟโตคะตะไลซิส	14
1.2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	16
1.3 วัตถุประสงค์	26
1.4 ขอบเขต	27
2 วิธีการวิจัย	28
2.1 สารและสารเคมี	28
2.2 เครื่องมือและอุปกรณ์	29
2.3 การเตรียมสารละลาย	31
2.4 การวัดการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องยูวี-วิสิเบิลสเปกโทรโฟโตมิเตอร์	31
2.5 การวัดการเปล่งแสงด้วยเครื่องลูมิเนสเซนซ์สเปกโทรโฟโตมิเตอร์	34
2.6 การวิเคราะห์โครงสร้างด้วยเครื่องแมสสเปกโทรมิเตอร์	36
2.7 ขั้นตอนการทดลอง	37
2.7.1 การดูดกลืนแสงของฟลูไนตราซีแพม	37
2.7.1.1 ศึกษาสเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐานฟลูไนตรา-ซีแพม และฟลูไนตราซีแพมจากยาเม็ดโรฮิปนอล	37

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

2.7.1.2 ศึกษาความเสถียรของสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพม 38

2.7.2 การตรวจพิสูจน์ฟลูไนตราซีแพมในเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ประเภทไม่มีสี ไม่มีสีด้วยวิธีการโปรโตเนชัน 39

2.7.2.1 ศึกษาการดูดกลืนแสงและการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์เบื้องต้นของฟลูไนตราซีแพมที่ถูกโปรโตเนต 39

2.7.2.2 ศึกษาชนิดและความเข้มข้นของกรดที่เหมาะสำหรับการตรวจพิสูจน์ฟลูไนตราซีแพม 40

2.7.2.3 ศึกษาความเข้มข้นที่ต่ำสุดของฟลูไนตราซีแพม ที่สามารถทำการตรวจพิสูจน์ได้ด้วยวิธีการโปรโตเนชัน 42

2.7.2.4 การตรวจพิสูจน์ฟลูไนตราซีแพมในเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ประเภทไม่มีสี 42

2.7.3 การตรวจพิสูจน์ฟลูไนตราซีแพมในเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ประเภทมีสี ด้วยปฏิกิริยาโฟโตคะตะไลซิส 43

2.7.3.1 ศึกษาชนิดของโลหะออกไซด์ที่เหมาะสำหรับการวิเคราะห์ 43

2.7.3.2 ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการตรวจพิสูจน์ฟลูไนตราซีแพม ด้วยปฏิกิริยาโฟโตคะตะไลซิส 44

2.7.3.3 ศึกษาระยะเวลาในการฉายแสงอัลตราไวโอเลตที่เหมาะสมต่อการตรวจพิสูจน์ฟลูไนตราซีแพม ด้วยปฏิกิริยาโฟโตคะตะไลซิส 45

2.7.3.4 ศึกษาปริมาณโลหะออกไซด์ต่อผลการตรวจพิสูจน์ฟลูไนตราซี-แพม ด้วยปฏิกิริยาโฟโตคะตะไลซิส 46

2.7.3.5 ศึกษาผลของโลหะออกไซด์และแสงอัลตราไวโอเลตต่อการตรวจพิสูจน์ฟลูไนตราซีแพม ด้วยปฏิกิริยาโฟโตคะตะไลซิส 46

2.7.3.6 ศึกษาความเข้มข้นต่ำสุดของฟลูไนตราซีแพม ที่สามารถตรวจพิสูจน์ได้ด้วยปฏิกิริยาโฟโตคะตะไลซิส 47

2.7.3.7 การตรวจพิสูจน์ฟลูไนตราซีแพมในเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ประเภทมีสี 48

2.7.4 ศึกษาโครงสร้างและการแตกตัวของโครงสร้างสารฟลูไนตราซีแพม 48

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3 ผลการทดลอง	50
3.1 สมบัติทางกายภาพของสารมาตรฐานฟลูไนตราซีแพม และยาเม็ดโรฮิปนอล	50
3.2 ความเสถียรของสารละลายฟลูไนตราซีแพม	56
3.3 การตรวจพิสูจน์ฟลูไนตราซีแพมในเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ประเภทไม่มีสี ด้วยวิธีการโปรโตเนชัน	58
3.4.1 ศึกษาการดูดกลืนแสงและการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซีในเบื้องต้น ของฟลูไนตราซีแพมที่ถูกโปรโตเนต	58
3.4.2 ชนิดของกรดที่เหมาะสำหรับการตรวจพิสูจน์ฟลูไนตราซีแพม	64
3.4.3 ความเข้มข้นของกรดที่เหมาะสำหรับตรวจพิสูจน์ฟลูไนตราซีแพม	70
3.4.4 ศึกษาความเข้มข้นต่ำสุดของฟลูไนตราซีแพมที่สามารถตรวจพิสูจน์ได้	83
3.4.5 การตรวจพิสูจน์ฟลูไนตราซีแพมในเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ ประเภทไม่มีสี	94
3.4 การตรวจพิสูจน์ฟลูไนตราซีแพมในเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ประเภทมีสี	102
3.5.1 ศึกษาชนิดของโลหะออกไซด์ที่เหมาะต่อการตรวจพิสูจน์ฟลูไนตราซีแพม	105
3.5.2 ศึกษาผลของการฉายแสงต่อการตรวจพิสูจน์ฟลูไนตราซีแพม	107
3.5.3 ศึกษาปริมาณของโลหะออกไซด์ อุณหภูมิขณะฉายแสงอัลตราไวโอเลต และเวลาที่เหมาะสมของการฉายแสงอัลตราไวโอเลต เพื่อตรวจพิสูจน์ฟลูไนตราซีแพม	109
3.5.4 การตรวจพิสูจน์ฟลูไนตราซีแพมที่ผ่านปฏิกิริยาคะตะไลซิสด้วยเทคนิคแมสสเปกโทรเมทรี	114
3.5.5 ศึกษาความเข้มข้นต่ำสุดของฟลูไนตราซีแพมที่สามารถตรวจพิสูจน์ได้	117
3.5.6 ศึกษาฟลูไนตราซีแพมในเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ประเภทมีสี	121
4. บทสรุปและการประยุกต์ใช้	125
4.1 บทสรุป	125
4.2 การประยุกต์ใช้ในงานทางด้านนิติวิทยาศาสตร์	127
4.3 ข้อเสนอแนะ	128
บรรณานุกรม	129
ประวัติผู้เขียน	136

รายการตาราง

ตารางที่		หน้า
1	วิธีการสกัดสารในกลุ่มเบนโซไดอะซีพีนและอนุพันธ์ในตัวอย่างต่างๆ	18
2	สภาวะของเครื่องยูวี-วิสิเบิลสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ที่ใช้ในการวิจัย	33
3	สภาวะของเครื่องลูมิเนสเซนซ์สเปกโทรโฟโตมิเตอร์ที่ใช้ในการวิจัย	35
4	ความเข้มข้นสูงสุด คำนวณจากฉลากขวดของกรดแต่ละชนิด	40
5	ค่าการดูดกลืนแสงและพื้นที่ใต้กราฟของสเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพม	53
6	ค่าการดูดกลืนแสงและพื้นที่ใต้กราฟของสเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารละลายฟลูไนตราซีแพมจากยาเม็ดโรฮิปนอล	53
7	ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพม สารละลายยาเม็ดโรฮิปนอลที่ผ่านการสกัดและที่ไม่ผ่านการสกัด	54
8	ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพมและพื้นที่ใต้กราฟของสเปกตรัมการดูดกลืนแสง เมื่อระยะเวลาผ่านไป	57
9	ความยาวคลื่นของสเปกตรัมชนิดต่างๆ ของสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพมเมื่อเติมกรดเปอร์คลอริก	62
10	ค่าการดูดกลืนและพื้นที่ใต้กราฟของสเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพม ที่โปรโตเนตด้วยกรดแต่ละชนิด	65
11	พื้นที่ใต้กราฟของสเปกตรัมการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์ของสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพม ที่ถูกโปรโตเนตด้วยกรดแต่ละชนิด	68
12	ค่าการนำไฟฟ้าของสารละลายกรดแต่ละชนิด	69
13	พื้นที่ใต้กราฟของสเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพมที่ถูกโปรโตเนตด้วยกรดเปอร์คลอริก	71
14	พื้นที่ใต้กราฟของสเปกตรัมการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์ของสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพม ที่ถูกโปรโตเนตด้วยกรดเปอร์คลอริก	72
15	หมู่แทนที่ในโครงสร้างของฟลูไนตราซีแพม หลังจากโปรโตเนตด้วยกรดไฮโดรคลอริกและค่ามวลต่อประจุ	74
16	ค่ามวลต่อประจุของสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพม และสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพม ที่ถูกโปรโตเนตด้วยกรดเปอร์คลอริก	75

รายการตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
17	ค่าการดูดกลืนแสงของที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร ของสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพมและสารละลายฟลูไนตราซีแพมจากยาเม็ดโรฮิปนอล ที่ถูกโปรโตเนตด้วยกรดเปอร์คลอริก	84
18	พื้นที่ใต้กราฟของสเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพมและสารละลายฟลูไนตราซีแพมจากยาเม็ดโรฮิปนอล ที่ถูกโปรโตเนตด้วยกรดเปอร์คลอริก	86
19	ค่าความเข้มการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์ของสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพมและสารละลายฟลูไนตราซีแพมจากยาเม็ดโรฮิปนอล ที่โปรโตเนตด้วยกรดเปอร์คลอริก	90
20	พื้นที่ใต้กราฟของสเปกตรัมการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์ ของสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพม และสารละลายฟลูไนตราซีแพมจากยาเม็ดโรฮิปนอลหลังผ่านการโปรโตเนตด้วยกรดเปอร์คลอริกในตัวทำละลายเอทานอล	92
21	ค่าการดูดกลืนแสงและพื้นที่ใต้กราฟของสเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารละลายฟลูไนตราซีแพมที่มี Vodka หลังโปรโตเนตด้วยกรดเปอร์คลอริก	95
22	ค่าความเข้มและพื้นที่ใต้กราฟของสเปกตรัมการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์ของสารละลายฟลูไนตราซีแพมที่มี Vodka หลังโปรโตเนตด้วยกรดเปอร์คลอริก	96
23	ค่าการดูดกลืนแสงและพื้นที่ใต้กราฟของสเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารละลายฟลูไนตราซีแพมใน Tequila หลังโปรโตเนตด้วยกรดเปอร์คลอริก	98
24	ค่าความเข้มการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์และพื้นที่ใต้กราฟสเปกตรัมการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์ของของสารละลายฟลูไนตราซีแพม ที่มี Tequila หลังโปรโตเนตด้วยกรดเปอร์คลอริก	100
25	ค่าการดูดกลืนแสง และพื้นที่ใต้กราฟของสเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพม หลังผ่านการฉายแสงอัลตราไวโอเลต ที่อุณหภูมิต่าง ๆ	111
26	ค่ามวลต่อประจุของสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพม และสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพม ที่ผ่านการฉายอัลตราไวโอเลต	114
27	ค่าการดูดกลืนแสง และพื้นที่ใต้กราฟของสเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพม หลังฉายแสงอัลตราไวโอเลต	118

รายการตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
28	ค่าการดูดกลืนแสง และพื้นที่ใต้กราฟของสเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารละลายฟลูไนตราซีแพมจากยาเม็ดโรฮิปนอล หลังฉายแสงอัลตราไวโอเลต	119
29	ค่าการดูดกลืนแสงของเครื่องดื่ม และเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ที่มีฟลูไนตราซีแพมหลังฉายแสงอัลตราไวโอเลต	123

รายการภาพประกอบ

รูปที่		หน้า
1	ฟลูไนตราซีแพมรูปแบบเม็ด ในชื่อทางการค้าว่า Rohypnol®	2
2	โครงสร้างโมเลกุลของฟลูไนตราซีแพม	6
3	โครงสร้างของฟลูไนตราซีแพม เมื่อทำปฏิกิริยากับกรด	7
4	โครงสร้างฟลูไนตราซีแพม เมื่อทำปฏิกิริยากับโซเดียมไฮดรอกไซด์	7
5	โครงสร้างทางเคมีของ 5-aryl-1,4-benzodiazepine nucleus	8
6	การแปรรูปของฟลูไนตราซีแพม	10
7	Jablonski diagram	12
8	กลไกการเกิดปฏิกิริยารีดอกซ์ ในปฏิกิริยาโฟโตคะตะไลซิส	15
9	กล่องสำหรับฉายแสงในงานวิจัย	30
10	หลอดทดลองระบบปิด	30
11	องค์ประกอบของเครื่องยูวี – วิสิเบิลสเปกโทรโฟโตมิเตอร์	32
12	เครื่องยูวี-วิสิเบิลสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ รุ่น SPECORD® S100	33
13	องค์ประกอบของเครื่องลูมิเนสเซนซ์สเปกโทรโฟโตมิเตอร์	34
14	เครื่องลูมิเนสเซนซ์สเปกโทรโฟโตมิเตอร์ รุ่นLS 55 PerkinElmer	35
15	องค์ประกอบของเครื่องแมสสเปกโทรมิเตอร์	36
16	สเปกตราการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพม สารละลายยาเม็ดโรฮิปนอลที่ผ่านการสกัด และสารละลายยาเม็ดโรฮิปนอลที่ไม่ผ่านการสกัด	51
17	กราฟมาตรฐานของพื้นที่ใต้กราฟของสเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพมและสารละลายฟลูไนตราซีแพมจากยาเม็ดโรฮิปนอล	53
18	สเปกตราการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพม หลังจากเตรียมสารละลาย 0 5 10 และ 20 วัน	56
19	สเปกตราการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพม สารละลายกรดเปอร์คลอริก และสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพมที่โปรโตเนต	59
20	สเปกตราการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์ของสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพม กรดเปอร์คลอริก และสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพมที่โปรโตเนตด้วยกรดเปอร์คลอริก	59
21	สเปกตราการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์ของสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพมที่ถูกโปรโตเนตด้วยกรดเปอร์คลอริก ที่ความยาวคลื่นกระตุ้นต่างๆ	61

รายการภาพประกอบ (ต่อ)

รูปที่		หน้า
22	สเปกตรา (normalized spectra) การดูดกลืนแสง การกระตุ้นและการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์ของสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพมที่มีการโปรโตเนตด้วยกรดเปอร์คลอริก	63
23	สเปกตราการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพม ที่โปรโตเนตด้วยกรดแต่ละชนิด	64
24	สเปกตราการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์ของสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพมที่ถูกโปรโตเนตด้วยกรดชนิดต่างๆ	66
25	สเปกตราการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพม ที่ถูกโปรโตเนตด้วยกรดเปอร์คลอริก	70
26	แสดงสเปกตราการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนต์ของสารละลายมาตรฐานฟลูไน-ตราซีแพม ที่ถูกโปรโตเนตด้วยกรดเปอร์คลอริก	72
27	โครงสร้างของฟลูไนตราซีแพม หลังการโปรโตเนตด้วยกรดไฮโดรคลอริก	74
28	การแตกตัวของโครงสร้างโมเลกุลของฟลูไนตราซีแพมที่ถูกโปรโตเนตด้วยกรดเปอร์คลอริก	76
29	สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของฟลูไนตราซีแพม	78
30	สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของ 9.10-Dihydroacridin-9-ones	79
31	สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของ benzophenone	80
32	แมสสเปกตรัมของฟลูไนตราซีแพม	81
33	แมสเปกตรัมของฟลูไนตราซีแพมที่ถูกโปรโตเนตด้วยกรดเปอร์คลอริก	82
34	สเปกตราการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพม ที่ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อถูกโปรโตเนตด้วยกรดเปอร์คลอริก	83
35	สเปกตราการดูดกลืนแสงของสารละลายฟลูไนตราซีแพมจากยาเม็ดโรฮิปนอล ที่ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อถูกโปรโตเนตด้วยกรดเปอร์คลอริก	84
36	กราฟมาตรฐานของค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร ของสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพม และสารละลายฟลูไนตราซีแพมจากยาเม็ดโรฮิปนอล เมื่อถูกโปรโตเนตด้วยกรดเปอร์คลอริก	85

รายการภาพประกอบ (ต่อ)

รูปที่		หน้า
37	กราฟมาตรฐานของพื้นที่ใต้กราฟของสเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพม และสารละลายฟลูไนตราซีแพมจากยาเม็ดโรฮิปนอล เมื่อถูกโปรโตเนตด้วยกรดเปอร์คลอริก	87
38	สเปกตราการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์ของสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพม เมื่อโปรโตเนตด้วยกรดเปอร์คลอริก	89
39	สเปกตราการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์ของสารละลายฟลูไนตราซีแพมจากยาเม็ดโรฮิปนอล ที่มีการโปรโตเนตด้วยกรดเปอร์คลอริก	89
40	กราฟความสัมพันธ์ของค่าความเข้มการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์กับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพม และสารละลายฟลูไนตราซีแพมจากยาเม็ดโรฮิปนอล ที่โปรโตเนตด้วยกรดเปอร์คลอริก	91
41	สเปกตราการดูดกลืนแสงของสารละลายฟลูไนตราซีแพมที่มี Vodka ที่ถูกโปรโตเนตด้วยกรดเปอร์คลอริก	94
42	สเปกตราการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์ของสารละลายฟลูไนตราซีแพมที่มี Vodka เมื่อโปรโตเนตด้วยกรดเปอร์คลอริก	96
43	สเปกตราการดูดกลืนแสงของสารละลายฟลูไนตราซีแพม ที่มีTequila หลังโปรโตเนตด้วยกรดเปอร์คลอริก	97
44	สเปกตราการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์ของสารละลายฟลูไนตราซีแพมที่มี Tequila เมื่อโปรโตเนตด้วยกรดเปอร์คลอริก	100
45	สเปกตราการดูดกลืนแสงของเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ประเภทมีสี สารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพม และสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพมที่ถูกโปรโตเนตด้วยกรดเปอร์คลอริก	102
46	สเปกตราการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์ของเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ประเภทมีสี และสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพม ที่โปรโตเนตด้วยกรดเปอร์คลอริก	103
47	สเปกตราการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพม ผงคาร์บอน และฟลูไนตราซีแพมที่เติมผงคาร์บอน	104
48	สเปกตราการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพม สารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพมที่มีซิงค์ออกไซด์ และสารละลายมาตรฐานฟลูไนตรา-ซีแพมที่มีไทเทเนียมไดออกไซด์ หลังฉายแสงอัลตราไวโอเลต	106

รายการภาพประกอบ (ต่อ)

รูปที่		หน้า
49	สเปกตราการดูดกลืนแสงของซิงค์ออกไซด์ สารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพม ที่ฉายแสงอัลตราไวโอเลตและที่ไม่ฉายแสงอัลตราไวโอเลต และสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพมที่มีซิงค์ออกไซด์ ที่ฉายแสงอัลตราไวโอเลตและที่ไม่ฉายแสงอัลตราไวโอเลต	107
50	สเปกตราการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพมที่มีซิงค์ออกไซด์ปริมาณต่างๆ หลังฉายแสงอัลตราไวโอเลต	109
51	สเปกตราการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพมที่มีซิงค์ออกไซด์หลังการฉายแสงอัลตราไวโอเลต ที่อุณหภูมิต่างๆ	111
52	สเปกตราการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพมที่มีซิงค์ออกไซด์หลังฉายแสงอัลตราไวโอเลต ในระยะเวลาที่ต่างกัน	113
53	รูปแบบการแตกตัวของโครงสร้างโมเลกุลของสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพม ที่ผ่านการฉายแสงอัลตราไวโอเลต	115
54	แมสสเปกตรัมของฟลูไนตราซีแพมหลังเกิดปฏิกิริยาโฟโตคะตะไลซิส	116
55	แสดงสเปกตราการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพม หลังการฉายแสงอัลตราไวโอเลต	117
56	สเปกตราการดูดกลืนแสงของสารละลายฟลูไนตราซีแพมจากยาเม็ดโรฮิปนอล หลังการฉายแสงอัลตราไวโอเลต	118
57	กราฟมาตรฐานของระหว่างพื้นที่ใต้กราฟสเปกตรัมการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพม และสารละลายฟลูไนตราซีแพมจากยาเม็ดโรฮิปนอล หลังการฉายแสงอัลตราไวโอเลต	120
58	สเปกตราการดูดกลืนแสงของ MASTER BLEND ที่มีซิงค์ออกไซด์ และ MASTER BLEND ที่มีสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพม และมีการเติมซิงค์ออกไซด์ หลังผ่านการฉายแสงอัลตราไวโอเลต	121
59	สเปกตราการดูดกลืนแสงของเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ และเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ที่มีสารละลายยาเม็ดโรฮิปนอล หลังฉายแสงอัลตราไวโอเลต	123

สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ

ตัวย่อ	ภาษาอังกฤษ	ภาษาไทย
ป.ป.ส.	-	สำนักงานคณะกรรมการป้องกันและปราบปรามยาเสพติด
2,4-DNT	2,4-dinitrotoluene	ไดไนโตรโทลูอีน
A	Absorbance	ค่าการดูดกลืนแสง
b	The path of length (cm)	ความกว้างของเซลล์ที่ให้แสงผ่าน (เซนติเมตร)
B	Magnetic flux density (tasla)	ความเข้มของสนามแม่เหล็ก (เทสลา)
^{o}C	Degree celsius	องศาเซลเซียส
c	Concentration (Mol L^{-1})	ความเข้มข้น (โมลต่อลิตร)
CE	Capillary electrophoresis	แคปิลลารีอิเล็กโทรโฟรีซิส
CH_3COOH	Acetic acid	กรดอะซิติก
cm	Centimeter	เซนติเมตร
CNS	Central nervous system	ระบบประสาทส่วนกลาง
DI water	Deionized water	น้ำปราศจากไอออน
e^4	Electron	อิเล็กตรอน
eV	Electron volts	พลังงานที่ใช้ในการทำให้อิเล็กตรอน 1 ตัว วิ่งผ่านสนามศักย์ไฟฟ้า
GC	Gas chromatography	ก๊าซโครมาโทรกราฟี
h	Plank's constant (6.62×10^{-34} J sec^{-1})	ค่า Plank's constant (6.62×10^{-34} จูลต่อวินาที)
h^+	Hole	โฮล
H^-	Hydrogen ion	ไฮโดรเจนไอออน
H_2O	water	น้ำ
H_2O_2	Hydrogen peroxide	ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์
H_2SO_4	Sulfuric acid	กรดซัลฟิวริก
HCl	Hydrochloric acid	กรดไฮโดรคลอริก
$HClO_4$	Perchloric acid	กรดเปอร์คลอริก
HNO_3	Nitric acid	กรดไนตริก

สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ (ต่อ)

ตัวย่อ	ภาษาอังกฤษ	ภาษาไทย
HPLC	High performance liquid chromatography	การแยกของเหลวสมรรถนะสูง
Hz	Hertz	เฮิร์ตซ์
IC	Internal conversion	กระบวนการลดต่ำของโมเลกุลในระดับชั้นพลังงาน S_2 ไปยัง S_1
ISC	Inter system crossion	กระบวนการสปินกลับของอิเล็กตรอนไปยังระดับพลังงานชั้น triplet state
Int.	Intermediate	สารมัธยันตร์
IS	Internal standard	สารมาตรฐานภายใน
Kcal/mole	Kilocalorie per mole	กิโลแคลอรี่ต่อโมล
LC	Liquid chromatography	เทคนิคการแยกของเหลว
LLE	Liquid-Liquid extraction	การสกัดด้วยตัวทำละลาย
m/z	Mass to charge ratio	ค่ามวลต่อประจุ
MS	Mass spectroscopy	แมสสเปกโทรสโกปี
mg L^{-1}	Milligram per liter	มิลลิกรัมต่อลิตร
mol^{-1} cm^{-1}	Per molar per centimeter	ต่อโมลาร์ ต่อเซนติเมตร
nm	Nanometer	นาโนเมตร
NH_2	Amino group	หมู่อะมิโน
NO_2	Nitro group	หมู่ไนโตร
$O_2^{\bullet -}$	Superoxide anion radical	อนุมูลซุปเปอร์ออกไซด์แอนไอออน
$OH^{\bullet}$	Hydroxyl radical	อนุมูลไฮดรอกซิล
OH^-	Hydroxide ion	ไฮดรอกไซด์ไอออน
OR	Alkoxyl group	หมู่อัลคอกซิล
r	radius	รัศมีความโค้งที่ไอออนเคลื่อนที่ในแนวโค้ง (เซนติเมตร)
S	Singlet state	ระดับชั้นพลังงาน
SPE	Solid phase extraction	การสกัดด้วยตัวดูดซับของแข็ง
T	Triplet state	ระดับชั้นพลังงาน
TiO_2	Titanium dioxide	ไทเทเนียมไดออกไซด์

สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ (ต่อ)

ตัวย่อ	ภาษาอังกฤษ	ภาษาไทย
TLC	Thin-layer chromatography	ทินเลเยอร์โครมาโตกราฟี
V	Potential difference (Volts)	ความต่างศักย์ (โวลต์)
VR	Vibrational relaxation	กระบวนการลดพลังงานในระดับชั้นพลังงาน vibrational ของโมเลกุล
z	Charge (1.602 x 10^{-19} coulomb)	ประจุบนไอออน (1.602 x 10^{-19} คูลอมบ์)
ZnO	Zinc oxide	ซิงค์ออกไซด์
ε	molar absorptivity, (mol^{-1} cm^{-1})	ค่าสัมประสิทธิ์การดูดกลืนแสง (ต่อโมลาร์ ต่อเซนติเมตร)
υ	Frequency	ความถี่ (เฮิร์ตซ์)
λ	wavelength	ความยาวคลื่น
APCI	Atmospheric-pressure chemical ionization	-
FPIA	Fluorescence Polarization Immunoassay	-
IUPAC	The International Union of Pure and Applie Chemistry	-
MTBSTFA	*N*-(*tert*-butyldimethylsilyl)-*N*-methyl-trifluoroacetamide	-
NCI	Negative ion chemical ionization	-
PDA	Photodiode array	-
PFPA	Pentafluoropropionic anhydride	-
TBDMSC	*T* – Butyldimethylsilyl	-

บทที่ 1

บทนำ

1.1 บทนำต้นเรื่อง

เบนโซไดอะซีพีน (benzodiazepine) เป็นกลุ่มยาสงบประสาทและยานอนหลับ (sedative-hypnotic drugs) ที่มีการใช้มากที่สุดในปัจจุบัน (ปิติ ทฤษฎิคุณ, 2538) และหนึ่งในยากลุ่มเบนโซไดอะซีพีน คือ ฟลูไนตราซีแพม (Flunitrazepam) ในประเทศไทย จัดให้สารฟลูไนตราซีแพมเป็นวัตถุที่ออกฤทธิ์ต่อจิตและประสาทประเภท 2 ตามพระราชบัญญัติวัตถุออกฤทธิ์ต่อจิตและประสาท พ.ศ. 2518 โดยกองควบคุมวัตถุเสพติด สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา อนุญาตให้ผู้ประกอบวิชาชีพเวชกรรม ผู้ประกอบโรคศิลปะแผนปัจจุบันชั้นหนึ่งในสาขาทันตกรรม หรือผู้ประกอบการบำบัดโรคสัตว์ชั้นหนึ่ง โดยมีไว้ในครอบครองได้ไม่เกิน 2 กรัม (สำนักงาน ป.ป.ส., 2546) ไม่อนุญาตให้จำหน่ายตามร้านขายยาทั่วไป ฤทธิ์ที่สำคัญของยากลุ่นนี้ ได้แก่ การออกฤทธิ์กดประสาทส่วนกลาง (CNS depressants) ลดอาการวิตกกังวล เป็นยาระงับชัก ยานอนหลับ ยาคลายกล้ามเนื้อ รวมทั้งผลทางด้านจิตประสาท (Elian, 1999; Malanciuc *et al*., 2009)

ด้วยฤทธิ์ของยาที่ทำให้ผู้ที่ได้รับยา เกิดอาการสะลึมสะลือ อ่อนแรง และนอนหลับ ทำให้มีผู้นำยาในกลุ่มนี้ไปใช้ในทางที่ผิดกฎหมาย ก่อให้เกิดปัญหาและเป็นอันตรายต่อสังคม จากรายงานทางนิติวิทยาศาสตร์ พบคดีที่เกี่ยวข้องกับการใช้ยาในกลุ่มเบนโซไดอะซีนอยู่ไม่น้อย ทั้งที่ตรวจจับได้จากผู้เสพเองหรือตรวจพบจากผู้เสียหาย เช่น คดีเกี่ยวกับการล่วงละเมิดทางเพศ (Ohshima, 2006) คดีการปลดทรัพย์ การลักทรัพย์ การใช้เป็นสารเสพติด การเสียชีวิตจากการใช้ยาเพื่อฆ่าตัวตาย รวมถึงกรณีของการขับรถขณะอยู่ภายใต้ฤทธิ์ของยากลุ่มเบนโซไดอะซีพีน (Druid *et al*., 2001) พบว่า ในการนำยาไปใช้มีการใช้ผสมในเครื่องดื่มที่มีแอลกอฮอล์ เพื่อการเสริมฤทธิ์ในการกดประสาทของยาร่วมกับแอลกอฮอล์ ทำให้ยาออกฤทธิ์ได้รุนแรงและนานยิ่งขึ้น จากอดีตจนถึงปัจจุบันยัง พบว่าเกิดคดีที่เกี่ยวข้องกับยากลุ่มนี้อย่างต่อเนื่องและมีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้น ดังนั้น การตรวจพิสูจน์ยากลุ่มเบนโซไดอะซีพีนยังคงมีความสำคัญเป็นอย่างยิ่ง

ฟลูไนตราซีแพมมีการผลิตขึ้นครั้งแรกโดยบริษัทโรช (Roche Pharmaceutical) ประเทศสวิตเซอร์แลนด์ มีชื่อทางการค้าว่า Rohypnol® เป็นการผลิตในรูปแบบของยาเม็ด มีทั้งขนาด 1 และ 2 มิลลิกรัมต่อเม็ด (Schechter, 1998) ฟลูไนตราซีแพมเป็นที่รู้จักกันทั่วไปใน

ชื่อที่หลากหลาย ได้แก่ Roofie, Rophy, Rufino, Roopies, Rope, Circles, Mexican, valium, Rib Roach-2, และ R-2 เป็นต้น

รูปที่ 1 แสดงฟลูไนตราซีแพมรูปแบบเม็ด ในชื่อทางการค้าว่า Rohypnol®

ปริมาณ (Dose) ของฟลูไนตราซีแพม เพื่อรักษาอาการนอนไม่หลับ คือ 0.50 – 1.00 มิลลิกรัม และสูงสุดคือ 2.00 มิลลิกรัม (Ohshima, 2006) ระดับของยาที่ใช้เพื่อการรักษาโดยทั่วไป จะตรวจพบความเข้มข้นของยาในกระแสเลือดประมาณ 22 นาโนกรัมต่อเลือด 1 มิลลิลิตร (Barnett and Broad, 2003) ในกรณีระดับความเข้มข้นของยาสูงๆ อาจใช้เพื่อการรักษาเฉพาะหรือฉุกเฉิน เช่น การระงับอาการคลุ้มคลั่งของผู้ป่วยที่เกิดอาการถอนจากผลของการติดแอลกอฮอล์ (withdrawal) ซึ่งอาจต้องใช้ปริมาณยาในการรักษาค่อนข้างสูง คือ 8 มิลลิกรัม รวมถึงการใช้เป็นยานำสลบก่อนการผ่าตัด (Daderman *et al*., 2003) แต่จากปัญหาที่เกี่ยวกับการเสพติดยาและการนำยาไปใช้ผิดวัตถุประสงค์ ในบางประเทศให้ฟลูไนตราซีแพมเป็นยาในกลุ่มยาอันตราย (Druid *et al.,* 2001) ใช้เพื่อการรักษาเฉพาะทาง (special clinical) ห้ามจำหน่ายตามร้ายขายยาทั่วไป (Mintzer and Griffits, 1998; Daderman and Edman, 2001)

คุณสมบัติของสารฟลูไนตราซีแพม คือ ปราศจากสี กลิ่น และรส (Stark and Wells, 1999; Barnett and Broad, 2003; Malanciuc *et al*., 2009) ออกฤทธิ์เร็วและรุนแรงกว่ายาบางชนิดในกลุ่มเดียวกัน เช่น ออกฤทธิ์แรงกว่าไดอะซีแพม (diazepam) ถึง 10 เท่า ยิ่งขนาดยาที่ใช้สูง การออกฤทธิ์ของยาก็จะเร็วขึ้น (Malanciuc *et al.,* 2009) สามารถออกฤทธิ์ได้ภายใน 30 นาที ถึง 2 ชั่วโมง หลังได้รับยาโดยการรับประทาน (Ohshima, 2006) หรือภายใน 1 – 2 นาที หากได้รับยาโดยการฉีดเข้าเส้นเลือด (Daderman *et al.,* 2003)

ผู้ที่ได้รับฟลูไนตราซีแพมจะมีอาการมึนงง สะลึมสะลือ ร่างกายอ่อนแรง ไม่สามารถควบคุมสติและร่างกาย รวมถึงไม่สามารถจดจำเหตุการณ์หรือยากที่จะนึกถึงเหตุการณ์ที่เกิดขึ้นในขณะที่ยาออกฤทธิ์ได้ เรียกอาการนี้ว่า “anterograde amnesia” หรือการสูญเสียความทรงจำชั่วขณะ (black-outs) อาจเกิดขึ้นหลายชั่วโมงหรือนานเป็นวัน (Schechter, 1998; Daderman *et al.,* 2003; Ohshima, 2006) ทำให้มีการนำยาไปใช้ในทางที่ผิดวัตถุประสงค์และแพร่กระจายไปในหลายๆ ประเทศ เป็นเหตุให้บริษัทผู้ผลิตได้มีการปรับปรุง โดยการเติมสารที่มีสีฟ้าลงในเม็ดยา และทำให้เม็ดยามีการละลายได้ยากในเครื่องดื่ม อาจต้องใช้เวลานานถึง 20 นาที และเมื่อเม็ดยามีการละลาย เครื่องดื่มจะเกิดสีฟ้าที่สามารถสังเกตเห็นได้ (Stark and Wells 1999, Barnett and Broad 2003)

จากการศึกษางานวิจัยที่เกี่ยวข้อง พบว่า ส่วนใหญ่เป็นการตรวจวิเคราะห์อนุพันธ์ของฟลูไนตราซีแพมจากตัวอย่างปัสสาวะและตัวอย่างเลือด ซึ่งการเก็บตัวอย่าง และการสกัดยาออกจากตัวอย่างมีขั้นตอนที่ยุ่งยาก และต้องใช้เครื่องมือขั้นสูงในการวิเคราะห์ เช่น เทคนิคก๊าซโครมาโตกราฟี (Gas Chromatography; GC) หรือก๊าซโครมาโตกราฟีร่วมกับแมสสเปกโทรสโกปี (Gas Chromatography-Mass Spectroscopy; GC-MS) (Rasanen *et al.*, 2000; Yegles *et al.,*1997; Elian, 1999; Hackett and Elian, 2006) เทคนิคการแยกของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography; HPLC) (Mahjoub and Staub, 2001) เป็นต้น เทคนิคเหล่านี้มีความแม่นยำสูงและสามารถวิเคราะห์ความเข้มข้นของสารในระดับที่ต่ำมากๆได้ อย่างไรก็ตาม เครื่องมือเหล่านี้มีราคาสูง ต้องใช้ระยะเวลาในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของเครื่องมือสำหรับการวิเคราะห์ ต้องมีผู้ที่เชี่ยวชาญในการวิเคราะห์ และแปลผลข้อมูล มีค่าใช้จ่ายสำหรับการวิเคราะห์แต่ละครั้งค่อนข้างสูง ดังนั้น หากมีเทคนิคที่สามารถตรวจฟลูไนตราซีแพมจากเครื่องดื่มแอลกอฮอล์เบื้องต้นได้ โดยมีความซับซ้อนของวิธีในการเตรียมตัวอย่างและขั้นตอนในการวิเคราะห์ที่น้อยลง ประหยัดค่าใช้จ่าย และรวดเร็วในการวิเคราะห์ ย่อมเป็นทางเลือกที่มีความน่าสนใจ เทคนิคการวิเคราะห์สมบัติเชิงแสงของสารเป็นอีกหนึ่งเทคนิคที่เหมาะสม เนื่องจากเป็นวิธีการไม่ซับซ้อน รวดเร็ว แม่นยำ สามารถลดค่าใช้จ่ายในการตรวจวิเคราะห์ได้ เมื่อเทียบกับการใช้เทคนิคขั้นสูง เช่น HPLC GC และ MS เป็นต้น

ในปี 1986 Procopio และคณะ ได้เสนองานวิจัยระดับชาติ ตีพิมพ์เป็นภาษาสเปน เป็นการวิเคราะห์การเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์ของฟลูไนตราซีแพมในตัวทำละลายเมทา-นอล หลังการโปรโตเนตด้วยกรดเปอร์คลอริกความเข้มข้น 1.0 โมลาร์ ที่ความยาวคลื่น 470 นาโนเมตร เมื่อกระตุ้นด้วยความยาวคลื่น 305 นาโนเมตร ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส ตรวจวัดฟลูไนตราซีแพมได้ที่ระดับต่ำสุด คือ 15 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร อย่างไรก็ตาม งานวิจัยดังกล่าวยังมีบางปัจจัยที่ผู้ทำการวิจัยไม่ได้ศึกษา เช่น คุณสมบัติเชิงแสงของอนุพันธ์หลังการโปรโตเนต กลไกการเกิดอนุพันธ์หลังการโปรโตเนต และการประยุกต์ในเครื่องดื่มแอลกอฮอล์

ดังนั้น ผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะศึกษาปัจจัยต่างๆ ดังกล่าวข้างต้น และประยุกต์ใช้กับการตรวจหาสารฟลูไนตราซีแพมในเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ชนิดต่างๆ จากแนวทางการวิเคราะห์แสงฟลูออเรสเซนซ์จากฟลูไนตราซีแพมที่ถูกโปรโตเนตด้วยกรดนั้น พบว่ามีความเหมาะสมเฉพาะในเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ที่ไม่มีสีเท่านั้น แต่ไม่สามารถประยุกต์ใช้ในเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ที่มีสีได้ เนื่องจากเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ที่มีสี มีส่วนประกอบที่พบว่าเกิดดูดกลืนแสงและเปล่งแสงฟลูออ-เรสเซนซ์ ในตำแหน่งที่ใกล้เคียงกับการเปล่งแสงแสงฟลูออเรสเซนซ์ของสารฟลูไนตราซีแพมที่ถูกโปรโตเนต โดยมีค่าความสามารถในการดูดกลืนแสงและความเข้มแสงสูงกว่าสารฟลูไนตรา-ซีแพมที่ถูกโปรโตเนต ทำให้ไม่สามารถระบุความแตกต่างของแสงฟลูออเรสเซนซ์ที่เกิดขึ้นได้ จำเป็นต้องศึกษาวิธีการอื่นๆ ที่เหมาะสมกว่า เพื่อจะวิเคราะห์สารฟลูไนตราซีแพมในเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ที่มีสีต่อไป

ในปี 1986 Givens และคณะ ได้เสนองานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการใช้ปฏิกิริยาการเร่งเชิงแสง หรือปฏิกิริยาโฟโตคะตะไลซิส (Photocatalysis Reaction) โดยการฉายแสงอัลตราไวโอเลตแก่สารละลายฟลูไนตราซีแพมในเมทานอล ด้วยความยาวคลื่น 300 นาโนเมตร เกิดเป็นสารอนุพันธ์ 7–aminoflunitrazepam และได้เปรียบเทียบการเกิดอนุพันธ์ของฟลูไน-ตราซีแพมกับการเกิดอนุพันธ์ของ *N*-methyl-*p*-nitroacetanilide ต่อมาในปี 2007 Yuranova และคณะ นำเสนอการสลายคราบไวน์แดงและกาแฟบนผ้าที่เคลือบไทเทเนียมไดออกไซด์ โดยใช้ปฏิกิริยาโฟโตคะตะไลซิส ซึ่งไทเทเนียมไดออกไซด์บนผ้า จะทำหน้าที่เป็นสารกึ่งตัวนำ (semiconductor) เมื่อสารกึ่งตัวนำถูกกระตุ้นด้วยแสงอัลตราไวโอเลต จะเกิดกระบวนการต่างๆ จนนำไปสู่การฟอกสลายคราบบนผ้า นอกจากนี้ ยังพบการประยุกต์ใช้ปฏิกิริยาโฟโต-คะตะไลซิสในงานอีกหลายๆ ด้าน เช่น การสลายสารอินทรีย์ สลายสีย้อม การกำจัดกลิ่นน้ำเสีย การฆ่าเชื้อในแหล่งน้ำหรืออากาศ และการสลายสารปราบศัตรูพืช เป็นต้น จากความสามารถของปฏิกิริยาโฟโตคะตะไลซิส ที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของสารฟลูไนตราซี-แพมและการฟอกสลายสีไวน์และกาแฟ ดังที่ได้มีกล่าวมาแล้วในข้างต้น ทำให้เกิดแนวคิดในการที่จะนำกระบวนการโฟโตคะตะไลซิสมาประยุกต์ใช้ในงานวิจัย เพื่อแก้ปัญหาที่ไม่สามารถตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติเชิงแสงของสารฟลูไนตราซีแพมในเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ประเภทมีสีได้ ที่มีการบดบังการดูดกลืนแสง และการเปล่งแสงของสารฟลูไนตราซีแพมในตำแหน่งที่ต้องการศึกษา ซึ่งเป็นผลจากองค์ประกอบที่ทำให้เกิดสีในเครื่องดื่มแอลกอฮอล์

สำหรับในประเทศไทย การตรวจพิสูจน์สารในกลุ่มเบนโซไดอะซีพีน มีการใช้เทคนิคอื่นๆ ในการตรวจวิเคราะห์ ซึ่งมีค่าใช้จ่าย และระยะเวลาในการตรวจวิเคราะห์แตกต่างกันไปตามเทคนิคที่ใช้ เช่น การตรวจวิเคราะห์สารกลุ่มเบนโซไดอะซีพีนเบื้องต้นในปัสสาวะของศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์สมุทรสงคราม ด้วยชุดทดสอบทางหลักการภูมิคุ้มกันวิทยา (Immunoassay) ค่าใช้จ่ายในการตรวจพิสูจน์ 250 บาทต่อตัวอย่าง หรือการใช้เทคนิค TLC/spectrometry/GC/ HPLC โดยวิเคราะห์จากน้ำล้างกระเพาะครั้งแรก ค่าใช้จ่ายในการ

ตรวจพิสูจน์ 400 บาทต่อตัวอย่าง (ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์สมุทรสงคราม 2544) หรือการส่งตรวจทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ ศูนย์พิษวิทยา คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล ที่มีการรับตรวจสารกลุ่มเบนโซไดอะซีพีนในปัสสาวะ โดยอาศัยหลักการ Fluorescence Polarization Immunoassay (FPIA) ค่าใช้จ่ายในการตรวจวิเคราะห์ 300 บาทต่อตัวอย่าง ผลเป็น positive test เมื่อตรวจพบปริมาณของยาและสารอนุพันธ์มากกว่าหรือเท่ากับ 200 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร การแปลผลในการตรวจเป็นการบ่งชี้ว่ามีการใช้ยาเท่านั้น (คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล 2544) นอกจากการส่งตรวจทางห้องปฏิบัติการแล้ว พบว่ามีการจำหน่ายชุดตรวจเบื้องต้น (Test Kit) โดยใช้หลักการ immunoassay เช่นเดียวกัน เป็นการตรวจการใช้ยาในกลุ่มเบนโซไดอะซีพีนจากยาและอนุพันธ์จากปัสสาวะ ที่ความเข้มข้น 300 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร มีหลากหลายราคา แต่อาจให้ผลเชิงบวกต่อสารประเภทอื่นๆ ที่ไม่ใช่ยากลุ่มเบนโซไดอะซีพีน เช่น แอสไพริน ยาปฏิชีวนะ คลอเฟนิรามีน และวิตามินซี เป็นต้น (http://www.drugtestingworld.com; http://www.amazon.com) จากการตรวจเอกสาร ยังไม่พบว่ามีการตรวจพิสูจน์สารกลุ่มเบนโซไดอะซีพีนในเครื่องดื่มแอลกอฮอล์โดยตรง ซึ่งการใช้ยากลุ่มเบนโซไดอะซีพีนร่วมกับเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ จะทำให้เกิดผลร่วมกันของการกดระบบประสาทส่วนกลาง การกดการทำงานของระบบหายใจ อันเป็นเหตุนำไปสู่อันตรายจนถึงขั้นเสียชีวิตได้ (Miller and Gold, 1995)

การใช้ยาในกลุ่มเบนโซไดอะซีพีน รวมถึงฟลูไนตราซีแพม ผสมในเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ให้แก่ผู้เสียหาย ตามที่ปรากฏเป็นข่าวในคดีอาชญากรรมต่างๆ (ข่าวออนไลน์จากข่าวเกษตร ข่าวสด ทีมข่าวอาชญากรรม และ Mthai) มักเกิดขึ้นเนื่องจากการประสงค์ต่อทรัพย์ การล่วงละเมิดทางเพศ และการก่อคดีอาชญากรรมอื่นๆ เนื่องจากผลที่ทำให้สูญเสียความทรงจำชั่วขณะที่ยาออกฤทธิ์ และจากการค้นความเอกสารอ้างอิง ยังไม่พบการรายงานวิธีการตรวจพิสูจน์ฟลูไนตราซีแพมในเครื่องดื่มแอลกอฮอล์มาก่อน ผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะคิดค้นและนำเสนอวิธีการเพื่อเป็นทางเลือกในการตรวจพิสูจน์สารฟลูไนตราซีแพมในเครื่องดื่ม โดยอาศัยหลักการด้านโฟโตเคมี ได้แก่ การดูดกลืนแสง (Absorption Spectroscopy) การเปล่งแสงของสาร (Luminescence Spectroscopy) ที่เปลี่ยนแปลงไป หลังเกิดปฏิกิริยาโปร-เนชั่นและปฏิกิริยาโฟโตคะตะไลซิส ซึ่งเครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์นั้น หาได้ง่าย ไม่ซับซ้อน ในการตรวจพิสูจน์ฟลูไนตราซีแพมด้วยวิธีการที่ใช้ในการวิจัยนั้น เป็นการวิเคราะห์โดยตรงจากสารฟลูไหนตราซีแพมในตัวอย่าง ซึ่งไม่ได้มีการผ่านกระบวนการเมตาบอลิซึมในร่ายกายก่อนทำการวิเคราะห์ จึงทำให้ประหยัดเวลา และลดความซับซ้อนของการเตรียมตัวอย่าง การวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโฟโตเคมีนั้น ใช้เวลาในการวิเคราะห์และทราบผลได้ภายใน 1 ชั่วโมง โดยประมาณค่าใช้จ่ายจากสารเคมีและหน่วยชั่วโมงของหลอดกำเนิดแสง และหน่วยชั่วโมงของหลอดอัลตราไวโอเลต ประมาณ 50 บาทต่อตัวอย่าง

1.2 การตรวจเอกสาร

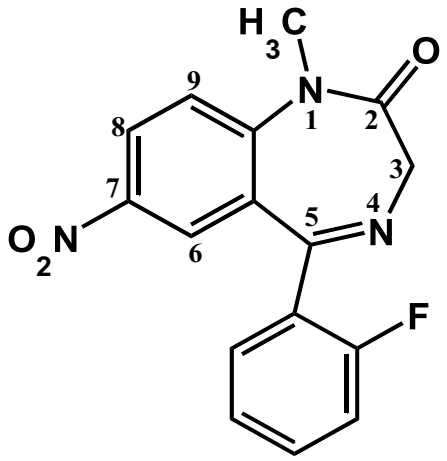
1.2.1 ข้อมูลทางเคมี

ฟลูไนตราซีแพมมีสูตรโมเลกุล (Chemical formula) คือ $C_{16}H_{12}FN_3O_3$ และมีมวลโมเลกุล (Molecular mass) เท่ากับ 313.3

ชื่อทางเคมี (IUPAC name) คือ 5-(2-fluorophenyl)-1,3-dihydro-1-methyl-7-nitro-2H-1,4-benzodiazepine-2-one

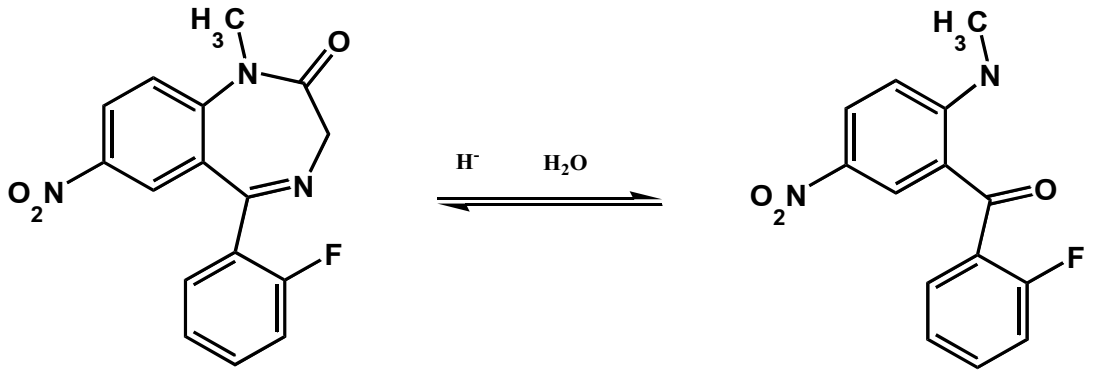
ชื่อทางการค้า (Trade name) คือ Rohypnol®, Nilium®, Hipnosedon®, Hypnodorm®, Flunipam®, Vulbegal®, Silece®, Darkene®, Ilman®, Insom® และ Fluscand®.

ชื่อเรียกโดยทั่วไป (Proprietary names) คือ Roofie, Rophy, Rufinol, Roopies, Rope, Circles, Mexican valium, Rib, Roach-2, R-2, Absint, Darkene, Flunimerck, Flunipam, Flupam, Fluscand, Fluserin, Flutraz, Hypnodorm, Hypnor, Insom, Narcozep, Rohipnol, Rohypnol, Roipnol, Ronal, Somnobene และ valsera



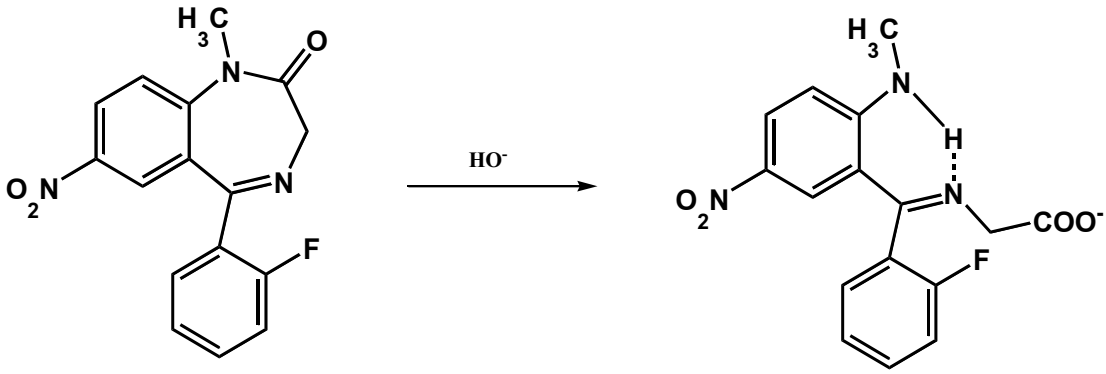
รูปที่ 2 แสดงโครงสร้างโมเลกุลของฟลูไนตราซีแพม

ฟลูไนตราซีแพมมีฤทธิ์เป็นเบสอ่อน จากการมีไนโตรเจน (N) ในตำแหน่งที่ 4 และหมู่เมทิล (methyl) ในตำแหน่งที่ 1 ในโครงสร้างของสาร และผลจากการมีฟลูออรีนในโครงสร้าง ทำให้เกิดการไหลผ่านอิเล็กตรอนของหมู่ฟีนิล ค่า K_p ของฟลูไนตราซีแพมมีค่าเท่ากับ 1.32×10^{-2} การไฮโดรไลซีสจะเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ เมื่อสารละลายมีค่าความเป็นกรด (pH) ต่ำกว่า 1 (รูปที่ 3) และเมื่อสารละลายมีความเป็นกลาง วงแหวนจะปิดกลับอีกครั้ง (Malanciuc *et al.,* 2009)



รูปที่ 3 แสดงโครงสร้างของฟลูไนตราซีแพม เมื่อทำปฏิกิริยากับกรด

เมื่อฟลูไนตราซีแพมในเมทานอล ทำปฏิกิริยากับโซเดียมไฮดรอกไซด์ 8.5 % จะได้อนุพันธ์ที่มีสีเหลืองอ่อน (รูปที่ 4)



อนุพันธ์สีเหลืองอ่อน

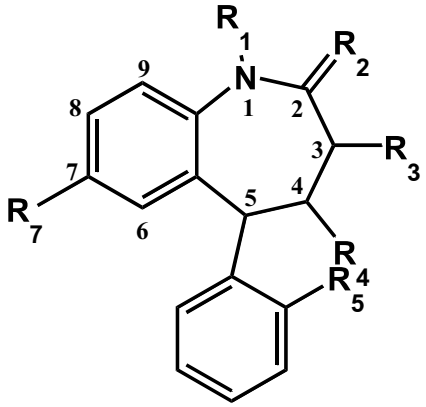
รูปที่ 4 แสดงโครงสร้างฟลูไนตราซีแพม เมื่อทำปฏิกิริยากับโซเดียมไฮดรอกไซด์

ฟลูไนตราซีแพมที่ตกผลึกในตัวทำละลายต่างชนิดกัน พบว่า มีจุดหลอมเหลวที่แตกต่างกัน เช่น ในตัวทำละลายผสมระหว่างไดคลอโรมีเทนและเฮกเซน (dichlorometane – hexane; 1:1) มีจุดหลอมเหลวอยู่ในช่วงอุณหภูมิ 166 – 167 องศาเซลเซียส เมื่อตกผลึกด้วยอะซีโตไนไตรล์ (acetonitrile) และเมทานอล (methanol) ฟลูไนตราซีแพมมีจุดหลอมเหลวอยู่ในช่วงอุณหภูมิ 170 – 172 องศาเซลเซียส ฟลูไนตราซีแพมไม่ละลายน้ำ แต่ละลายในอะซีโตน (acetone) และเอทานอล (ethanol) ในอัตราส่วน 1:172 ละลายในเมทานอล (methanol) ในอัตราส่วน 1:100 ละลายในคลอโรฟอร์ม (chloroform) ในอัตราส่วน 1:3 และละลายในไดเอทิลอีเทอร์ (diethyl ether) ในอัตราส่วน 1:300 และผลการวัดค่ามวลต่อประจุ (m/z) ของสารฟลูไนตราซีแพม เมื่อวิเคราะห์โดยเทคนิคแมสสเปกโทรสโกปี คือ 285 312 313 286 266

238 294 284 ค่าของอนุพันธ์ 7-amino-1-demethyl-flunitrazepam คือ 269 240 241 268 270 107 121 213 ค่าของ 7-amino-flunitrazepam คือ 283 44 255 282 254 284 264 256 และค่าที่วิเคราะห์ของ demethyl-flunitrazepam คือ 298 271 299 224 272 270 252 280 (Malanciuc *et.al*., 2009)

1.2.2 ข้อมูลทางเภสัชวิทยา

จากโครงสร้างพื้นฐานของเบนโซไดอะซีพีน คือ 5-aryl-1,4-benzodiazepine (รูปที่ 5) ซึ่งเป็นส่วนที่มีฤทธิ์ต่อระบบประสาทส่วนกลาง (ปิติ ทฤษฎิคุณ, 2527)



รูปที่ 5 แสดงโครงสร้างทางเคมีของ 5-aryl-1,4-benzodiazepine nucleus

ตำแหน่ง R_7 (รูปที่ 5) ถ้ามีหมู่ที่มีค่าอิเล็กโตรเนกะติวิตี้ (electronegativity) สูง เช่น หมู่ไนโตร (NO_2) หมู่อัลค็อกซิล (OR) หรือหมู่ฮาโลเจน (Halogens) เป็นต้น จะเป็นการเพิ่มฤทธิ์ยาต่อระบบประสาทส่วนกลาง เช่นเดียวกับตำแหน่ง R_5 (รูปที่ 5) ซึ่งไม่มีความจำเป็นต่อการออกฤทธิ์ แต่ถ้ามีหมู่ที่มีค่าอิเล็กโตรเนกะติวิตี้สูง จะเพิ่มการออกฤทธิ์ของยา และถ้าในตำแหน่ง R_7 เป็นหมู่ไนโตร จะทำให้ยามีฤทธิ์ระงับการชัก (anticonvulsant) ยาในกลุ่มเบนโซไดอะซีพีนทุกตัวถูกดูดซึมได้ดีจากทางเดินอาหารและละลายได้ดีในไขมัน สามารถแพร่กระจายไปยังส่วนต่างๆ ของร่างกายได้ดี โดยเฉพาะระบบประสาทส่วนกลาง ซึ่งเป็นตำแหน่งของการออกฤทธิ์ ปฏิกิริยาที่สำคัญในการแปรรูปของยากลุ่มเบนโซไดอะซีพีน คือ ออกซิเดชัน (oxidation) และคอนจูเกชัน (conjugation) ซึ่งเกิดขึ้นที่ตับ สำหรับกลุ่มที่มีหมู่ไนโตรที่ตำแหน่ง R_7 ปฏิกิริยาที่เกิดจะเป็นคอนจูเกชันและถูกขับออกมากับปัสสาวะ บางส่วนถูกขับออกมากับน้ำดีและอุจจาระ (ปิติ ทฤษฎิคุณ, 2527)

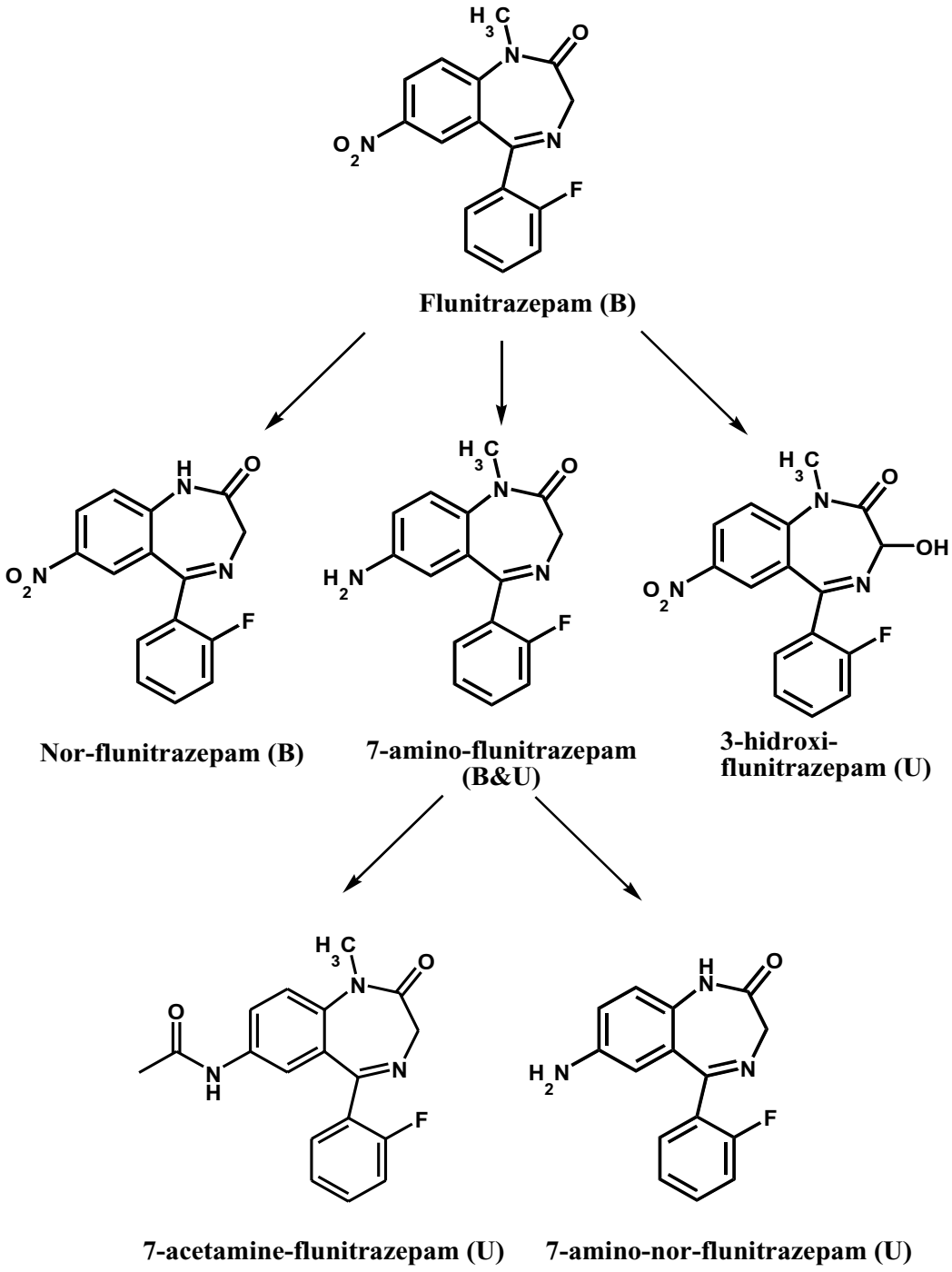
ข้อมูลทางเภสัชวิทยาของฟลูไนตราซีแพมจากเอกสารกำกับยาเม็ดโรฮิปนอล 1 มิลลิกรัม มีดังนี้

(1) การดูดซึม (absorption) เกิดขึ้นภายใน 45 นาทีหลังจากได้รับยา กระบวนการแปรรูป (metabolism) เกิดที่ตับประมาณ 10 – 15% ค่าชีวปริมาณการออกฤทธิ์สัมบูรณ์ (absolute bioavailability) จากการให้ทางหลอดเลือดดำเท่ากับ 70 – 90% โดยปริมาณฟลูไนตราซีแพมในพลาสมาเท่ากับ 6 – 11 นาโนกรัม/มิลลิลิตร ภายในระยะเวลา 0.75 ถึง 2 ชั่วโมงหลังจากรับประทานยาขนาด 1 มิลลิกรัมขณะท้องว่าง หากรับประทานยาหลังอาหาร อัตราการดูดซึมจะลดลงและระยะเวลาของการดูดซึมจะเพิ่มขึ้น การได้รับฟลูไนตราซี-แพมขนาด 2 มิลลิกรัมวันละครั้ง นานติดต่อกัน 3 - 5 วัน ความเข้มข้นต่ำสุดในพลาสมาที่ภาวะคงที่เท่ากับ 3 – 4 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร สารอนุพันธ์ของฟลูไนตราซีแพมที่ออกฤทธิ์ คือ *N*-desmethyl-flunitrazepam มีภาวะคงที่ในพลาสมาเหมือนกับสารหลัก

(2) การกระจาย (distribution) ฟลูไนตราซีแพมกระจายในร่างกายได้รวดเร็ว ปริมาณการกระจายที่ภาวะคงที่ คือ 3 – 5 ลิตร/กิโลกรัม ฟลูไนตราซีแพมที่ถูกดูดซึมจะจับกับพลาสมาโปรตีนได้ถึง 78 – 80% ที่ความเข้มข้นในช่วง 1 – 20 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และส่งผ่านเข้าสู่น้ำไขสันหลังอย่างรวดเร็ว สามารถผ่านทางรกและน้ำนมได้เล็กน้อย ไม่ควรใช้ยาในระยะการตั้งครรภ์ช่วง 3 เดือนสุดท้าย และในช่วงให้นมบุตร

(3) การแปรรูป (metabolism) และการขับออก (elimination) ส่วนใหญ่สารฟลูไนตราซีแพมถูกแปรรูปและขับออกทางไต ในรูปของสารอนุพันธ์ ได้แก่ 7-aminoflunitra-zepam และ *N*-desmethyl-flunitrazepam เป็นส่วนใหญ่ การขับออกในรูปสารตั้งต้นเกิดขึ้นน้อยมาก (น้อยกว่า 2%) ค่าครึ่งชีวิตของฟลูไนตราซีแพมอยู่ที่ 20 - 30 ชั่วโมง สำหรับอนุพันธ์ 7-aminoflunitrazepam และ *N*-desmethyl-flunitrazepam มีค่าครึ่งชีวิตอยู่ที่ 10 – 16 ชั่วโมง และ 23 – 33 ชั่วโมงตามลำดับ พลาสมาเคลียแรนซ์มีค่าเท่ากับ 120 – 140 มิลลิลิตร/นาที สามารถตรวจพบฟลูไนตราซีแพมและอนุพันธ์หลักในปัสสาวะ หลังรับประทานฟลูไนตราซีแพมขนาด 2 มิลลิกรัม ผ่านไปแล้ว 5 – 21 วัน

(4) การดื้อยา (tolerance) เกิดขึ้นได้ในระยะ 2 – 4 สัปดาห์ และสามารถนำไปสู่การเสพติดยา (dependence) ทำให้มีความต้องการปริมาณยาเพิ่มขึ้น ทั้งนี้การเสพติดขึ้นอยู่กับชนิด ขนาด ระยะเวลา และพฤติกรรมการเสพยา การใช้ยาติดต่อกันเป็นเวลานานแล้วหยุดยา จะเกิดอาการถอนยา โดยผู้ป่วยจะรู้สึกหลับไม่สนิท มีอาการอ่อนเพลีย หงุดหงิด ปวดศีรษะ วิตกกังวล กระสับกระส่าย เป็นต้น บางรายอาจมีอาการทางจิต ไม่สนใจโลกภายนอก (cerealization) พฤติกรรมเปลี่ยน (depersonalization) มีความรู้สึกไวต่อเสียง แสง และการสัมผัส มีอาการชาบริเวณปลายมือปลายเท้า เกิดอาการประสาทหลอนหรือชักได้



U = Urine
B = Blood

รูปที่ 6 แสดงการแปรรูปของฟลูไนตราซีแพม (Malanciuc *et al.*, 2009; Mahjoub and Staub, 2001)

1.2.3 ความรู้พื้นฐานทางเทคนิคสเปกโทรสโกปี

เทคนิคสเปกโทรสโกปี (spectroscopy) หมายถึง การแยก การตรวจสอบ และการบันทึกพลังงานที่เปลี่ยนไปของนิวเคลียส อะตอม ไอออน หรือโมเลกุล จากการเปล่ง (emission) การดูดกลืน (absorption) การกระเจิง (scattering) ของการแผ่รังสีแม่เหล็กไฟฟ้า หรืออนุภาค มีการนำเทคนิคสเปกโทรสโกปีไปประยุกต์ใช้ในงานทางด้านเคมี และสาขาอื่นๆ อย่างกว้างขวาง เทคนิคสเปกโทรสโกปี แบ่งออกเป็น 2 ประเภทใหญ่ๆ คือ สเปกโทรสโกปีของการดูดกลืนแสง (absorption spectroscopy) ผลของการดูดกลืนแสง ทำให้โมเลกุลเกิดการเคลื่อนจากระดับพลังงานต่ำไปยังระดับพลังงานที่สูงกว่า และสเปกโทรสโกปีของการเปล่งแสง (emission spectroscopy) เป็นการสูญเสียพลังงานของสสารในรูปแบบของการเปล่งแสง นอกจากนี้ ยังมีสเปกโทรสโกปีรามาน (raman spectroscopy) เป็นการวิเคราะห์แสงกระเจิงที่เกิดจากแสงเลเซอร์ในย่านที่มองเห็น ผ่านไปยังสารตัวอย่างแล้วทำให้เกิดการกระเจิงของแสง

1.2.3.1 อัลตราไวโอเลตและวิสิเบิลสเปกโทรสโกปี (Ultraviolet and Visible Spectroscopy)

เป็นหลักการที่ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณของสาร โดยการวัดปริมาณของแสงในช่วงอัลตราไวโอเลตประมาณ 200-400 นาโนเมตร และช่วงวิสิเบิลประมาณ 400-700 นาโนเมตร (ธีรศักดิ์ โรจนธาราม, 2551) ที่ถูกดูดกลืนด้วยสารตัวอย่าง โดยให้ลำแสงผ่านเข้าไปในสารตัวอย่าง จากนั้นวัดปริมาณของแสงที่ผ่านทะลุออกมา เปรียบเทียบกับปริมาณของแสงจากตัวอย่างที่มีเพียงตัวทำละลายกับสารอื่นๆ ที่ไม่ใช่สารที่ต้องการตรวจหาปริมาณ (blank solution) กฎที่เกี่ยวข้องกับการหาปริมาณของสารจากการดูดกลืนแสง คือ กฎของเบียร์และแลมเบิร์ต (Beer and Lambert's law) โดยมีหลักการที่สำคัญ คือ "ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย จะเป็นปฏิภาคโดยตรงกับความเข้มข้น"

สมการ คือ $A = \varepsilon bc$

เมื่อ A คือ ค่าการดูดกลืนแสง (absorbance)

ε คือ โมลาร์แอบซอร์พติวิตี (molar absorptivity)

b คือ ความกว้างของเซลล์ เป็น ซม.

c คือ ความเข้มข้น เป็น โมล/ลิตร

ε เป็นค่าคงที่ ขึ้นอยู่กับชนิดของสารและความยาวคลื่นที่วัด

หลักในการใช้กฎของเบียร์ที่สำคัญ ได้แก่

(1) แสงที่ใช้ผ่านสารละลายหรือวัตถุจะต้องเป็น monochromatic radiation

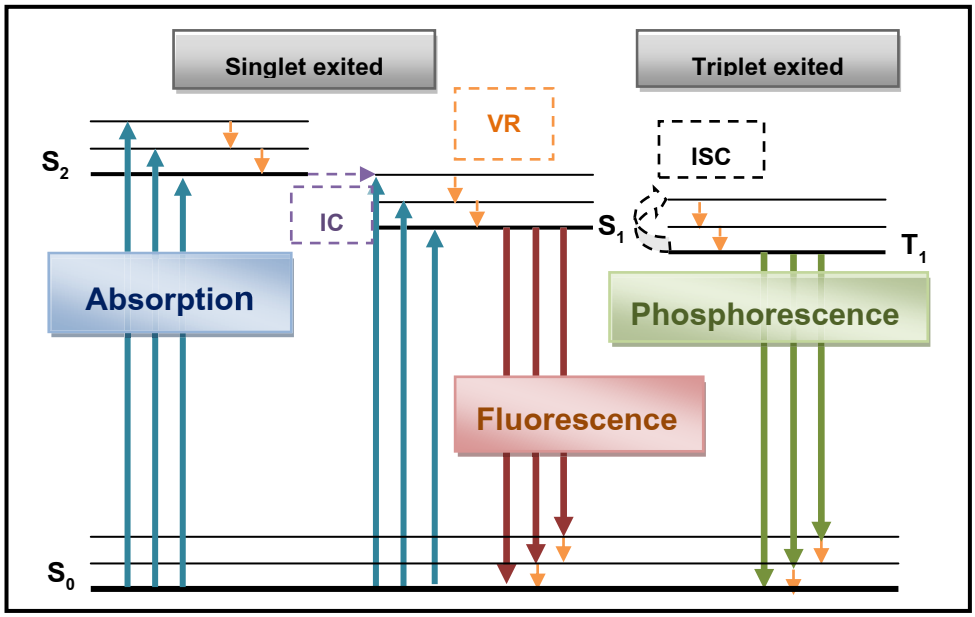
(2) การดูดกลืนแสงของแต่ละอนุภาคนั้นจะต้องไม่ขึ้นแก่กัน คือ สารละลายจะต้องเจือจาง และ

(3) สารละลายที่นำไปวัดจะต้องเป็นสารละลายเนื้อเดียวกัน

กฎของเบียร์ สามารถนำมาใช้ในการวิเคราะห์สารหลายชนิดผสมกัน โดยที่สารแต่ละชนิดมีสมบัติไม่ขึ้นแก่กันและกัน ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ เป็นผลรวมของค่าการดูดกลืนแสงของสารแต่ละชนิด

1.2.3.2 ลูมิเนสเซนซ์สเปกโทรสโกปี (luminescence spectroscopy)

เป็นกระบวนการที่โมเลกุลในสถานะกระตุ้น กลับลงสู่สถานะพื้น (excitation–deexcitation process) โดยมีการดูดกลืนและให้โฟตอนออกมา (รูปที่ 7)



รูปที่ 7 แสดง Jablonski diagram

จากรูปที่ 7 อธิบายกระบวนการที่เกิดขึ้น โดยแบ่งออกเป็น 2 ช่วงที่สำคัญ ดังนี้

(1) กระบวนการกระตุ้น (Excitation) เป็นกระบวนการที่เกิดขึ้น เมื่อโมเลกุลมีการดูดกลืนรังสีจากการแผ่รังสีแม่เหล็กไฟฟ้า แล้วโมเลกุลเกิดการเปลี่ยนระดับพลังงาน จากสถานะพื้น (deexcited state) แทนด้วย S_0 ขึ้นไปอยู่ที่สถานะกระตุ้น (excited state) แทนด้วย S_1 และ S_2

(2) กระบวนการลดระดับพลังงาน (deexcitation) เป็นกระบวนการหลังจากที่โมเลกุลได้ถูกกระตุ้นขึ้นไปสู่สถานะกระตุ้น และกลับมาสู่สถานะพื้น เพื่อให้เกิดความสเถียรของโมเลกุล ในการกลับลงสู่สถานะพื้นของโมเลกุลนั้น มีกลไกหลายขั้นตอน ถ้าโมเลกุลอยู่ในสารละลาย โมเลกุลสามารถลดพลังงานในระดับชั้นพลังงาน vibrational ด้วยการชนกับโมเลกุลของตัวทำละลาย เรียกว่ากระบวนการ Vibrational Relaxation (VR) ผลของการชนกันได้เป็นความร้อนออกมา สำหรับการลดต่ำลงมาของโมเลกุลที่ S_2 จนอยู่ในระดับพลังงานต่ำของ vibrational ซึ่งเป็นระดับเดียวกับระดับพลังงานของ vibrationnal ที่สูงของ S_1 เรียกว่าเกิดกระบวนการ Internal Conversion (IC) กระบวนการ VR และ IC เกิดขึ้นอย่างรวดเร็วโดยไม่มีการแผ่รังสี เมื่อโมเลกุลลดระดับพลังงานลงมา จนถึงระดับพลังงาน S_1 ที่มีพลังงานต่ำจะเกิดการลดระดับพลังงานไปสู่ S_0 โดยมีการให้โฟตอน เรียกว่า ฟลูออเรสเซนซ์ (fluorescence) ระยะเวลาในการเกิดฟลูออเรสเซนซ์ประมาณ 10^{-9} – 10^{-7} วินาที ถ้าระดับพลังงานของโมเลกุลที่ดูดกลืนเข้าไป มีค่าเท่ากับระดับพลังงานที่ปล่อยกลับออกมา จะเรียกว่า “0 – 0 transition” ในบางครั้งโมเลกุลที่อยู่ในสถานะกระตุ้น เกิดการ spin กลับของอิเล็กตรอนหนึ่งตัว ทำให้ค่า multiplicity เป็น 3 โมเลกุลนั้นจะถูกเปลี่ยนไปเป็น triplet state เรียกกระบวนการนี้ว่า Intersystem Crossing (ISC) เมื่อโมเลกุลลดระดับพลังงาน จนกลายเป็น triplet state (T_1) ที่มีพลังงานต่ำและมีการลดระดับพลังงานไปสู่ S_0 จะเกิดการให้โฟตอนที่เรียกว่า ฟอสฟอเรสเซนต์ (phosphorescence) ซึ่งมีระยะเวลานานประมาณ 10^{-6} ถึง 10 วินาที

1.2.3.3 เทคนิคแมสสเปกโทรเมทรี (mass spectrometry)

เป็นเทคนิคทางเคมีวิเคราะห์ที่ได้รับการยอมรับ และนิยมใช้กันอย่างกว้างขวาง เนื่องจากสามารถวิเคราะห์โครงสร้างและมวลโมเลกุลของสารได้ มีความแม่นยำและใช้ปริมาณของสารในการวิเคราะห์น้อยมาก แต่สารตัวอย่างที่ใช้ในการวิเคราะห์จะถูกทำลาย ไม่สามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้

เมื่อสารตัวอย่างถูกเปลี่ยนให้อยู่ในสถานะก๊าซ แล้วถูกยิงด้วยอิเล็กตรอนที่มีพลังงานสูง ทำให้เกิดการชนกันระหว่างอิเล็กตรอนกับไอของโมเลกุล มีผลให้อิเล็กตรอนหลุดออกจากโมเลกุลหนึ่งตัว ได้เป็นไอออนที่มีประจุบวกเรียกว่า ไอออนโมเลกุล (molecular ions; M^+) ไอออนโมเลกุลนี้สามารถเกิดการแตกหักต่อไปเป็นส่วนย่อย (fragment ions) ได้อีก ไอออนบวกทั้งหมดรวมถึงไอออนโมเลกุล จะถูกแยกออกตามอัตราส่วนของมวลต่อประจุ (m/z) และบันทึกเป็นสเปกตรัม เรียกว่า แมสสเปกตรัม (mass spectrum) การบันทึกมวลต่อประจุของไอออนโมเลกุล จะมีค่าเท่ากับมวลโมเลกุลของสารตัวอย่าง การตรวจสอบไอออนที่เกิดขึ้นโดยการรวมรูปแบบการแตกตัว (fragmentation pattern) ของแต่ละไอออนทั้งหมดเข้าด้วยกัน

ซึ่งสารตัวอย่างแต่ละชนิด จะมีรูปแบบการแตกหักที่เป็นเอกลักษณ์ สามารถนำมาแปลผลของสูตรโครงสร้างสารตัวอย่าง

ค่ามวลต่อประจุ สามารถหาได้จากสมการ

$$m/z = B^2 r^2/2V$$

เมื่อ m = มวลของไอออน (กิโลกรัม)

z = ประจุบนไอออน (1.602×10^{-19} คูลอมบ์)

B = ความเข้มของสนามแม่เหล็ก (เทสลา)

r = รัศมีความโค้งที่ไอออนเคลื่อนที่ในแนวโค้ง (เซนติเมตร)

V = ความต่างศักย์เร่งไอออน (โวลต์)

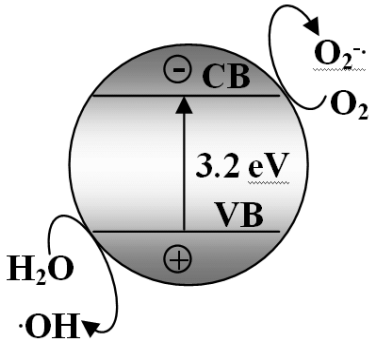
ค่า m/z มีค่ามากตามรัศมีความโค้ง (r) แต่โดยทั่วไปจะนิยมให้รัศมีความโค้งคงที่ ดังนั้นไอออนที่มี m/z ถูกต้องเท่านั้นที่จะวิ่งไปตามแนวโค้งที่คงที่ เพื่อไปยังเครื่องวัดสัญญาณ หากต้องการให้ไอออนทุกตัวที่เกิดขึ้นถูกตรวจวัดได้ สามารถทำได้โดยเปลี่ยนความเข้มสนามแม่เหล็ก (B) และให้ศักย์ที่ใช้เร่ง (V) คงที่ หรือเปลี่ยนศักย์ที่ใช้เร่งและให้ความเข้มสนามแม่เหล็กคงที่ วิธีการทั้ง 2 นี้จะทำให้ไอออนที่มี m/z ต่างกัน วิ่งเข้าสู่เครื่องวัดสัญญาณในรัศมีความโค้งคงที่

1.2.4 ปฏิกิริยาโฟโตคะตะไลซิส (Photocatalysis Reaction)

เป็นกระบวนการเร่งปฏิกิริยาของสารกึ่งตัวนำ (semiconductor material) โดยการดูดกลืนพลังงานในรูปของโฟตอน (photon energy) จากแสง ซึ่งมีพลังงานที่เทียบเท่าหรือมากกว่าพลังงานของช่องว่างระหว่างแถบพลังงาน (band gap) อิเล็กตรอนในแถบวาเลนซ์ (valance band) ที่ได้รับพลังงานเพียงพอ จะเคลื่อนที่ไปอยู่ในแถบการนำไฟฟ้า (conduction band) การเคลื่อนที่ของอิเล็กตรอน ทำให้เกิดภาวะขาดอิเล็กตรอน หรือ โฮล (hole; h^+) ในแถบวาเลนซ์ขึ้น (http://sichon.wu.ac.th) อิเล็กตรอนและโฮลที่หลุดแยกจากกัน สามารถที่จะกลับมาจับกันและให้พลังงานในรูปความร้อนได้ (Evgenidou *et al.,* 2005)

สิ่งจำเป็นเบื้องต้นสำหรับการทำงานของตัวกระตุ้นเชิงแสง คือ ปฏิกิริยารีดอกซ์ (rodox potential) ที่จะเปลี่ยนไฮโดรเจนและออกซิเจนจากน้ำ ให้อยู่ในรูปที่สามารถทำปฏิกิริยาได้ นั่นคือ ไฮดรอกซิลเรดิคอล (Hydroxyl radicals; $OH^{\bullet}$) ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Hydrogen peroxide; H_2O_2) และซุปเปอร์ออกไซด์ (superoxide anion radical; $O_2^{\bullet -}$) เกิดขึ้นในช่องว่างระหว่างแถบ พลังงานของสารกึ่งตัวนำ (รูปที่ 8) สารกึ่งตัวนำที่มีการใช้กันอย่าง

กว้างขวาง คือ ซิงค์ออกไซด์ (zinc oxide; ZnO) และไทเทเนียมไดออกไซด์ (titanium dioxide; TiO_2) ทั้ง 2 มีค่าศักย์ไฟฟ้าที่เหมือนกัน คือ 3.2 eV สามารถให้อิเล็กตรอนและโฮล ซึ่งมีประสิทธิภาพสูงในการออกซิไดซ์หรือรีดิวซ์สาร (Rehman *et al.*, 2009)



รูปที่ 8 แสดงกลไกการเกิดปฏิกิริยารีดอกซ์ ในปฏิกิริยาโฟโตคะตะไลซิส

จากรูปที่ 8 อธิบายกลไกการเกิดปฏิกิริยารีดอกซ์ ในปฏิกิริยาโฟโตคะตะไลซิส ได้ดังนี้ เมื่อสารกึ่งตัวนำได้รับพลังงานจากการฉายแสง ($h\upsilon$ <380 nm) อิเล็กตรอน (electron; e^-) ที่ผิวหน้าจะถูกกระตุ้นและเคลื่อนที่ไปยังแถบนำไฟฟ้า ทำให้เกิดโฮล (hole; h^+) (ในแถบวาเลนซ์) และอิเล็กตรอน (ในแถบนำไฟฟ้า) (สมการที่ 1) โดยอิเล็กตรอนและโฮลสามารถกลับมาจับกันได้อีก โดยปลดปล่อยพลังงานในรูปความร้อนออกมา (สมการที่ 2)

$$TiO_2 \text{ or } ZnO + h\upsilon\,(<380\text{ nm}) \longrightarrow h^+ + e^4 \quad \text{-(1)}$$

$$h^+ + e^4 \longrightarrow \text{heat} \quad \text{-(2)}$$

เมื่อออกซิเจนสัมผัสกับอิเล็กตรอนที่อยู่แถบนำไฟฟ้า จะถูกรีดิวซ์ (reduce) อิเล็กตรอน ทำให้อยู่ในรูปของซุปเปอร์ออกไซด์เรดิคอล (superoxide anion; $O_2^{\bullet -}$) (สมการที่ 3) ขณะที่โฮลในแถบวาเลนซ์ จะเกิดการออกซิไดซ์น้ำหรือไฮดรอกไซด์ไอออน (hydroxide ion; OH^-) กลายเป็นไฮดรอกซิลเรดิคอล (hydroxyl radical; $OH^{\bullet}$) (สมการที่ 4 และ 5)

$$e^4 + O_2 \longrightarrow O_2^{\bullet -} \quad \text{-(3)}$$

$$h^+ + H_2O \longrightarrow H^+ + OH^{\bullet} \quad \text{-(4)}$$

$$h^+ + OH^- \longrightarrow OH^{\bullet} \quad \text{-(5)}$$

ไฮดรอกซิลเรดิคอล สามารถทำปฏิกิริยาออกซิเดชันที่รุนแรงกับสารอินทรีย์ (สมการที่ 6 และ7)

$$OH^{\bullet} + R \longrightarrow H_2O + R^{\bullet} \quad \text{-(6)}$$

$$R^{\bullet} + O_2 \longrightarrow ROO^{\bullet} \longrightarrow \text{Int.} \longrightarrow P \quad \text{-(7)}$$

เมื่อ R = สารอินทรีย์ $R^{\bullet}$ = สารอินทรีย์ในรูปของเรดิคอล $ROO^{\bullet}$ = สารอินทรีย์ในรูปของซุปเปอร์ออกไซด์เรดิคอล Int.= สารตัวกลาง และ P = ผลิตภัณฑ์ที่ได้หลังเกิดปฏิกิริยาโฟโตคะตะไลซิส

1.2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การวิเคราะห์ฟลูไนตราซีแพมและอนุพันธ์ พบว่า ได้มีการศึกษาและวิเคราะห์จากตัวอย่างในหลายๆ รูปแบบ เช่น ตัวอย่างเลือดและคราบเลือด ปัสสาวะ เส้นผม สารคัด-หลั่ง และเครื่องดื่ม เป็นต้น วิธีการที่ใช้เพื่อสกัดสารและอนุพันธ์ของสารจากตัวอย่าง เทคนิคและวิธีการในการวิเคราะห์ เครื่องมือที่ใช้สำหรับวิเคราะห์นั้น พบว่ามีความแตกต่างกันไปตามความเหมาะสมและชนิดของตัวอย่าง

1.2.5.1 ตัวอย่างกรณีที่เกี่ยวข้องกับฟลูไนตราซีแพม

ฟลูไนตราซีแพม เป็นสารที่ออกฤทธิ์ต่อจิตประสาท ซึ่งอาจถูกนำมาใช้เพื่อลดพฤติกรรม หรือสติของเหยื่อหรือผู้เสพ ในการใช้ยา อาจมีการผสมในเครื่องดื่มแอลกอฮอล์หรือร่วมกับสารอื่นที่ให้ผลสอดคล้องกัน เช่น ยาอื่นๆ ในกลุ่มเบนโซไดอะซีพีน บางครั้งเหยื่ออาจได้รับสารที่ออกฤทธิ์กดประสาทควบคู่กับเครื่องดื่มอื่นๆ ที่ไม่ใช่เครื่องดื่มแอลกอฮอล์ เช่น ช็อคโกแลตร้อน น้ำส้ม เป็นต้น โดยทั่วไปเหยื่อมักจะเป็นผู้หญิงในช่วงอายุ 18 – 29 ปี และจากรายงานของ Stark และ Wells (1999) พบว่า มีการใช้ฟลูไนตราซีแพมเพื่อการล่วงละเมิดทางเพศ หรือประสงค์ต่อทรัพย์ เกิดขึ้นเป็นจำนวนมาก ทางบริษัทผู้ผลิตยาจึงได้มีการพัฒนาให้ตัวยามีการละลายที่ยากขึ้น และสังเกตเห็นสีฟ้าได้เมื่อมีการละลายของยา อย่างไรก็ตามยาที่มีรูปแบบเดิม ยังคงมีขายอยู่ในบางประเทศ ซึ่งเมื่อละลายแล้วจะไม่มีทั้งสี กลิ่น และรสชาด

ตัวอย่างคดีอาชญากรรมที่มีการใช้ฟลูไนตราซีแพม มีด้วยกันหลายกรณี เช่น ชายชาวอังกฤษผู้หนึ่ง อายุ 32 ปี ถูกเพื่อนบ้านชายที่อาศัยร่วมตึกเดียวกันเชิญไปที่ห้อง ในเวลา 10.15 น. จากนั้นเพื่อนบ้านได้เสริฟชาให้กับเขา หลังจากดื่มชา เขาเริ่มมีอาการวิงเวียนและมึนงง เพื่อนบ้านยังเสริฟไวน์ให้กับเขา แต่เขาปฏิเสธ เพื่อนบ้านจึงนำยาสีขาวเม็ดเล็กๆ มาให้ โดยอ้างว่าช่วยให้หายปวดศีรษะ ประมาณ 10 ชั่วโมงต่อมา เขาพบว่าตนเองอยู่ที่สถานีตำรวจ ในขณะเกิดเหตุ เพื่อนสาวของชายชาวอังกฤษได้กลับมาที่ห้อง และพบว่าประตูห้องนอนถูกเปิดไว้ โดยคอมพิวเตอร์ยังเปิดเครื่อง กระเป๋าเงิน และโทรศัพท์เคลื่อนที่ถูกวางทิ้งไว้ในห้อง เธอได้ยินเสียงดังมาจากห้องเพื่อนบ้าน จากนั้นเธอก็เห็นชายชาวอังกฤษคนนั้นลงมาจากชั้นบนด้วยท่าทางที่ผิดเป็นปกติ เธอจึงโทรศัพท์เรียกรถพยาบาล ผลการตรวจคลื่นสมองและร่างกายเป็นปกติ ต่อมาเขาได้เข้าแจ้งความในเวลา 19.32 น. ของวันเดียวกัน โดยเขาสันนิษฐานว่าตนเองถูกวางยา จึงได้มีการเก็บตัวอย่างเลือด (ประมาณ 9 ชั่วโมงหลังจากได้รับยา) ผลการตรวจพบว่ามีสารฟลูไนตราซีแพมความเข้มข้น 22 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรใน

เลือด และพบโซฟิคลอนความเข้มข้น 15 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรในเลือด ซึ่งถือว่าเป็นระดับปกติของการรักษา แต่ไม่พบแอลกอฮอล์ ยาสำหรับการรักษา หรือยากดประสาทชนิดอื่นๆ รวมถึงยากลุ่มไอบูโพรเฟน จากนั้นอีก 11 วัน เพื่อนบ้านของเขาได้ถูกจับในข้อหาวางยา ซึ่งเพื่อนบ้านคนดังกล่าวได้ให้การปฏิเสธและอ้างว่ายาที่ให้ชายชาวอังกฤษรับประทานนั้น เป็นยาระงับการอักเสบประเภทไม่มีสเตอรอยด์เท่านั้น ต่อมาเพื่อนบ้านได้ประกันตัวเอง และหลบหนีไปประเทศอิยิปต์พร้อมด้วยภรรยา ฟลูไนตราซีแพมที่ใช้ในอังกฤษโดยทั่วไป พบว่ามีลักษณะเป็นยาเม็ดสีฟ้าเคลือบด้วยสีเขียวเข้ม ไม่พบว่ามีการจำหน่ายยาเม็ดสีขาวที่เคลือบสีม่วงตั้งแต่ปี 1998 แต่ยังสามารถพบฟลูไนตราซีแพมรูปแบบยาเม็ดสีขาวในบางประเทศ จากลักษณะที่แตกต่างกันของเม็ดยา ทำให้สันนิษฐานถึงแหล่งที่มาของยาได้ (Barnett and Broad, 2003)

อีกคดีหนึ่ง เป็นการฟ้องร้องของหญิงสาวต่อเพื่อนชายซึ่งทำงานร่วมกัน ซึ่งเหตุการณ์เกิดขึ้นในงานสังสรรค์ โดยเธออ้างว่า มีการผสมฟลูไนตราซีแพม ขนาด 1 มิลลิกรัม ในเครื่องดื่ม (soft drink) ของเธอ ขณะที่เธอไปเข้าห้องน้ำ เมื่อกลับมา เธอได้ดื่มเครื่องดื่มโดยไม่ได้สังเกตความเปลี่ยนแปลงของเครื่องดื่ม จากนั้นประมาณ 40 นาที หลังจากที่ดื่มไปประมาณครึ่งแก้ว เธอรู้สึกว่ามีอาการตัวร้อนขึ้นมาทันทีและหมดสติไป เธอจดจำสิ่งต่างๆ ที่เกิดขึ้นไม่ได้ เป็นระยะเวลาประมาณ 4.5 ชั่วโมง รวมถึงเหตุการณ์ที่ถูกข่มขืน จากนั้น 2.5 ชั่วโมงต่อมา จึงเริ่มมีสติ รวมระยะเวลาที่เธอสูญเสียความทรงจำประมาณ 7 ชั่วโมง วันต่อมาเมื่อเธอรู้สึกดีขึ้น พบว่าไม่สามารถรื้อฟื้นความทรงจำในช่วง 19 ชั่วโมงหลังการดื่มในวันเกิดเหตุได้ เธอจึงไปขอคำปรึกษาจากทางโรงพยาบาล และได้มีการตรวจปัสสาวะของเธอ (ประมาณ 24 ชั่วโมงหลังจากการดื่มในงานสังสรรค์) ผลตรวจพบอะมิโนฟลูไนตราซีแพม ซึ่งเป็นอนุพันธ์หลักของฟลูไนตราซีแพม เธอจึงได้เข้าการแจ้งความและฟ้องร้องเพื่อนร่วมงานที่ต้องสงสัยในวันเกิดเหตุ (Ohshima, 2006)

1.2.5.2 การสกัดสารในกลุ่มเบนโซไดอะซีพีน (The Extraction method)

เนื่องจากการตรวจวิเคราะห์สารฟลูไนตราซีแพม หรือสารกลุ่มเบนโซไดอะซีพีน ซึ่งอยู่ในตัวอย่างที่หลากหลาย ในบางตัวอย่างไม่สามารถทำการวิเคราะห์จากตัวอย่างโดยตรง จำเป็นต้องทำการสกัดแยกสารที่ต้องการตรวจวิเคราะห์ออกจากตัวอย่าง และจัดเตรียมให้อยู่ในสภาวะที่เหมาะสมต่อการนำไปตรวจวิเคราะห์ต่อไป จากชนิดของตัวอย่าง และวิธีการที่ใช้สำหรับการตรวจวิเคราะห์สารฟลูไนตราซีแพม หรือสารในกลุ่มเบนโซไดอะพีนที่แตกต่างกันนั้น ทำให้เทคนิคในการสกัดสารและอนุพันธ์ของสารแตกต่างกันออกไป

ตารางที่ 1 แสดงวิธีการสกัดสารในกลุ่มเบนโซไดอะซีพีนและอนุพันธ์ในตัวอย่างต่างๆ

ตัวอย่าง	ผู้วิจัย	วิธีการ
เส้นผม	Yegles *et al.,* (1997)	นำเส้นผมมาทำความสะอาด โดยแช่ในน้ำอุ่น 5 นาที และ acetone 2 ครั้ง ครั้งละ 1 นาที ตัดเป็นชิ้นยาวประมาณ 3 ซม. เตรียมตัวอย่างหนัก 3.050 มก. เติม acetate buffer (pH=4) ปริมาตร 2 มล. และเติม β-glucuronidase/arylsulfatase 0.070 มล. ให้ความร้อน 40 °ซ. นาน 2 ชั่วโมง แล้วหมุนเหวี่ยงแยกเอาเฉพาะ supernatant มาเติมด้วยน้ำกลั่น 2 มล. นำไปหมุนเหวี่ยงอีกครั้ง แล้วแยก supernatant ไปสกัดด้วย chromabond C18 ระบบ Vac-Elut® โดยใช้ methanol และน้ำกลั่น 6 และ 3 มล. ตามลำดับ ล้างคอลัมน์ด้วยน้ำ 3 มล. ตามด้วย 0.6 M sodium carbonate 3 มล. และน้ำกลั่น 3 มล. จากนั้นชะสารด้วย acetone/dichloromethane (3:1) 2 มล. แล้วระเหยด้วยไอไนโตรเจนที่อุณหภูมิ 40 °ซ.
	Cirimele *et al.,* (1997)	ทำความสะอาดเส้นผม โดยแช่ใน methylene chloride 10 มล. 2 ครั้ง ตามด้วยน้ำ 10 มล. และ methanol 10 มล. จากนั้นบดด้วย Retsch MM2-type ball mill นำผงผมมา 50 มก. เติมด้วย phosphate buffer (pH 7.6) 1 มล. มี diazepam,d_5 20 นาโนกรัม เป็น internal standard สกัดด้วย diethyl ether/chloroform (80:20, v/v) เขย่า 20 นาที 100 รอบ/นาที แล้วหมุนเหวี่ยง 4000 รอบ/นาที นาน 15 นาที นำชั้นตัวทำละลายไประเหย ละลายส่วนที่เหลือด้วย heptafluorobutyric anhydride/ethyl acetate (2:1, v/v) ที่อุณหภูมิ 60 °ซ. นาน 30 นาที นำตัวอย่างไประเหยแห้งอีกครั้ง แล้วละลายด้วย ethylacetate 0.025 มล.
เลือดและคราบเลือด	Elian (1999)	เทคนิค solid phase extraction แบบคอลัมน์ เตรียมคอลัมน์โดยใช้ methanol 3 มล. DI water 3 มล. และ 100 mM acetic acid 1 มล. จากนั้นนำตัวอย่างเข้าสู่คอลัมน์ แล้วล้างคอลัมน์ด้วย DI water 3 มล.

ตารางที่ 1(ต่อ)

ตัวอย่าง	ผู้วิจัย	วิธีการ
เลือดและคราบเลือด	Elian (1999) (ต่อ)	Acetic acid 1 มล. และ methanol 3 มล. ปล่อยทิ้งไว้ให้คอลัมน์แห้ง 5 นาที จึงชะตัวอย่างด้วย methylene chloride / isopropyl alcohol / ammonium hydroxide (78/20/2) 3 มล. ระเหยตัวทำละลายด้วยไอไนโตรเจน จากนั้นเติม pentafluoropropionic anhydride 0.1 มล. ลงในส่วนที่ได้จากการระเหยตัวทำละลาย โดยให้ความร้อน 70 °ซ. 20 นาที ทิ้งให้ตัวอย่างเย็น นำไประเหยตัวทำละลายที่ 70 °ซ. ภายใต้ไอไนโตรเจน แล้วนำมาเติมด้วย MTBSTFA (with 1% TBDMSCl) 0.05 มล. ให้ความร้อน 70 °ซ. นาน 20 นาที
	Kollroser and Schober (2002)	ใช้ตัวอย่าง 1 มล. เติม orthophosphoric acid 0.020 มล. และ flunitrazepam-d_7 (1 มก./ล.) 0.040 มล. เป็น internal standard นำตัวอย่างไปผ่าน Oasis® MCX cartridges อัตราการไหล 1 มล.ต่อนาที ล้างคอลัมน์ด้วย hydrochlo-ric acid 1 มล. และ methanol 1 มล. ชะสารด้วย methylene chloride/isopropanol/ammo-nia (78:20:2) นำตัวอย่างไประเหยที่อุณหภูมิ 35. °ซ. ภายใต้ไอของไนโตรเจน
	Rasanen *et al.,* (2000)	ตัวอย่าง 1 กรัม สกัดแบบ LLE ด้วย ethyl acetate 0.5 มล. ที่ pH 7.4 แล้วนำตัวอย่าง สกัดซ้ำโดยผ่าน Isolute Confirm HCX column จากนั้นเติมตัวอย่างช้าๆ แล้วล้างคอลัมน์ด้วย acetonitrile 20 % ใน phosphate buffer (pH 6) 2 มล. และ hexane 2 มล. จากนั้นรอให้คอลัมน์แห้ง 5 นาที แล้วชะสารด้วย ethyl acetate 3 มล. แล้วนำไประเหย ที่อุณหภูมิ 50 °ซ ภายใต้ไอของไนโตรเจน นำตัวอย่างที่ผ่านการสกัดทำปฏิกิริยากับ MTBSTFA ซึ่งมี 1% TBDMSCl

ตารางที่ 1(ต่อ)

ตัวอย่าง	ผู้วิจัย	วิธีการ
เลือดและคราบเลือด	Hackett และ Elian (2006)	นำตัวอย่างเติมด้วย DI water 10 มล. นำไปปั่น (vortex) เป็นเวลา 1 นาที แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ 2000 x*g* เป็นเวลา 10 นาที แยก supernatant ออก ปรับคอลัมน์ Varian Vac Elut SPS 24 โดยใช้ methanol 3 มล. ตามด้วย DI water 3 มล. เติม supernatant แล้วล้างคอลัมน์ด้วย DI water 3 มล.ตามด้วย acetic acid เข้มข้น 1 M 3 มล. ปล่อยให้คอลัมน์แห้งเป็นเวลา 5 นาที แล้วล้างด้วย hexane 3 มล. และชะตัวอย่างด้วย ethyl acetate/methanol (80:20) 3 มล. 2 ครั้ง จากนั้นระเหยที่อุณหภูมิ 40 °ซ. ภายใต้ไอไนโตรเจน วิธีการนี้ยังใช้ในการสกัดยาจากตัวอย่างปัสสาวะด้วย
ปัสสาวะ	Rasanen *et al.,* (2000)	เติม β-glucuronidase 0.01 มล. และ acetate buffer (pH 4.8) 0.10 มล. ลงในปัสสาวะ 1 มล. ให้ความร้อน 40 °ซ. นาน 40 นาที เมื่อตัวอย่างเย็นลงที่อุณหภูมิห้อง เติม internal standard และสกัดเช่นเดียว กับตัวอย่างเลือด ดังที่แสดงข้างต้น
	Tejedor *et al.,* (2007)	ทำการหมุนเหวี่ยงตัวอย่างปัสสาวะ ที่ 10,000 x *g* เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นสกัดตัวอย่างในปัสสาวะ 0.5 มล. ด้วย ethyl acetate 1 มล. หลังปรับ pH = 9 ด้วย borate buffer นำส่วนที่สกัดได้ระเหยแห้ง แล้วละลายด้วย methanol 0.5 มล.
ในเครื่องดื่ม	Bishop *et al.,* (2007)	นำตัวอย่าง 1.0 มล. ซึ่งผสมกับ buffered phosphate (pH 6.0) 0.1 M 0.1 มล. แล้วสกัดด้วย ethyl acetate 0.5 มล. 2 ครั้ง นำชั้นของตัวทำละลายหลังสกัด ไประเหยภายใต้ไอไนโตรเจน ละลายด้วย MECC buffer 0.1 มล. ซึ่งมี 2,4-DNT ที่ใช้เป็น internal standard

1.2.5.3 การวิเคราะห์ด้วยเทคนิคสเปกโทรสโกปี (Spectroscopy)

Procopio และคณะ (1986) รายงานการตรวจฟลูไนตราซีแพม ในวารสาร ANALLES DE QUIMICA เป็นภาษาสเปน โดยการตรวจวัดการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์ของฟลูไนตราซีแพม เมื่อผ่านกระบวนการโปรโตเนชันด้วยกรดเปอร์คลอริกความเข้มข้น 1 โมลาร์ พบว่า ฟลูไนตราซีแพมให้การเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์ ที่ความยาวคลื่น 470 นาโนเมตร เมื่อใช้ความยาวคลื่นกระตุ้น 305 นาโนเมตร (ในตัวทำละลายเมทานอล ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส) มีค่าความสามารถในการตรวจวิเคราะห์ (Detection limit หรือ Limit of Detection) อยู่ที่ 15 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร

เทคนิคทางสเปกโทรสโกปี ได้ถูกนำไปประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์หาสารในกลุ่มเบนโซไดอะซีพีน เช่น Tejedor แลคณะ (2007) ได้รายงานการวิเคราะห์ออกซ่าซีแพม (oxazepam) ในตัวอย่างปัสสาวะ ในวารสาร Analytica Chimica Acta ด้วยวิธีการไฮโดรไลซีส (hydrolysis) และไซคลิเซชั่น (cyclization) โดยเก็บตัวอย่างปัสสาวะในช่วงเวลาต่างๆ หลังได้รับยาไดอะซีแพม (diazepam) และคลอราซีแพม (clorazepam) ทำการสกัดด้วยเทคนิคการสกัดแยกของเหลว (liquid–liquid extraction; LLE) เติมกรดไฮโดรคลอริก (hydrochloric acid) และให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที ออกซ่าซีแพมจะเปลี่ยนเป็นอะมิโนคลอโรเบนโซฟีนอน (2-amino-5-chlorobenzophenole) เมื่อให้ความร้อนแก่สารตัวอย่างที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที โดยมีซีเรียม (Cerium, Ce(IV)) ซึ่งอยู่ในกรดฟอสฟอริก (phosphoric acid) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา จากปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น อะมิโนคลอโรเบนโซฟีนอน จะเปลี่ยนเป็นคลอโรอะคริไดนอน (2-chloro-9(10H)-acridinone) ซึ่งเป็นโมเลกุลที่ให้แสงฟลูออเรสเซนซ์ที่ความยาวคลื่น 465 นาโนเมตร เมื่อกระตุ้นที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร วิธีการนี้ตรวจวิเคราะห์ได้ที่ความเข้มข้นต่ำสุด 4.15 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับการวิเคราะห์ในตัวอย่างปัสสาวะ ขึ้นกับช่วงเวลาที่ทำการเก็บตัวอย่าง

เพื่อเพิ่มศักยภาพในการตรวจวิเคราะห์ทางเทคนิคสเปกโทรสโกปี จึงได้มีการพัฒนาใช้ร่วมกับเทคนิคอื่นๆ ในการวิเคราะห์ เช่น ใช้แคปปิลารีอิเล็กโทรโฟรีซิส (capillary electrophoresis; CE) ในระบบ Chip-based microfluidic โดย Bishop และคณะ (2007) ได้วิเคราะห์ฟลูไนตราซีแพม ดิสเมทิลฟลูไนตราซีแพม (desmethylflunitrazepam) คลอนาซีแพม (clonazepam) และไนตราซีแพม (nitrazepam) ในการวิเคราะห์ได้ใช้ Micralyne Microfluidic Tool Kit (μ-TK) ซึ่งเป็นรูป T-shaped ยาว 8 เซนติเมตร กว้าง 50 ไมโครเมตร ในการแยกสารตัวอย่าง จากนั้นผ่านตัวอย่างเข้าเครื่องตรวจวัดฟลูออเรสเซนซ์ โดยติดตั้งเลเซอร์ที่ความยาวคลื่นกระตุ้น 635 นาโนเมตร ซึ่งห่างจากจุดสิ้นสุดของการแยก 45 มิลลิเมตร ในการแยกใช้ sodium dodecyl sulfate (SDS)/boric acid/sodium tetraborate/Cy5 กับเมทานอล 20 % เป็นบัฟเฟอร์ และใช้ 2,4-dinitrotoluene เป็นสารมาตรฐานภายใน แยกด้วยกระแสไฟฟ้า 4.0

กิโลโวลต์ แล้วจึงเข้าสู่เครื่องตรวจวิเคราะห์ เทคนิคนี้ให้ค่าความสามารถการตรวจวัดในช่วง 50 – 80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์ตัวอย่างประเภทเครื่องดื่มได้ โดยการสกัดแยก ซึ่งให้ค่าการคืนกลับของสาร (percent recovery) ในช่วง 79 – 88 % ค่าความสามารถในการตรวจวิเคราะห์ประมาณ 13 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งความสามารถในการตรวจวัดขึ้นอยู่กับองค์ประกอบภายในเครื่องดื่ม

1.2.5.4 การวิเคราะห์ด้วยเทคนิคก๊าซโครมาโทกราฟี (Gas Chromatography)

ปี 1997 Yegles, และคณะ ได้วิเคราะห์ยาในกลุ่มเบนโซไดอะซีพีนจากเส้นผม เทียบผลกับตัวอย่างเลือด ด้วยเทคนิคก๊าซโครมาโทกราฟี–แมสสเปกโทรเมตรี (GC–MS) จาก 40 ตัวอย่าง พบว่า 37 ตัวอย่าง ให้ผลการวิเคราะห์ตัวอย่างเส้นผมสอดคล้องกับตัวอย่างเลือด ค่าความสามารถในการตรวจวัดมีความแตกต่างกัน เนื่องจากอายุ สภาพของตัวอย่าง และสภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์ ความเข้มข้นต่ำสุดที่ตรวจพบของนอร์ดาซีแพม (nordazepam) ไดอะซีแพม (diazepam) ออกซ่าซีแพม (oxazepam) และฟลูไนตราซีแพม (flunitrazepam) คือ 1.8 2.2 3.4 และ 9.5 นาโนกรัมต่อมิลลิกรัม ตามลำดับ

ในปีเดียวกันนี้ Cirimele และคณะ (1997) ได้วิเคราะห์ฟลูไนตราซีแพม และอนุพันธ์ คือ 7–aminoflunitrazepam ในตัวอย่างเส้นผม ด้วยเทคนิค GC/MS-NCI ผลการวิเคราะห์ฟลูไนตราซีแพมให้ค่ามวลต่อประจุ (m/z) คือ 313 อนุพันธ์ของฟลูไนตราซีแพมให้ค่ามวลต่อประจุที่ 459 และสารมาตรฐานภายใน (diazepam, d_5) ให้ค่ามวลต่อประจุที่ 289 จากตัวอย่างเส้นผม 40 ตัวอย่าง พบว่า มี 14 ตัวอย่างที่ตรวจพบทั้งฟลูไนตราซีแพมและอนุพันธ์ อีก 12 ตัวอย่างพบเฉพาะอนุพันธ์ของฟลูไนตราซีแพมเท่านั้น ฟลูไนตราซีแพมและ 7-aminoflunitrazepam ตรวจพบความเข้มข้นอยู่ในช่วง 31–129 พิกโคกรัมต่อมิลลิกรัม และ 3 – 161 พิกโคกรัมต่อมิลลิกรัม ตามลำดับ

ต่อมาในปี 1999 Elian A. A. ได้นำเสนองานวิจัย ที่เกี่ยวกับการวิเคราะห์สารฟลูไนตราซีแพมและอนุพันธ์ในตัวอย่างเลือดและคราบเลือด โดยการสกัดแบบ SPE จากนั้นทำปฏิกิริยากับเพนตะฟลูออโรโพรไพออนิกแอนไฮไดรด์ (pentafluoropropionic anhydride; PFPA) ตามด้วยเมทิลไตรฟลูออโรอะซีตาไมด์ (*N*-(*tert*-butyldimethylsilyl)-*N*-methyl-trifluoroacetamide, MTBSTFA with 1% TBDMSCl) วิธีการนี้ให้อนุพันธ์ 7-aminoflunitrazepam และ desmethylflunitrazepam โดยที่ PFPA จะทำให้เกิดเฉพาะ 7-aminoflunitrazepam เมื่อเติมด้วย MTBSTFA with 1% TBDMSCl จะให้ desmethylflunitrazepam และ 7-amino-

flunitrazepam โดย Elian ได้ยืนยันผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค GC-MS ซึ่งพบว่า ผลการวิเคราะห์ให้ช่วงความเป็นเส้นตรง คือ 0.1 – 50 ไมโครกรัมต่อเดซิลิตร

นอกเหนือจากเทคนิคที่ใช้ในการวิเคราะห์แล้ว ความสามารถในการสกัดเพื่อให้ได้ตัวอย่างที่เหมาะสมต่อเทคนิคที่จะใช้วิเคราะห์เป็นสิ่งสำคัญเช่นกัน ในปี 2006 Hackett และ Elian ได้นำเสนอวิธีการสกัดฟลูไนตราซีแพมและ 7-aminoflunitrazepam ในตัวอย่างเลือดและปัสสาวะ (ตารางที่ 2) จากนั้นทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค LC–PDA ซึ่งเทคนิคนี้สามารถแยกและตรวจวัดยาในความเข้มข้นระดับต่ำได้ ความยาวคลื่นที่ใช้เพื่อการตรวจวัด คือ 250 นาโนเมตร ซึ่งเป็นความยาวคลื่นมีความจำเพาะมากกว่าตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 220 นาโนเมตร และอีกเทคนิค คือ การทำ derivatization ตัวอย่างหลังการสกัดด้วย PFPA ก่อนวิเคราะห์ด้วย GC–MS ผลของการสกัด ให้ช่วงความเป็นเส้นตรงจาก 0 – 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC ให้ค่าการวิเคราะห์ฟลูไนตราซีแพม และ 7-aminoflunitrazepam คือ 34 ± 5 และ 48 ± 5 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ในขณะที่เทคนิค GC–MS ให้ค่าการวิเคราะห์ฟลูไนตราซีแพม และ 7-aminoflunitrazepam คือ 37 ± 5 และ 45 ± 5 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร โดยเติมฟลูไนตราซีแพมและ 7-aminoflunitrazepam อย่างละ 40 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ในตัวอย่างเลือดก่อนทำการสกัด ผลการสกัดให้เปอร์เซ็นต์การคืนกลับของฟลูไนตราซีแพม และ 7-aminoflunitrazepam หลังการสกัด คือ 83 ± 4% และ 87 ± 4% ตามลำดับ

1.2.5.5 การวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอิมมูโนแอสเซ (Immunoassay)

Rasanen และคณะ (2000) ได้พัฒนาการตรวจสารกลุ่มเบนโซไดอะซีพีน โดยไฮโดรไลซีสตัวอย่างปัสสาวะด้วยเบต้ากลูโคลลาไนด์กับกรดอะซีเตต ที่ pH 4.8 ก่อนวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอิมมูโนแอสเซ และเปรียบเทียบผลที่ได้กับตัวอย่างปัสสาวะและตัวอย่างเลือดที่ผ่านการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคก๊าซโครมาโทกราฟี ปรากฏว่า เมื่อไฮโดรไลซีสตัวอย่างก่อนทดสอบด้วยเทคนิคอิมมูโนแอสเซ ตัวอย่างให้ผลทดสอบที่เชิงบวก (positive test) 175 ตัวอย่าง สูงกว่าการวิเคราะห์ตัวอย่างโดยไม่ผ่านการไฮโดรไลซิส ซึ่งให้ผลการทดสอบเชิงบวกเพียง 153 ตัวอย่าง จากจำนวนตัวอย่างทั้งหมด 506 ตัวอย่าง และผลจากการวิเคราะห์ตัวอย่างปัสสาวะและตัวอย่างเลือดด้วยเทคนิคก๊าซโครมาโทกราฟี พบว่า มีตัวอย่างที่ให้ผลเชิงบวกต่อการวิเคราะห์จำนวน 200 ตัวอย่าง และ 185 ตัวอย่าง ตามลำดับ แต่อย่างไรก็ตาม เทคนิคนี้ไม่สามารถวิเคราะห์อนุพันธ์ที่มีหมู่ไนโตรได้ ซึ่งได้แก่ อนุพันธ์ของฟลูไนตราซีแพม

1.2.5.6 การวิเคราะห์ด้วยเทคนิคการแยกของเหลว และการแยกของเหลวสมรรถนะสูง (Liquid Chromatography; LC and High Performance Liquid Chromatography; HPLC)

เทคนิคการแยกของเหลวและการแยกของเหลวสมรรถนะสูง เป็นเทคนิคที่ได้รับความนิยมในการวิเคราะห์สารกลุ่มเบนโซไดอะซีพีน เนื่องจากเป็นเทคนิคที่มีความไวและความแม่นยำ และมีการใช้ร่วมกับเทคนิคอื่นๆเพื่อประสิทธิภาพในการวิเคราะห์ที่สูงขึ้น

ในปี 2002 Kollroser และ Schober ได้วิเคราะห์ฟลูไนตราซีแพมและอนุพันธ์ของฟลูไนตราซีแพม (7-aminoflunitrazepam และ *N*-desmethylflunitrazepam) ในพลาสมา (human plasma) ด้วยเทคนิค HPLC-APCI-MS-MS หลังจากสกัดยาออกจากตัวอย่าง พบว่าสามารถตรวจวิเคราะห์ 7-aminoflunitrazepam *N*-desmethylflunitrazepam และฟลูไนตราซีแพมที่ความเข้มข้น 0.5 2.0 และ 0.25 ไมโครกรัมต่อลิตร ตามลำดับ เมื่อทำการวิเคราะห์ตัวอย่างพลาสมาของเหยื่อ ที่มีการล่วงละเมิดทางเพศ พบว่า สามารถตรวจพบ 7-aminoflunitrazepam *N*-desmethylflunitrazepam และฟลูไนตราซีแพม ที่ความเข้มข้น 23.1 11.7 และ 48.3 ไมโครกรัมต่อลิตร

Smink และคณะ (2004) วิเคราะห์เบนโซไดอะซีพีนในตัวอย่างเลือด ด้วยเทคนิคการแยกของเหลวสมรรถนะสูงควบคู่กับเทคนิคแมสสเปกโทรเมทรี (HPLC–MS) หลังจากสกัดยาออกจากตัวอย่างเลือดด้วยเทคนิคสกัดแยกของเหลว (LLE) แยกด้วยคอลัมน์ (Xterra MS C-18) โดยใช้เมทานอลผสมกับกรดฟอร์มิกเข้มข้น 6 มิลลิโมลาร์ (pH = 3) ในอัตราส่วนที่ต่างกันตามช่วงเวลา จากนั้นเข้าสู่ tanderm mass spectrometer วิธีการนี้สามารถตรวจวิเคราะห์สารในกลุ่มเบนโซไดอะซีพีนโดยรวมในช่วงความเข้มข้น 0.001 – 0.0126 มิลลิกรัมต่อลิตร สำหรับตัวอย่างน้ำลาย ได้ใช้เทคนิคการสกัดแบบ LLE จากนั้นผ่านตัวอย่างเข้าคอลัมน์ชนิด C18 ใช้อะซีโตรไนไตรล์และกรดฟอร์มิก (80:20) เป็นตัวพาในอัตราการไหลผ่าน 0.2 มิลลิลิตรต่อนาที แล้วส่งต่อเข้าสู่ tanderm mass spectrometer โดยวิเคราะห์แบบ positive ionization ใช้ศักย์ไฟฟ้าของแคปิลลารี่ที่ 1 กิโลโวลต์ อุณหภูมิของการแตกประจุ 120 องศาเซลเซียส กำจัดฟองอากาศโดยใช้อุณหภูมิ 350 องศาเซลเซียส และอัตราการไหลผ่าน 500 ลิตรต่อชั่วโมง ควบคุมความดันให้คงที่ 3 มิลลิบาร์ด้วยอาร์กอน วิธีการนี้ให้ค่าความสามารถในการวิเคราะห์ตัวอย่างในช่วงความเข้มข้น0.1 – 0.2 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร (Kintz *et al.,* 2005)

1.2.5.7 การวิเคราะห์ในเครื่องดื่ม

Olsen และคณะ (2005) ได้ทำการวิจัยถึงการละลาย ลักษณะที่ปรากฏของเครื่องดื่มและรสชาติของเครื่องดื่ม เมื่อมียานอนหลับ ได้แก่ ฟลูไนตราซีแพม (flunitrazepam) ออกซาซีแพม (oxazepam) โซพิคลอน (zopiclone) คาริโซโพรดอล (carisoprodol) คลอนาซีแพม (clonazepam) มอร์ฟีน (morphine) ไดอะซีแพม (diazepam) และอัลฟราโซแลม (alprazolam) โดยเครื่องดื่มที่ทำการวิจัย ได้แก่ Coca-Cola™ เบียร์ น้ำ และเอทานอล (12% ในน้ำ) พบว่า ความเข้มข้นของยาแต่ละชนิดที่ละลายในเครื่องดื่มเบียร์ และ Coca-Cola™ เมื่อเวลาผ่านไป 10 นาที มากกว่า 50% ของความเข้มข้นสูงสุดที่ได้จากการคำนวณ ซึ่งเป็นค่าเปรียบเทียบพื้นที่ใต้พีค ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคการแยกของเหลวควบคู่กับการใช้เทคนิคแมสสเปกโทรเมตรี (Liquid Chromatography-Mass Spectrometry; LC-MS) ของยาแต่ละชนิดที่ละลายในเครื่องดื่มแต่ละประเภท กับตัวอย่างยาที่ละลายในน้ำปราศจากไอออน พบว่า ยานอนหลับที่ทำการทดสอบส่วนใหญ่ เมื่อละลายในเครื่องดื่มจะพบตะกอนของยา เศษที่เป็นชิ้นจากเม็ดยาที่ละลายไม่หมด หรือทำให้เครื่องดื่มมีความขุ่นขึ้น บางชนิดทำให้เครื่องดื่มมีการเปลี่ยนสี ทั้งนี้เป็นผลเนื่องมาจากสีที่บริษัทผู้ผลิตได้เติมไว้ในเม็ดยา เช่น Rohypnol® เมื่อละลายแล้วให้สีฟ้าหรือเขียว Dolcontin® ละลายแล้วให้สีแดง และ Valium® ละลายให้สีเหลือง ในขณะที่ Flunipam® และ Valium® ทำให้เกิดฟองแพร่กระจายในเบียร์ สำหรับการเปลี่ยนรสของเครื่องดื่มหลังเติมยานอนหลับลงไป พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงน้อยมาก ยกเว้น Imovane® และ Somadril® ที่มีการเปลี่ยนของรสชาดชัดเจน ในส่วนของ Rohypnol® นอกจากสีที่สามารถสังเกตได้ ในการทดสอบ ทั้งความขุ่น ตะกอน และรสชาดของเครื่องดื่มที่มีการใส่ยาลงไป ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของเครื่องดื่มที่สามารถสังเกตได้

1.2.5.8 ปฏิกิริยาโฟโตคะตะไลซิส (Photocatalysis process)

ปี 1986 Givens และคณะ ได้ศึกษาผลและรูปแบบของฟลูไนตราซีแพมในทางโฟโตเคมี โดยฉายแสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่นประมาณ 300 นาโนเมตร แก่สารตัวอย่างฟลูไนตราซีแพม ในช่วงความเข้มข้น 1-7 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในเมทานอล และเทียบกับผลการวิเคราะห์จากเทคนิคอัลตราไวโอเลต – วิสิเบิลสเปกโทรสโกปี นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปี อินฟราเรดสเปกโตรสโกปี และแมสสเปกโทรเมทรี ผลจากการฉายแสงอัลตราไวโอเลต ทำให้หมู่ไนโตร (nitro; NO_2) ซึ่งเป็นหมู่แทนที่ในตำแหน่งที่ 7 ของโครงสร้างโมเลกุลฟลูไนตราซีแพมเปลี่ยนเป็นหมู่อะมิโน (amino; NH_2) ได้เป็นอนุพันธ์ของฟลูไนตราซีแพม คือ 7-อะมิโนฟลูไนตราซีแพม การเปลี่ยนหมู่แทนที่ของฟลูไนตราซีแพมใน

ตำแหน่งที่ 7 จากหมู่ไนโตรเป็นหมู่อะมิโน ทางคณะผู้วิจัยได้ศึกษาเปรียบเทียบกับการเปลี่ยนแปลงของหมู่แทนที่ของ N-methyl-*p*-nitroacetanilide เนื่องจากมีการเปลี่ยนแปลงของหมู่แทนที่ หลังการฉายแสงอัลตราไวโอเลตเช่นเดียวกับฟลูไนตราซีแพม โดยการเปลี่ยนจากหมู่แทนที่ไนโตรเป็นไนโตรโซ (nitroso) แล้วเปลี่ยนเป็นไฮดรอกซิลอะมิโน (hydroxyl amino) และสุดท้ายได้เป็นหมู่อะมิโน (amino)

ในปี 2007 Yuranova และคณะ ได้ประยุกต์ใช้ไทเทเนียมไดออกซ์ในการสลายคราบของไวน์แดงและกาแฟบนผ้า 2 ชนิด ได้แก่ polyester และ wool-polyaminde ที่เคลือบด้วยไทเทเนียมไดออกไซด์ โดยนำตัวอย่างผ้าขนาด 48 ตารางเซนติเมตร แช่ในสารละลายไทเทเนียมไดออกไซด์ เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส จากนั้นอบผ้าที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วล้างด้วยน้ำปราศจากไอออนพร้อมทั้งเขย่า (sonicate) ทันที เพื่อกำจัดไทเทเนียมไดออกไซด์ที่ไม่ได้ยึดเกาะกับผ้าออก นำตัวอย่างผ้าที่เติมคราบไวน์แดงและกาแฟ ใส่เครื่องทำปฏิกิริยาโฟโตเคมีคอล (photochemical reactor) โดยวางไว้ตรงกลางของเครื่อง เมื่อได้รับการฉายแสง ตัวอย่างผ้าจะปลดปล่อยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ที่เกิดจากสารอินทรีย์ในคราบเครื่องดื่ม ซึ่งปริมาณของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์จะถูกวัดด้วยเครื่องก๊าซโครมาโทรกราฟี โดยคราบไวน์แดงถูกสลายได้ง่ายกว่าคราบกาแฟ และเมื่อทำการผสมไทเทเนียมไดออกไซด์กับซิลเวอร์ไดออกไซด์ พบว่า ประสิทธิภาพการจัดคราบเกิดได้ดียิ่งขึ้นโดยประเมินจากปริมาณของก๊าซคาร์บอนออกไซด์ที่เกิดขึ้น

1.3 วัตถุประสงค์

1. เพื่อนำเอาเทคนิคทางด้านสเปกโทรสโกปี คือ การดูดกลืนแสงและการเปล่งแสง รวมถึงปฏิกิริยาโฟโตคะตะไลซิส ซึ่งมีความรวดเร็ว ค่าใช้จ่ายน้อย และมีวิธีการในการตรวจวิเคราะห์ไม่ซับซ้อน มาประยุกต์ใช้ในการตรวจพิสูจน์ฟลูไนตราซีแพมเบื้องต้น (Screening Test) ในเครื่องดื่มแอลกอฮอล์
2. เพื่อนำเสนอเป็นแนวทางและวิธีการในการตรวจพิสูจน์ฟลูไนตราซีแพม ที่สามารถนำมาประยุกต์ใช้กับงานทางด้านนิติวิทยาศาสตร์ได้ ซึ่งผลดีจากการตรวจสารฟลูไนตราซีแพมในเครื่องดื่ม เป็นการเพิ่มวัตถุพยานแวดล้อมให้กับคดี และอาจเป็นแนวทางอันนำไปสู่การพัฒนาชุดทดสอบเบื้องต้น ที่สามารถวิเคราะห์ยาในกลุ่มเบนโซไดอะซีนในเครื่องดื่มต่อไป

1.4 ขอบเขต

1. วิเคราะห์สารฟลูไนตราซีแพมจากยาเม็ดที่ใช้ในงานวิจัยนี้ เป็นการวิเคราะห์โดยใช้เฉพาะยาเม็ดเคลือบ มีชื่อทางการค้าว่า โรฮิปนอล (Rohypnol®) ขนาด 1 มิลลิกรัมต่อเม็ด
2. เครื่องดื่มแอลกอฮอล์ประเภทมีสี เป็นเครื่องดื่มที่เป็นเหล้าเท่านั้น โดยสีของเครื่องดื่มทั้งหมด ให้สีที่มองเห็นคือสีน้ำตาล และเป็นการวิเคราะห์จากตัวอย่างที่มีการจัดเตรียมขั้นนั้น ที่ไม่มีการผสมเครื่องดื่มอื่นลงไปในตัวอย่าง
3. ตัวอย่างเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ที่มีการผสมฟลูไนตราซีแพมนั้น เป็นการเตรียมขึ้นในห้องปฏิบัติการ ดังนั้นตัวอย่างที่ได้จึงเป็นเพียงการจำลองวัตถุพยานจากที่เกิดเหตุ
4. งานวิจัยนี้ เป็นการตรวจพิสูจน์ฟลูไนตราซีแพมเบื้องต้นในเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ ดังนั้นจึงเป็นการตรวจพิสูจน์สารที่เน้นการตรวจวิเคราะห์ในเชิงคุณภาพ

บทที่ 2

วิธีการวิจัย

2.1 สารและสารเคมี

2.1.1 เอทานอล 99.8% (Ethanol, AR grade, Labscan, Ireland)

2.1.2 กรดไนตริก 65 – 68 % (Acetic acid, AR grade, Guangdong Guanghua Chemical Factory , China)

2.1.3 กรดไฮโดรคลอริก 37% (Hydrochloric acid, AR grade, Labscan, Ireland)

2.1.4 กรดซัลฟิวริก 96% (Sulfuric acid, AR grade, Labscan, Ireland)

2.1.5 กรดเปอร์คลอริก 70% (Perchloric acid, AR grade, Panreac Quimica, Spain)

2.1.6 สารมาตรฐานฟลูไนตราซีแพมบริสุทธิ์ 99% (Fluitrazepam (pure 99%) 50 mg NDC: 0079 – 1512 – 02, Lot# 151 stock# 01512, Alltech) ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากสำนักงานนิติวิทยาศาสตร์ตำรวจ กองวิทยาการ 4 วิทยาการเขต 41 ตำบลบ่อยาง อำเภอเมือง จังหวัดสงขลา

2.1.7 โรฮิปนอล 1 มิลลิกรัม ชนิดเม็ดเคลือบ (Rohypnol®: flunitrazepam 1 mg per coated – tablet (Hoffmann-La Roche, Switzerland) Lot# B1524B01 MFD: 09 2007, Exp: 09 2010 จัดซื้อจากโรงพยาบาลหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา ภายใต้ใบอนุญาตให้มีไว้ครอบครอง หรือใช้ประโยชน์ซึ่งวัตถุออกฤทธิ์ เพื่อใช้ทางวิทยาศาสตร์ (เพื่อใช้เป็นสารตัวอย่างในงานวิจัย) ใบอนุญาตเลขที่ 2001/2552 ให้ไว้ ณ วันที่ 10 เดือน กันยายน พ.ศ. 2552 โดยสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา กระทรวงสาธารณสุข

2.1.8 Regency brandy 38% alc. (Regency Brandy Thai, Thailand)

2.1.9 Master blend 35% alc. (Ginebra San Miguel, Philippines)

2.1.10 100 pipers scotch whisky 40% alc. LW6 1817 202F2901 (Chivas Brothers, Scotland)

2.1.11 Sierra® tequila silver 38% alc. L827320108 (Destilerias Sierra Unidas S.A. De C.V., Mexico)

2.1.12 Gilbey's® vodka 40% alc. L81868G251 (Authority of W.&A. Gilbey & Co., England)

2.1.13 โซดา (soda water) (สุราษฎร์ธานีเบเวอเรซ, สุราษฎร์ธานี)

2.1.14 ซิงค์ออกไซด์ (Zinc oxide; ZnO) และไทเทเนียมไดออกไซด์ (Titanium dioxid; TiO_2) ชนิดผง (Fluka, Switzerland)

2.2 เครื่องมือและอุปกรณ์

2.2.1 เครื่องยูวี-วิสิเบิลสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ รุ่น SPECORD S100 (Analytikjena, Germany)

2.2.2 เครื่องลูมิเนสเซนซ์สเปกโทรโฟโตมิเตอร์ รุ่น LS 55 (PerkinElmer, U.S.A.)

2.2.3 เครื่องแมสสเปกโทรเมตรี รุ่น MAT 95 XL (Thermofinnigan, U.S.A.)

2.2.4 เครื่องให้ความร้อนแบบกวนสารได้ THERMOLYNE รุ่น CIMAREC 2 Hot Plate/Stirrer (Lab Extreme, U.S.A.)

2.2.5 เครื่องหมุนเหวี่ยง Hettich® รุ่น EBA 20 (Hettich Zentrifugen, Germany)

2.2.6 เครื่องชั่งละเอียดทศนิยม 4 ตำแหน่ง Mettler Toledo รุ่น AB204 – S (Mettler – Toledo, Switzerland)

2.2.7 เครื่องวัดการนำไฟฟ้า รุ่น inoLab cond Level 2 (Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH, Germany)

2.2.8 กล่องสำหรับฉายแสงอัลตราไวโอเลต (รูปที่ 9) ประกอบด้วย กล่องไม้ทึบแสง ขนาดกว้าง 70.0 เซนติเมตร สูง 40.0 เซนติเมตร ลึก 55.0 เซนติเมตร ภายในติดตั้งหลอดอัลตราไวโอเลต Sylvania ชนิด blacklight – blue ขนาด 18 วัตต์ จำนวน 2 หลอด (Hawell Sylvania, Thailand) ให้ความยาวคลื่นที่ 360 นาโนเมตร ความสูงจากพื้นถึงระดับวางตัวอย่างขณะฉายแสงเท่ากับ 12 เซนติเมตร

รูปที่ 9 แสดงกล่องสำหรับฉายแสงในงานวิจัย

2.2.9 แท่งแม่เหล็กคนสาร (Magnetic bar) สีขาว ทรงกระบอก ขนาดยาวประมาณ 0.80 เซนติเมตร เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.30 เซนติเมตร

2.2.10 นาฬิกาจับเวลา

2.2.11 เทอร์โมมิเตอร์วัดอุณหภูมิในช่วง 0 – 100.0 องศาเซลเซียส

2.2.12 ควอร์ทซ์เซลล์ (Quartz cell) มาตรฐานสำหรับวัดการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลตและการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์

2.2.13 หลอดทดลองระบบปิด (รูปที่ 10)

รูปที่ 10 แสดงหลอดทดลองระบบปิด

2.3 การเตรียมสารละลาย

2.3.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพม

ชั่งสารมาตรฐานฟลูไนตราซีแพมหนัก 0.0010 กรัม ปรับปริมาตรด้วยตัวทำละลายเอทานอลจนครบ 25.00 มิลลิลิตร คนสารละลายโดยใช้เครื่องให้ความร้อนแบบกวนสารได้ ต่อเนื่องนาน 30 นาที จะได้ stock solution ของสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพม ความเข้มข้น 40.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ลักษณะเป็นสารละลายใส ไม่มีสี

2.3.2 การเตรียมสารละลายฟลูไนตราซีแพมจากยาเม็ดโรฮิปนอล (Rohypnol®)

ในการเตรียมตัวอย่างสารละลายยาเม็ดโรฮิปนอล ได้ทำการละลายยาเม็ดโรฮิปนอลทั้งเม็ด เพื่อให้ได้ปริมาณของฟลูไนตราซีแพมที่มีอยู่ในเม็ดยาทั้งหมด และลดความคลาดเคลื่อนในการคำนวณความเข้มข้นของฟลูไนตราซีแพมในสารละลาย

เตรียมสารละลายฟลูไนตราซีแพมจากยาเม็ดโรฮิปนอล ขนาด 1 มิลลิกรัม จำนวน 1 เม็ด ปรับปริมาตรด้วยตัวทำละลายเอทานอล จนครบ 25.00 มิลลิลิตร จากนั้นคนด้วยเครื่องกวนสาร นานประมาณ 3 ชั่วโมง แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที เลือกเก็บส่วนชั้นสารละลายเก็บไว้ ซึ่งสาระละลายที่ได้ จะมีลักษณะเป็นสารละลายใส สีฟ้าเข้ม ความเข้มข้นของฟลูไนตราซีแพมในสารละลาย จากการคำนวณคือ 40.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

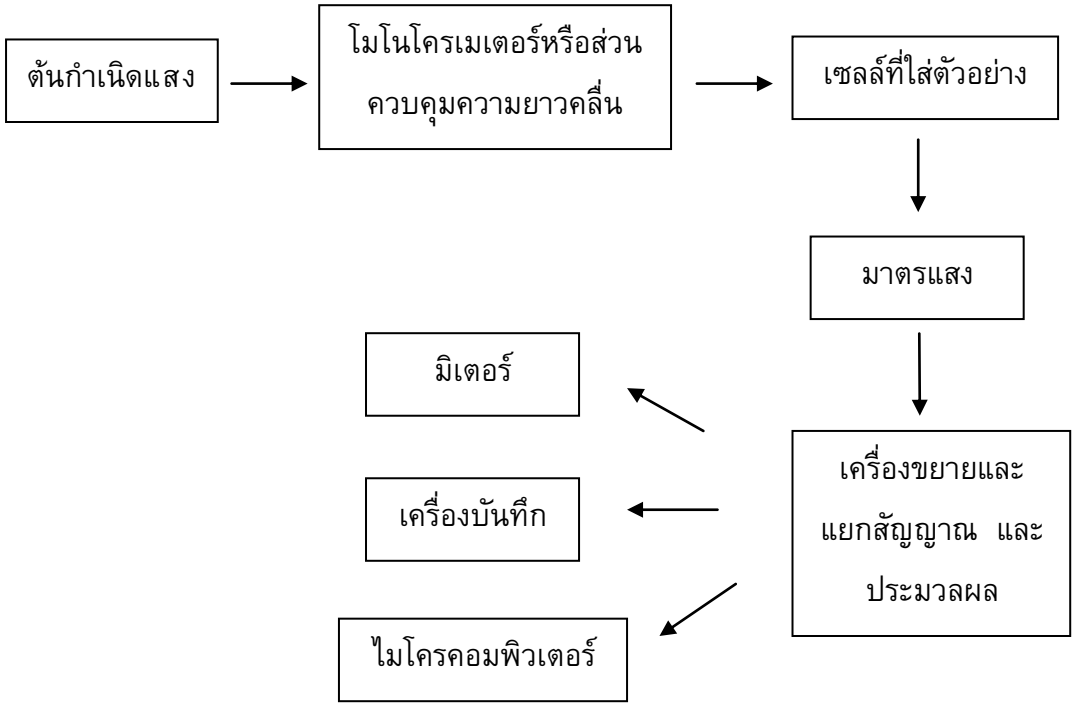
2.4 การวัดการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องยูวี – วิสิเบิลสเปกโทรโฟโตมิเตอร์

เครื่องยูวี-วิสิเบิลสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ เป็นเครื่องมือสำหรับวัดปริมาณแสงที่ผ่านทะลุตัวอย่างที่มีสารที่ต้องการศึกษา เปรียบเทียบกับปริมาณแสงที่ทะลุผ่านตัวอย่างที่ไม่มีสารที่ต้องการศึกษา ข้อมูลจะอยู่ในรูปของสเปกตรัมการดูดกลืนแสง (absorption spectrum) อันเป็นคุณสมบัติเฉพาะของสารนั้น สามารถที่จะนำมาใช้ในการวิเคราะห์ได้ทั้งเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณ (แม้น อมรสิทธิ์ และอมร เพชรสม 2539)

แหล่งกำเนิดแสงสำหรับเครื่องยูวี – วิสิเบิลสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ เป็นหลอดไฮโดรเจนหรือหลอดดิวทีเรียม ให้แสงในช่วงความยาวคลื่น 185 – 375 นาโนเมตร ซึ่งเกิด

จากการคายพลังงานของไฮโดรเจนหรือดิวเทอเรียมอะตอม ที่อยู่ในสถานะกระตุ้น ตัวหลอดจะทำด้วยควอร์ทซ์ หรือ fused silica และบรรจุก๊าซไว้ที่ความกดดันต่ำ (5 มม. ปรอท) ใช้ระบบไฟฟ้า ชนิด D.C. ขนาด 40 โวลต์เท่านั้น ส่วนหลอดทังสเตน จะให้แสงในช่วงความยาวคลื่น 320 - 2500 นาโนเมตร ภายในหลอดบรรจุจะใส่ก๊าซไอโอดีนหรือโบรมีนที่ความดันต่ำเข้าไปในหลอดที่ทำด้วย fused silica

ส่วนประกอบของเครื่องยูวี – วิสิเบิลสเปกโทรโฟโตมิเตอร์



รูปที่ 11 แสดงองค์ประกอบของเครื่องยูวี – วิสิเบิลสเปกโทรโฟโตมิเตอร์

ในการทดลอง เซลล์ที่ใช้ในการวัดตัวอย่าง เป็นประเภท ควอร์ทซ์เซลล์ และเครื่องยูวี-วิสิเบิลสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ที่ใช้ คือ รุ่น SPECORD® S100 Analytik Jena GmbH, Germany ซึ่งมีหลอดดิวเทอเรียมและหลอดฮาโลเจน เป็นแหล่งกำเนิดแสง สามารถวัดการดูดกลืนแสงได้ในช่วงความยาวคลื่น 190 – 1020 นาโนเมตร ความแม่นยำของความยาวคลื่นที่วัดได้ ±1 นาโนเมตร ในช่วงความยาวคลื่น 270 – 650 นาโนเมตร และ ±2 นาโนเมตร สำหรับความยาวคลื่นในช่วงอื่น ประมวลผลด้วย AJ-UVVIS sofeware และสำหรับสภาวะที่ใช้ในการทดลอง ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 แสดงสภาวะของเครื่องยูวี-วิสิเบิลสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ ที่ใช้ในการวิจัย

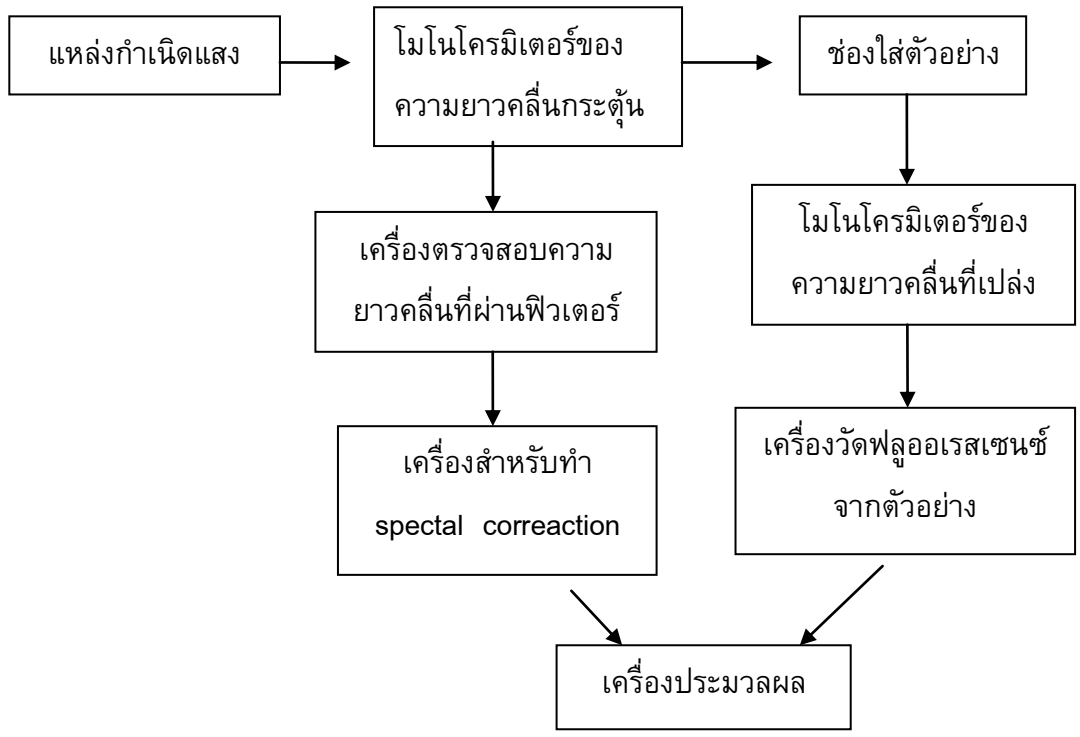
ปัจจัยเครื่อง	พารามิเตอร์
Integration	40 ms
Accumulation	10
Range	200 – 650 nm absorbance
	automatic dark current
Scan mode	single scan
Accessory	none

รูปที่ 12 เครื่องยูวี-วิสิเบิลสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ รุ่น SPECORD® S100
Analytik Jena GmbH, Germany

2.5 การวัดการเปล่งแสงด้วยเครื่องลูมิเนสเซนซ์สเปกโทรโฟโตมิเตอร์

เครื่องลูมิเนสเซนซ์สเปกโทรโฟโตมิเตอร์ ใช้ตรวจสอบหรือพิสูจน์ชนิดของสาร โดยศึกษาจากการเปล่งแสงของสาร ซึ่งรูปแบบการเปล่งแสงจะขึ้นอยู่กับแหล่งพลังงาน โดยหลอดกำเนิดแสงที่นิยมใช้กัน มี Xenon-arc lamp และ Mercury-arc lamp จะให้ความเข้มแสงสูงในช่วงความยาวคลื่น 250 – 600 นาโนเมตร และต้องควบคุมกำลังไฟฟ้าให้คงที่ สำหรับ Mercury-arc lamp ให้แสงที่มีความเข้มแสงสูง แต่ไม่สามารถใช้เป็นแหล่งกำเนิดแสงในเครื่องสเปกโทรฟลูออโรมิเตอร์แบบ scanning ได้ เนื่องจากสเปกตรัมของการกระตุ้นของ Mercury ซ้อนพอดีกับสเปกตรัมของการกระตุ้นของสารตัวอย่าง ต่อมาได้มีการนำเลเซอร์มาใช้เป็นแหล่งกำเนิดแสง ซึ่งจะให้แสงในช่วงความยาวคลื่น 360 – 650 นาโนเมตร

ส่วนประกอบของเครื่องลูมิเนสเซนซ์สเปกโทรโฟโตมิเตอร์



รูปที่ 13 แสดงองค์ประกอบของเครื่องลูมิเนสเซนซ์สเปกโทรโฟโตมิเตอร์

ในการทดลอง วัดการเปล่งแสงของตัวอย่างด้วยเครื่องลูมิเนสเซนซ์สเปกโทร-โฟโตมิเตอร์ รุ่น LS 55 PerkinElmer, U.S.A. แหล่งกำเนิดแสง คือ หลอดซีนอน ขนาด 20 กิโลวัตต์ เครื่องวัดตัวอย่าง (sample detector) คือ Gated photomultiplier with modified S5

และ Red-sensitive R928 photomultiplier เครื่องวัดค่าอ้างอิง (reference detector) คือ photodiode ความแม่นยำของความยาวคลื่น ±1.0 นาโนเมตร ความกว้างของ excitation slits และ emission slits อยู่ในช่วง 2.5 – 15.0 และ 2.5 – 20.0 นาโนเมตร ตามลำดับ สามารถตรวจวัดได้เร็ว 10 – 1500 นาโนเมตรต่อนาที ประมวลผลด้วย FL WinLab sofeware และสภาวะที่ใช้ในการทดลอง ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 แสดงสภาวะของเครื่องลูมิเนสเซนซ์สเปกโทรโฟโตมิเตอร์ ที่ใช้ในการวิจัย

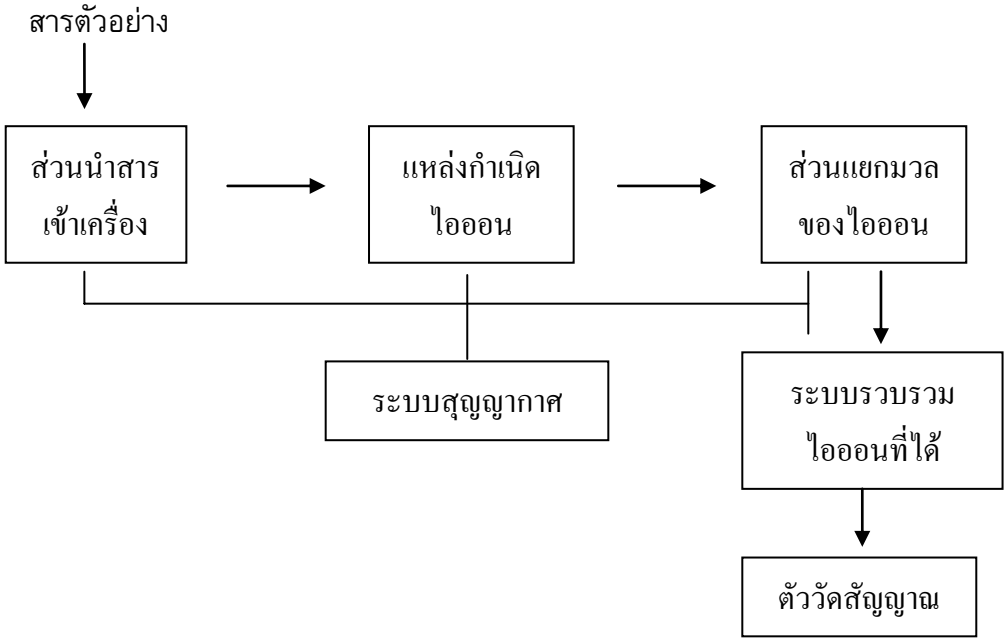
ปัจจัยเครื่อง	สภาวะที่ใช้	
Source	luminescence	: fluor
	Ex. Corr	: on
Polarisers	Emission Filter	: open
	Excitation polar	: clear (auto cutoff on)
Detector	Emission polar	: clear
	Photomultiplier	: Type R 928
	Photomultiplier voltage	: auto
	Em. Corr	: off
	slit	: ex 10 em 10
	scan speed	: 500 nm/min

รูปที่ 14 เครื่องลูมิเนสเซนซ์สเปกโทรโฟโตมิเตอร์ รุ่น LS 55 PerkinElmer, U.S.A.

2.6 การวิเคราะห์โครงสร้างสารด้วยเครื่องแมสสเปกโทรมิเตอร์

แมสสเปกโทรมิเตอร์ เป็นเครื่องมือที่ใช้ในการศึกษาข้อมูลเกี่ยวกับโครงสร้างและโมเลกุลของสาร โดยการให้พลังงานแก่โมเลกุล จนทำให้โมเลกุลนั้นเกิดการแตกตัวเป็นไอออน พลังงานที่ใช้อยู่ในช่วง 5 – 70 eV (1 eV = 23.06 Kcal/mole) จากนั้นทำการแยกและตรวจสอบไอออนที่เกิดขึ้น

ส่วนประกอบของเครื่องแมสสเปกโทรมิเตอร์



รูปที่ 15 แสดงองค์ประกอบของเครื่องแมสสเปกโทรมิเตอร์

การวิเคราะห์ด้วยเทคนิคแมสสเปกโทรเมตรี ในการทดลองนี้ เป็นการส่งตรวจตัวอย่างที่ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา เครื่องมือที่ใช้ในการทดสอบ คือ MAT 95 XL Mass Spectrometer, Thermofinnigan เทคนิคที่ใช้ในการทดสอบ คือ Electron ionization mass spectrometry สภาวะการทดสอบ คือ Magnetic sector mass spectrometry with direct insert probe (DIP)

2.7 ขั้นตอนการทดลอง

2.7.1 การดูดกลืนแสงของฟลูไนตราซีแพม

2.7.1.1 ศึกษาสเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐานฟลูไนตราซีแพมและฟลูไนตราซีแพมจากยาเม็ดโรฮิปนอล

การวัดการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพมและสารละลายฟลูไนตราซีแพมจากยาเม็ดโรฮิปนอล มีขั้นตอนดังต่อไปนี้

(1) เตรียมสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพมจาก stock solution ความเข้มข้น 40.00 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 250.0 ไมโครลิตร (โดยใช้ Transferpette) ปรับปริมาตรด้วยตัวทำละลายเอทานอลจนครบ 10.00 มิลลิลิตร ได้สารละลายตัวอย่างความเข้มข้น 1.000 มิลลิกรัมต่อลิตร และสารละลายฟลูไนตราซีแพมจากยาเม็ดโรฮิปนอล ทำการเตรียมเช่นเดียวกับสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพมในข้างต้น

(2) สกัดฟลูไนตราซีแพมจากยาเม็ดโรฮิปนอลขนาด 1 มิลลิกรัม โดยใช้ยา 1 เม็ด สกัดด้วยคลอโรฟอร์มและน้ำปราศจากไอออน (Deionized water; DI water) (2:1 v/v) นำสารละลายชั้นคลอโรฟอร์มไประเหยตัวทำละลาย ทำการสกัดตัวอย่างซ้ำอีกครั้ง จากนั้นละลายตัวอย่างที่เหลือด้วยเอทานอล 25.00 มิลลิลิตร ดูดสารละลายตัวอย่างมา 250.0 ไมโครลิตร และปรับปริมาตรด้วยเอทานอลจนครบ 10.00 มิลลิลิตร

(3) วัดการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพม และสารละลายฟลูไนตราซีแพมจากยาเม็ดโรฮิปนอล ที่ผ่านการสกัดและไม่ได้ผ่านการสกัด ในช่วงความยาวคลื่น 200 – 500 นาโนเมตร

สำหรับการศึกษารูปแบบของสเปกตรัมการดูดกลืนแสงของฟลูไนตราซีแพม ที่ได้จากสารมาตรฐานฟลูไนตราซีแพมและยาเม็ดโรฮิปนอล ในตัวทำละลายเอทานอล มีขั้นตอนการทดลองดังต่อไปนี้

(1) เตรียมสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพม และสารละลายฟลูไนตราซีแพมจากยาเม็ดโรฮิปนอล จาก stock solution ของตัวอย่างแต่ละชนิด ที่ปริมาตร 125.0 250.0 375.0 500.0 และ 625.0 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรของสารละลายด้วยเอทานอล จนครบ 10.00 มิลลิลิตร จะได้สารละลายตัวอย่างที่มีความเข้มข้น 0.500 1.000 1.500 2.000 และ 2.500 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ

(2) วัดการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง ช่วงความยาวคลื่น 200 – 500 นาโนเมตร

(3) วิเคราะห์พื้นที่ใต้กราฟของสเปกตรัมการดูดกลืนแสง ช่วงความยาวคลื่น 240 ถึง 350 นาโนเมตร ของสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพม และสารละลายฟลูไนตราซีแพมจากยาเม็ดโรฮิปนอล และสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของฟลูไนตราซีแพมกับพื้นที่ใต้กราฟของสเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารละลาย

2.7.1.2 ศึกษาความเสถียรของสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพม

ในการศึกษาความเสถียรของสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพม เป็นการหาความเหมาะสมของระยะเวลาในการเก็บ stock solution ในการวิจัย stock solution ที่เตรียมแต่ละครั้ง จะใช้ในการวิจัยประมาณ 15 - 20 วัน ส่วนสารละลายฟลูไนตราซีแพมจากยาเม็ดโรฮิปนอล จะทำการเตรียม stock solution เพื่อใช้ครั้งต่อครั้ง ในการศึกษาความเสถียรของสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพม มีขั้นตอนดังนี้

(1) เตรียมสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพม ปริมาตร 37.5 มิลลิลิตร จาก stock solution ซึ่งมีความเข้มข้น 40.00 มิลลิกรัมต่อลิตร ปรับปริมาตรด้วยเอทานอล จนครบ 10.00 มิลลิลิตร จะได้สารละลายตัวอย่างที่มีความเข้มข้น 1.500 มิลลิกรัมต่อลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายตัวอย่าง ในช่วงความยาวคลื่น 200 - 500 นาโนเมตร

(2) เก็บตัวอย่างสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพม ปิดฝาขวดวัดปริมาตรให้สนิทและพันปากขวดด้วยพาราฟิล์ม (parafilm) อย่างแน่นหนา จากนั้นเก็บสารละลายตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิประมาณ 4 องศาเซลเซียส

(3) วัดการดูดกลืนแสงของสารละลายตัวอย่างที่เก็บไว้ ในวันที่ 5, 10 และ 20 นับจากวันแรกที่วัดการดูดกลืนแสง ในการวัดซ้ำวันที่ 5 10 และ 20 นั้น จะทำการวัดที่ความยาวคลื่นช่วงเดียวกัน และแต่ละครั้งทำการเก็บตัวอย่างเช่นเดียวกับข้อ (2)

(4) วิเคราะห์ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 253 และ 309 นาโนเมตร และพื้นที่ใต้กราฟของสเปกตรัมการดูดกลืนแสง ในช่วงความยาวคลื่น 240 – 275 และ 275 – 350 นาโนเมตร ของสารละลายตัวอย่างในแต่ละวัน

2.7.2 การตรวจพิสูจน์ฟลูไนตราซีแพมในเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ประเภทไม่มีสี ด้วยวิธีการโปรโตเนชัน

2.7.2.1 ศึกษาการดูดกลืนแสงและการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์เบื้องต้นของฟลูไนตราซีแพมที่ถูกโปรโตเนต

เป็นการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของสเปกตรัมการดูดกลืนแสงและการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์ของฟลูไนตราซีแพมหลังถูกโปรโตเนตด้วยกรด ในตัวทำละลายเอทานอล โดยมีขั้นตอนดังนี้

(1) เตรียมสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพม จาก stock solution ที่มีความเข้มข้น 40.00 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 750.0 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรด้วยเอทานอลจนครบ 10.00 มิลลิลิตร ได้สารละลายฟลูไนตราซีแพมที่มีความเข้มข้น 3.000 มิลลิกรัมต่อลิตร

(2) เตรียมสารละลายตัวอย่างกรดเปอร์คลอริกเข้มข้น 0.10 โมลาร์ จากกรดความเข้มข้น 11.47 โมลาร์ โดยใช้กรดปริมาตร 87.2 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรด้วยเอทานอลจนครบ 10.00 มิลลิลิตร

(3) เตรียมสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพม จาก stock solution ความเข้มข้น 40.00 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 750.0 ไมโครลิตร เติมด้วยกรดเปอร์คลอริกความเข้มข้น 11.47 โมลาร์ ปริมาตร 87.2 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรด้วยเอทานอลจนครบ 10.00 มิลลิลิตร เขย่าจนเป็นเนื้อเดียวกัน จะได้สารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพมที่ถูกโปรโตเนต

(4) วัดการดูดกลืนแสงของตัวอย่างทั้ง 3 ในช่วงความยาวคลื่น 200 – 500 นาโนเมตร และนำไปวัดการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์ โดยใช้ความยาวคลื่นที่เกิดการดูดกลืนแสงสูงสุดของสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพมที่ถูกโปรโตเนต เป็นความยาวคลื่นกระตุ้นชั่วคราว นั่นคือ 280 นาโนเมตร จากนั้นวัดการเปล่งแสงของสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพมที่ถูกโปรโตเนตซ้ำ โดยใช้ความยาวคลื่นกระตุ้นที่ 250 260 270 280 290 และ 300 นาโน-เมตร

(5) วิเคราะห์รูปแบบของสเปกตราการดูดกลืนแสงและสเปกตรัมการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์ของสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพม สารละลายกรดเปอร์คลอริก และสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพมที่ถูกโปรโตเนต ในตัวทำละลายเอทานอล

(6) เปรียบเทียบค่าความเข้มของการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์ของสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพมที่ถูกโปรโตเนต เมื่อใช้ความยาวคลื่นกระตุ้นต่างๆ

2.7.2.2 ศึกษาชนิดและความเข้มข้นของกรดที่เหมาะสำหรับการตรวจพิสูจน์ฟลูไนตราซีแพม

กรดที่เลือกใช้ในการตรวจพิสูจน์สารฟลูไนตราซีแพมมี 5 ชนิด เป็นกรดแก่ 4 ชนิด คือ กรดไฮโดรคลอริก (Hydrochloric acid) กรดไนตริก (Nitric acid) กรดเปอร์คลอริก (Perchloric acid) และกรดซัลฟิวริก (Sulfuric acid) และกรดอ่อน 1 ชนิด คือ กรดอะซิติก (acetic acid) โดยจะใช้กรดแต่ละชนิดจากกรดเข้มข้นโดยตรง จึงได้คำนวณหาความเข้มข้นสูงสุดของกรดแต่ละชนิดจากฉลากขวด และได้แสดงไว้แล้วในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 แสดงความเข้มข้นสูงสุด คำนวณจากฉลากขวดของกรดแต่ละชนิด

ชนิดของกรด	ความเข้มข้นเริ่มต้น (โมลาร์)
กรดไฮโดรคลอริก	12.08
กรดเปอร์คลอริก	11.47
กรดไนตริก	14.44
กรดซัลฟิวริก	18.00
กรดอะซิติก	17.45

โดยทำการเตรียมตัวอย่าง ดังต่อไปนี้

(1) เตรียมสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพม โดยทำการเจือจางจาก stock solution ซึ่งมีความเข้มข้น 40.00 มิลลิกรัมต่อลิตร ด้วยปริมาตร 0.2500 มิลลิลิตร จากนั้นปรับปริมาตรจนครบ 10.00 มิลลิลิตร ด้วยตัวทำละลายเอทานอล จะได้สารละลายตัวอย่างที่มีความเข้มข้น 1.000 มิลลิกรัมต่อลิตร

(2) เตรียมสารละลายตัวอย่างกรดแต่ละชนิด ที่ความเข้มข้น 0.1000 โมลาร์ ในตัวทำละลายเอทานอล ที่ปริมาตรรวม 10.00 มิลลิลิตร วัดค่าการนำไฟฟ้าของสารละลายตัวอย่างกรดแต่ละชนิด

(3) เตรียมสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพมที่ถูกโปรโตเนตด้วยกรดแต่ละชนิด โดยการเตรียมกรดแต่ละชนิดความเข้มข้นของ $[H^+]$ 0.1000 โมลาร์ เติมสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพมความเข้มข้น 40.00 มิลลิกรัมต่อลิตร ลงไป 250.0 ไมโครลิตร ในสารละลายกรดที่เตรียมไว้ แล้วปรับปริมาตรด้วยตัวทำละลายเอทานอลจนครบ 10.00 มิลลิลิตร เขย่าให้สารละลายตัวอย่างเป็นเนื้อเดียวกัน

(4) นำสารละลายตัวอย่างทั้งหมด ในข้อ (1) – (3) วัดการดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่น 200 – 500 นาโนเมตร โดยใช้ตัวทำละลายเอทานอลเป็น blank ในการวัดค่าการดูดกลืนแสง และทำ baseline correction โดยลบค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายตัวอย่างกรด ออกจากค่าการดูดกลืนแสงสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพม ที่ถูกเติมด้วยกรดชนิดนั้นๆ ที่ความยาวคลื่นเดียวกัน ผลจากการทำ baseline correction จะได้เป็นสเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพมที่ถูกโปรโตเนตด้วยกรดชนิดนั้นๆ

(5) วัดการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์ของสารละลายตัวอย่างทั้งหมด ช่วงความยาวคลื่น 300 – 540 นาโนเมตร โดยใช้ความยาวคลื่นกระตุ้นที่ 280 นาโนเมตร และวิเคราะห์หาพื้นที่ใต้กราฟของสเปกตรัมการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์ ในช่วงความยาวคลื่น 420 – 530 นาโนเมตร

(6) เลือกชนิดของกรดที่เหมาะต่อการตรวจพิสูจน์ฟลูไนตราซีแพม จากกรดที่ให้ความเข้มของการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์สูงสุด โดยเปรียบเทียบจากค่าความเข้มของการเปล่งแสงและพื้นที่ใต้กราฟของสเปกตรัมการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์

จากการวิเคราะห์ข้างต้น พบว่ากรดที่เหมาะที่สุด คือ กรดเปอร์คลอริก ดังนั้นในลำดับต่อไปจึงเป็นการหาความเข้มข้นของกรดเปอร์คลอริก ที่จะใช้ในการตรวจพิสูจน์ฟลูไนตราซีแพม โดยมีขั้นตอนดังนี้

(1) เตรียมสารละลายตัวอย่างกรดเปอร์คลอริกที่ความเข้มข้น 1.000 2.000 3.000 4.000 และ 5.000 โมลาร์ จากกรดเข้มข้น 11.47 โมลาร์ โดยใช้ปริมาตรกรดเข้มข้น 0.87 1.74 2.62 3.49 และ 4.36 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยตัวทำละลายเอทานอล จนครบ 10.00 มิลลิลิตร

(2) เตรียมสารละลายตัวอย่างกรดเปอร์คลอริก ที่ความเข้มข้น 1.000 2.000 3.000 4.000 และ 5.000 โมลาร์ เช่นเดียวกับข้อ (1) เติมสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพม ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร จาก stock solution ซึ่งมีความเข้มข้น 40.00 มิลลิกรัมต่อลิตร ปรับปริมาตรของตัวอย่าง ด้วยตัวทำละลายเอทานอลจนครบ 10.00 มิลลิลิตร เขย่าจนสารละลายตัวอย่างเป็นเนื้อเดียวกัน

(3) วัดการดูดกลืนแสงของสารละลายตัวอย่าง ในช่วงความยาวคลื่น 200 ถึง 500 นาโนเมตร และวัดการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์ของสารละลายตัวอย่าง ในช่วงความยาวคลื่น 300 – 540 นาโนเมตร โดยใช้ความยาวคลื่นกระตุ้น 280 นาโนเมตร

(4) เลือกความเข้มข้นของกรดเปอร์คลอริกที่เหมาะสม จากค่าความเข้มของการเปล่งแสงและพื้นที่ใต้กราฟของสเปกตรัมการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์

2.7.2.3 ศึกษาความเข้มข้นที่ต่ำสุดของฟลูไนตราซีแพม ที่สามารถทำการตรวจพิสูจน์ได้ด้วยวิธีการโปรโตเนชัน

เป็นการศึกษาขีดจำกัดความสามารถของวิธีการตรวจพิสูจน์ฟลูไนตราซีแพม โดยการโปรโตเนตด้วยกรดเปอร์คลอริก ด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี คือ การวิเคราะห์การดูดกลืนแสงและการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์ของสารละลายตัวอย่าง ตามสภาวะที่ใช้ในการวิจัย โดยมีขั้นตอนดังนี้

(1) เตรียมสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพม และสารละลายฟลูไนตราซี-แพมจากยาเม็ดโรฮิปนอล โดยเจือจางจาก stock solution ของแต่ละชนิด ให้มีความเข้มข้นของสารละลายตัวอย่างที่ 0.100 0.500 1.000 2.000 3.000 4.000 และ 5.000 มิลลิกรัมต่อลิตร ในขวดวัดปริมาตรขนาด 10.00 มิลลิลิตร

(2) เติมกรดเปอร์คลอริกความเข้มข้น 11.47 โมลาร์ 1.74 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรของสารละลายตัวอย่างด้วยตัวทำละลายเอทานอลจนครบ 10.00 มิลลิลิตร เขย่าจนสารละลายตัวอย่างเป็นเนื้อเดียวกัน

(3) วัดการดูดกลืนแสงของสารละลายตัวอย่าง ช่วงความยาวคลื่น 200–500 นาโนเมตร และวัดการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์ ในช่วงความยาวคลื่น 300–540 นาโนเมตร ที่ความยาวคลื่นกระตุ้น 280 นาโนเมตร จากนั้นหาพื้นที่ใต้กราฟของสเปกตรัมการเปล่งแสงในช่วงความยาวคลื่น 420 - 530 นาโนเมตร

2.7.2.4 การตรวจพิสูจน์ฟลูไนตราซีแพมในเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ประเภทไม่มีสี

เพื่อประเมินความเป็นไปได้ของวิธีการ ต่อการประยุกต์ใช้เพื่อการตรวจพิสูจน์ฟลูไนตราซีแพมเบื้องต้นในเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ อันเป็นวัตถุประสงค์หลักของงานวิจัยนี้ โดยมีขั้นตอนดังต่อไปนี้

(1) เตรียมสารละลายตัวอย่าง Vodka โดยใช้ Vodka 1.00 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยเอทานอลจนครบ 10.00 มิลลิตร เขย่าจนสารละลายตัวอย่างเป็นเนื้อเดียวกัน

(2) เตรียม Vodka 1.000 มิลลิลิตร เติมด้วยกรดเปอร์คลอริกความเข้มข้น 11.47 โมลาร์ ปริมาตร 1.74 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยเอทานอล จนครบ 10.00 มิลลิลิตร เขย่าจนสารละลายตัวอย่างเป็นเนื้อเดียวกัน

(3) เตรียมสารละลายฟลูไนตราซีแพม ที่ความเข้มข้น 0.500 1.000 2.000 3.000 4.000 และ 5.000 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยเจือจางจาก stock solution ความเข้มข้น

40.00 มิลลิกรัมต่อลิตร ในขวดวัดปริมาตร 10.00 มิลลิลิตร เติม Vodka 1.00 มิลลิลิตร เขย่าให้สารละลายตัวอย่างเข้ากัน จากนั้นเติมกรดเปอร์คลอริกความเข้มข้น 11.47 โมลาร์ ปริมาตร 1.74 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรทั้งหมดด้วยตัวทำละลายเอทานอลจนครบ 10.00 มิลลิลิตร เขย่าให้สารละลายตัวอย่างผสมเป็นเนื้อเดียวกัน

(4) วัดการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์ของสารละลายตัวอย่างทั้งหมด ช่วงความยาวคลื่น 300 - 540 นาโนเมตร ที่ความยาวคลื่นกระตุ้น 280 นาโนเมตร หาพื้นที่ใต้กราฟของสเปกตรัมการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์ของสารละลายตัวอย่าง ช่วงความยาวคลื่น 420 – 530 นาโนเมตร

(5) ทำการทดลองซ้ำทั้งหมด โดยเปลี่ยนจากเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ Vodka เป็น Tequila แต่คงสภาวะในการทดลองอื่นๆไว้เหมือนเดิม

2.7.3 การตรวจพิสูจน์ฟลูไนตราซีแพมในเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ประเภทมีสี ด้วยปฏิกิริยาโฟโตคะตะไลซิส

2.7.3.1 ศึกษาชนิดของโลหะออกไซด์ที่เหมาะสำหรับการวิเคราะห์

เนื่องจากหลอดไฟที่ใช้เป็นแหล่งพลังงานในปฏิกิริยาการเร่งเชิงแสง หรือโฟโตคะตะไลซิสนั้น ให้ความยาวคลื่น 360 นาโนเมตร จากการศึกษาข้อมูล พบว่าโลหะออกไซด์ที่สามารถถูกกระตุ้นได้ด้วยพลังงานในที่ความยาวคลื่นดังกล่าว คือ ซิงค์ออกไซด์และไทเทเนียมไดออกไซด์ การหาชนิดโลหะออกไซด์ที่เหมาะสมต่อการตรวจพิสูจน์ฟลูไนตราซีแพม ด้วยปฏิกิริยาโฟโตคะตะไลซิส มีรายละเอียดดังนี้

(1) เตรียมสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพม โดยการเจือจางจาก stock solution ความเข้มข้น 40.00 มิลลิกรัมต่อลิตร 0.38 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยโซดาจนครบ 10.00 มิลลิกรัม เขย่าให้สารละลายเข้าเป็นเนื้อเดียวกัน

(2) เตรียมสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพมเช่นเดียวกับข้อ (1) จากนั้นเทลงในหลอดทดลองสำหรับการฉายแสง ภายในหลอดทดลองมีซิงค์ออกไซด์ 0.0800 กรัม เขย่าให้สารละลายเข้ากัน

(3) เตรียมสารละลายตัวอย่างเช่นเดียวกับข้อ (2) โดยเปลี่ยนชนิดของโลหะออกไซด์ เป็นไทเทเนียมไดออกไซด์ โดยคงน้ำหนักของโลหะออกไซด์ไว้ที่ 0.0800 กรัม

(4) ใส่แท่งแม่เหล็กกวนสาร 1 อัน ในหลอดทดลองสารละลายตัวอย่างข้อ (2) และ (3) ปิดปากหลอดทดลองและพันด้วยพาราฟิล์มอย่างแน่นหนา ขีดระดับของสารละลาย

ข้างหลอดทดลองยาวประมาณ 1.00 เซนติเมตร แล้วจึงนำสารละลายตัวอย่างทั้งหมดฉายแสงอัลตราไวโอเลต พร้อมกวนสารตลอดเวลาที่ทำการฉายแสง ใช้ระดับความแรงในการกวนสารที่ทำให้โลหะออกไซด์กระจายทั่วทั้งตัวอย่าง เป็นระยะเวลา 2 ชั่วโมง (เวลาที่ใช้เป็นการคาดคะเนเวลาที่โลหะออกไซด์อิ่มตัวในการเกิดปฏิกิริยา)

(5) วัดระดับของสารละลายจากเส้นที่ขีดไว้ข้างหลอดทดลอง และวัดอุณหภูมิของสารละลายตัวอย่างหลังทำการฉายแสงครบ 2 ชั่วโมงทันที จากนั้นทิ้งให้สารละลายตัวอย่างเย็นลงที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที แล้วนำสารละลายตัวอย่างไปทำการหมุนเหวี่ยง ด้วยความเร็ว 3500 รอบต่อนาที นาน 5 นาที เทเก็บเฉพาะส่วนที่เป็นสารละลายไว้ ระวังอย่าให้ตะกอนของออกไซด์ฟุ้งกระจาย

(6) นำสารละลายตัวอย่างทั้งหมดไปวัดการดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่น 200 – 500 นาโนเมตร โดยใช้โซดาเป็น blank ในการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายตัวอย่าง ประเมินการเปลี่ยนแปลงของสารละลายตัวอย่างจากสเปกตรัมการดูดกลืนแสงที่วัดได้

2.7.3.2 ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการตรวจพิสูจน์ฟลูไนตราซีแพม ด้วยปฏิกิริยาโฟโตคะตะไลซิส

ความร้อนเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่อาจส่งผลต่อการเกิดปฏิกิริยาทางเคมีได้ ดังนั้นจึงได้ทำการศึกษาเรื่องของอุณหภูมิ ต่อผลการวิเคราะห์สารฟลูไนตราซีแพมด้วยปฏิกิริยาโฟโตคะตะไลซิส โดยมีขั้นตอนดังนี้

(1) เตรียมสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพม เจือจางจาก stock solution ความเข้มข้น 40.00 มิลลิกรัมต่อลิตร ด้วยปริมาตร 0.38 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยโซดาจนครบ 10.00 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลองสำหรับฉายแสง ภายในหลอดทดลองมีซิงค์ออกไซด์ปริมาณ 0.0800 กรัม เขย่าให้สารละลายเข้ากัน เตรียมทั้งหมด 5 ชุด

(2) ใส่แท่งแม่เหล็กกวนสารในหลอดทดลองตัวอย่างละ 1 อัน ปิดปากหลอดทดลองและพันปากหลอดทดลองด้วยพาราฟิล์มอย่างแน่นหนา ทำการฉายแสงอัลตราไวโอเลตพร้อมกวนสารละลายตัวอย่างในขณะที่ฉายแสง เป็นระยะเวลา 30 นาที โดยให้อุณหภูมิขณะทำการฉายแสง แต่ละชุดตัวอย่าง ดังนี้

ชุดที่ 1 ให้อุณหภูมิขณะฉายแสง 35.0 องศาเซลเซียส
ชุดที่ 2 ให้อุณหภูมิขณะฉายแสง 50.0 องศาเซลเซียส
ชุดที่ 3 ให้อุณหภูมิขณะฉายแสง 65.0 องศาเซลเซียส
ชุดที่ 4 ให้อุณหภูมิขณะฉายแสง 80.0 องศาเซลเซียส
ชุดที่ 5 ให้อุณหภูมิขณะฉายแสง 95.0 องศาเซลเซียส

อุณหภูมิขณะฉายแสง เป็นการตั้งค่าอุณหภูมิของเครื่องให้ความร้อนแบบกวนสารได้ ตามอุณหภูมิของแต่ละชุดสารละลายตัวอย่าง ก่อนทำการทดลองจะปล่อยให้อุณหภูมิของเครื่องให้ความร้อนคงที่เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเตรียมเอทานอลปริมาตร 0.38 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยโซดาจนครบ 10.00 มิลลิลิตร เทในหลอดทดลองที่มีซิงค์ออกไซด์ นำไปฉายแสงอัลตราไวโอเลตพร้อมกวนสารตลอดเวลา เป็นระยะเวลา 30 นาที หลังการฉายแสง วัดอุณหภูมิของตัวอย่างซ้ำอีกครั้ง

(3) หลังผ่านการฉายแสงอัลตราไวโอเลต พักสารละลายตัวอย่างประมาณ 5 นาที จากนั้นทำการหมุนเหวี่ยงสารละลายตัวอย่างด้วยความเร็ว 3500 รอบต่อนาที นาน 5 นาที เก็บส่วนที่เป็นสารละลาย นำไปวัดการดูดกลืนแสงช่วงความยาวคลื่น 200 – 500 นาโน-เมตร โดยใช้โซดาเป็น blank ในการวัดการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง

2.7.3.3 ศึกษาระยะเวลาในการฉายแสงอัลตราไวโอเลตที่เหมาะสมต่อการตรวจพิสูจน์ฟลูไนตราซีแพม ด้วยปฏิกิริยาโฟโตคะตะไลซิส

ขั้นตอนการศึกษาเรื่องระยะเวลาของการฉายแสงอัลตราไวโอเลต ที่เหมาะสมในการตรวจพิสูจน์ฟลูไนตราซีแพม มีดังต่อไปนี้

(1) เตรียมสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพม เจือจางจาก stock solution ความเข้มข้น 40.00 มิลลิกรัมต่อลิตร ด้วยปริมาตร 0.38 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยโซดาจนครบ 10.00 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลองสำหรับฉายแสง ที่มีซิงค์ออกไซด์ 0.0800 กรัม

(2) ใส่แท่งแม่เหล็กกวนสารในหลอดทดลองตัวอย่างละ 1 อัน ปิดปากหลอดทดลองและพันด้วยพาราฟิล์มอย่างแน่นหนา ฉายแสงอัลตราไวโอเลตให้กับสารละลายตัวอย่างพร้อมกวนสารตลอดเวลา ที่อุณหภูมิ 80.0 องศาเซลเซียส โดยระยะเวลาในการฉายแสงแบ่งเป็น 4 ชุดตัวอย่าง ดังนี้

ชุดที่ 1 กวนสารละลายตัวอย่างบนเครื่องให้ความร้อนแบบกวนสาร โดยไม่ต้องฉายแสงอัลตราไวโอเลต เป็นเวลานาน 30 นาที

ชุดที่ 2 ฉายแสงอัลตราไวโอเลตต่อเนื่องนาน 15 นาที

ชุดที่ 3 ฉายแสงอัลตราไวโอเลตต่อเนื่องนาน 30 นาที

ชุดที่ 4 ฉายแสงอัลตราไวโอเลตต่อเนื่องนาน 60 นาที

(3) นำสารละลายตัวอย่างทั้งหมด ทำการหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 3500 รอบต่อนาที นาน 5 นาที เทเก็บเฉพาะส่วนที่เป็นสารละลายไว้ ระวังการฟุ้งของตะกอนของซิงค์ออกไซด์ แล้วนำไปวัดการดูดกลืนแสง ในช่วงความยาวคลื่น 200 – 500 นาโนเมตร โดยใช้โซดาเป็น blank ในการวัดการดูดกลืนแสง

2.7.3.4 ศึกษาปริมาณโลหะออกไซด์ต่อผลการตรวจพิสูจน์ฟลูไนตราซีแพมด้วยปฏิกิริยาโฟโตคะตะไลซิส

ปริมาณที่มากหรือน้อยเกินไปของโลหะออกไซด์ อาจส่งผลต่อประสิทธิภาพของการตรวจพิสูจน์ฟลูไนตราซีแพมได้ การศึกษาในเรื่องนี้มีขั้นตอนดังนี้

(1) เตรียมสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพม เจือจางจาก stock solution ความเข้มข้น 40.00 มิลลิกรัมต่อลิตร ด้วยปริมาตร 0.380 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยโซดาจนครบ 10.00 มิลลิลิตร จำนวน 4 ชุด

(2) เทสารละลายฟลูไนตราซีแพมแต่ละชุดลงในหลอดทดลอง ที่มีปริมาณของซิงค์ออกไซด์ต่างกัน โดยชุดที่ 1 มีซิงค์ออกไซด์ 0.0500 กรัม ชุดที่ 2 มีซิงค์ออกไซด์ 0.0800 ชุดที่ 3 มีซิงค์ออกไซด์ 0.1000 กรัม และชุดที่ 4 เป็นหลอดทดลองที่ไม่มีซิงค์ออกไซด์ เพื่อใช้เป็นตัวอย่างควบคุม

(3) ใส่แท่งแม่เหล็กกวนสารในหลอดทดลองตัวอย่างละ 1 อัน ปิดปากหลอดทดลองและพันด้วยพาราฟิล์มอย่างแน่นหนา นำสารละลายตัวอย่างทั้งหมดไปฉายแสงอัลตรา-ไวโอเลต พร้อมทั้งกวนสารตลอดเวลา นาน 30 นาที ที่อุณหภูมิ 80.0 องศาเซลเซียส

(4) หลังทำการฉายแสงเสร็จ พักสารละลายตัวอย่าง 5 นาที จากนั้นทำการหมุนเหวี่ยงสารละลายตัวอย่างชุดที่ 1 ถึง 3 ด้วยความเร็ว 3500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที แยกเก็บเฉพาะส่วนที่เป็นสารละลาย นำสารละลายตัวอย่างทั้งหมดวัดการดูดกลืนแสง ในช่วงความยาวคลื่น 200 – 500 นาโนเมตร โดยใช้โซดาเป็น blank ในการวัดการดูดกลืนแสง

2.7.3.5 ศึกษาผลของโลหะออกไซด์และแสงอัลตราไวโอเลตต่อการตรวจพิสูจน์ฟลูไนตราซีแพม ด้วยปฏิกิริยาโฟโตคะตะไลซิส

เพื่อศึกษาผลของโลหะออกไซด์และแสงอัลตราไวโอเลต ต่อการเกิดปฏิกิริยาโฟโตคะตะไลซิส โดยมีขั้นตอนดังนี้

(1) เตรียมสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพม เจือจางจาก stock solution ที่มีความเข้มข้น 40.00 มิลลิกรัมต่อลิตร ด้วยปริมาตร 0.38 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยโซดาจนครบ 10.00 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลองสำหรับฉายแสงที่มีแท่งแม่เหล็กกวนสาร แต่ไม่มีซิงค์ออกไซด์ ปิดปากหลอดทดลองให้สนิทและพันด้วยพาราฟิล์มอย่างแน่นหนา

(2) เตรียมสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพม เจือจางจาก stock solution ที่มีความเข้มข้น 40.00 มิลลิกรัมต่อลิตร ด้วยปริมาตร 0.38 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยโซดา

จนครบ 10.00 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลองสำหรับฉายแสง ที่มีแท่งแม่เหล็กกวนสาร 1 อันและซิงค์ออกไซด์หนัก 0.0800 กรัม ปิดปากหลอดทดลองและพันด้วยพาราฟิล์มอย่างแน่นหนา

(3) เตรียมสารละลายตัวอย่างข้อ (1) และ (2) อย่างละ 2 ชุด และทำการทดลอง ดังนี้

ชุดแรก วางสารละลายตัวอย่างบนเครื่องให้ความร้อนแบบกวนสาร ในกล่องสำหรับฉายแสงอัลตราไวโอเลต กวนสารตลอดเวลาเป็นนาน 30 นาที ที่อุณหภูมิ 80.0 องศาเซลเซียส โดยไม่ต้องฉายแสงอัลตราไวโอเลต

ชุดที่สอง ทำการฉายแสงอัลตราไวโอเลตพร้อมทั้งกวนสารตลอดเวลา ต่อเนื่องเป็นระยะเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 80.0 องศาเซลเซียส

(4) หมุนเหวี่ยงสารละลายตัวอย่างที่มีซิงค์ออกไซด์ ด้วยความเร็ว 3500 รอบต่อนาที นาน 5 นาที เก็บเฉพาะส่วนที่เป็นสารละลายไว้

(5) วัดการดูดกลืนแสงของสารละลายตัวอย่างทั้งหมด ในช่วงความยาวคลื่น 200 – 500 นาโนเมตร โดยใช้โซดาเป็น blank ในการวัดการดูดกลืนแสง

2.7.3.6 ศึกษาความเข้มข้นต่ำสุดของฟลูไนตราซีแพมที่สามารถตรวจพิสูจน์ได้ด้วยปฏิกิริยาโฟโตคะตะไลซิส

เป็นการศึกษาขีดจำกัดความสามารถของการใช้ปฏิกิริยาโฟโตคะตะไลซิส ในการตรวจพิสูจน์ฟลูไนตราซีแพม ในสภาวะที่ทำการวิจัย โดยมีขั้นตอนดังนี้

(1) เตรียมตัวอย่างสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพม และสารละลายฟลู-ไนตราซีแพมจากยาเม็ดโรฮิปนอล ที่ความเข้มข้น 0.050 0.100 0.250 0.500 1.000 และ 1.250 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยเจือจางจาก stock solution ความเข้มข้น 40.00 มิลลิกรัมต่อลิตร ของแต่ละตัวอย่าง ปรับปริมาตรของสารละลายตัวอย่างด้วยโซดาจนครบ 10.00 มิลลิลิตร

(2) เทตัวอย่างลงในหลอดทดลองสำหรับฉายแสง ซึ่งมีซิงค์ออกไซด์ 0.0800 กรัม ใส่แท่งแม่เหล็กกวนสาร หลอดละ 1 อัน ปิดปากหลอดให้สนิทและพันด้วยพาราฟิล์ม

(3) นำตัวอย่างไปฉายแสงอัลตราไวโอเลต พร้อมทั้งกวนสารตลอด นาน 30 นาที โดยใช้อุณหภูมิขณะฉายแสง เท่ากับ 80.0 องศาเซลเซียส

(4) หลังจากฉายแสงอัลตราไวโอเลตเรียบร้อยแล้ว พักสารละลายตัวอย่าง 5 นาที แล้วทำการหมุนเหวี่ยงสารละลายตัวอย่างด้วยความเร็ว 3500 รอบต่อนาที นาน 5 นาที

(5) นำส่วนที่เป็นสารละลายไปวัดการดูดกลืนแสง ในช่วงความยาวคลื่น 200 – 500 นาโนเมตร โดยใช้โซดาเป็น blank ในการวัดการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง

2.7.3.7 การตรวจพิสูจน์ฟลูไนตราซีแพมในเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ประเภทมีสี

เป็นการทดสอบวิธีการต่อการนำไปใช้ในสถานการณ์จริงและเพื่อให้ใกล้เคียงกับตัวอย่างจริง ที่มีการผสมฟลูไนตราซีแพมจากยาเม็ดในเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ โดยขั้นตอนในการทดลอง มีดังต่อไปนี้

(1) เตรียมสารละลายตัวอย่างเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ MASTER BLEND 0.25 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยโซดาจนครบ 10.00 มิลลิลิตร

(2) เตรียมสารละลายตัวอย่างเช่นเดียวกับข้อ (1) เทใส่หลอดทดลองสำหรับฉายแสง ที่มีซิงค์ออกไซด์ 0.0800 กรัม ใส่แท่งแม่เหล็กกวนสาร 1 อัน และปิดปากหลอดทดลองให้สนิท พันด้วยพาราฟิล์มอย่างแน่นหนา

(3) เตรียมเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ MASTER BLEND ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร เติมด้วยสารละลายฟลูไนตราซีแพมจากยาเม็ดโรฮิปนอล ความเข้มข้น 40.00 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 62.5 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรด้วยโซดาจนครบ 10.00 มิลลิลิตร เทใส่หลอดทดลองสำหรับฉายแสง ที่มีซิงค์ออกไซด์ 0.0800 กรัม ใส่แท่งแม่เหล็กกวนสาร และปิดปากหลอดทดลองให้สนิท พันด้วยพาราฟิล์มอย่างแน่นหนา

(4) นำสารละลายตัวอย่างทั้งหมด ฉายแสงอัลตราไวโอเลต ที่อุณหภูมิ 80.0 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที พร้อมทั้งกวนสารละลายตัวอย่างตลอดเวลาที่ทำการฉายแสง

(5) พักสารตัวอย่างหลังจากฉายแสงอัลตราไวโอเลต 5 นาที จากนั้นทำการหมุนเหวี่ยงตัวอย่างด้วยความเร็ว 3500 รอบต่อนาที นาน 5 นาที เก็บตัวอย่างเฉพาะส่วนที่เป็นสารละลาย นำไปวัดการดูดกลืนแสง ในช่วงความยาวคลื่น 200 – 500 นาโนเมตร โดยใช้โซดาเป็น blank

(6) ทำการทดลองซ้ำ ด้วยวิธีการทดลองเช่นเดียวกับข้อ (1) – (5) แต่เปลี่ยนชนิดเครื่องดื่มแอลกอฮอล์เป็น 100 PIPERS และ REGENCY โดยคงปริมาณของเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ไว้ที่ 0.25 มิลลิลิตร

2.7.4 ศึกษาโครงสร้างและการแตกตัวของโครงสร้างสารฟลูไนตราซีแพม

(1) เตรียมสารละลายฟลูไนตราซีแพม ความเข้มข้น 10.00 มิลลิกรัมต่อลิตร ในขวดวัดปริมาตร 10.00 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยโซดาจนครบ 10.00 มิลลิลิตร วัดการดูดกลืนแสง ในช่วงความยาวคลื่น 200 – 500 นาโนเมตร จากนั้นเก็บสารละลายตัวอย่างไว้ในขวดวัดปริมาตรเช่นเดิม ปิดปากขวดและพันด้วยพาราฟิล์ม

(2) เตรียมสารละลายฟลูไนตราซีแพม ความเข้มข้น 10.00 มิลลิกรัมต่อลิตร ในขวดวัดปริมาตร 10.00 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยโซดาจนครบ 10.00 มิลลิลิตร ทำการฉายแสงอัลตราไวโอเลต ที่อุณหภูมิ 80.0 องศาเซลเซียส โดยมีซิงค์ออกไซด์ 0.0800 กรัม เป็นตัวกระตุ้นปฏิกิริยา ขณะฉายแสงได้กวนสารละลายตลอดเวลา ระยะเวลาที่ใช้ในการฉายแสง 30 นาที จากนั้นนำตัวอย่างไปทำการหมุนเหวี่ยง ที่ความเร็ว 3500 รอบต่อนาที นาน 5 นาที เก็บส่วนที่เป็นสารละลายใส่ขวดวัดปริมาตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่น 200 – 500 นาโนเมตร เก็บสารละลายตัวอย่างไว้ในขวดวัดปริมาตรดังเดิม ปิดปากขวดและพันด้วยพาราฟิล์ม

(3) เตรียมสารละลายฟลูไนตราซีแพม ความเข้มข้น 10.00 มิลลิกรัมต่อลิตร ในขวดวัดปริมาตร 10.00 มิลลิลิตร เติมกรดเปอร์คลอริกความเข้มข้น 11.47 โมลาร์ 1.744 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยเอทานอล จนครบ 10.00 มิลลิลิตร เขย่าจนสารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน นำไปวัดการดูดกลืนแสง ช่วงความยาวคลื่น 200 – 500 นาโนเมตร และวัดการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์ ช่วงความยาวคลื่น 300 – 540 นาโนเมตร โดยใช้ความยาวคลื่นกระตุ้นที่ 280 นาโนเมตร จากนั้นเก็บสารละลายตัวอย่างไว้ในขวดวัดปริมาตรเช่นเดิม ปิดปากขวดและพันด้วยพาราฟิล์มอย่างแน่นหนา

(4) ส่งสารละลายตัวอย่างตรวจวิเคราะห์ทางเทคนิคแมสสเปกโทรเมทรี ที่ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์วิทยาเขตหาดใหญ่ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา

บทที่ 3

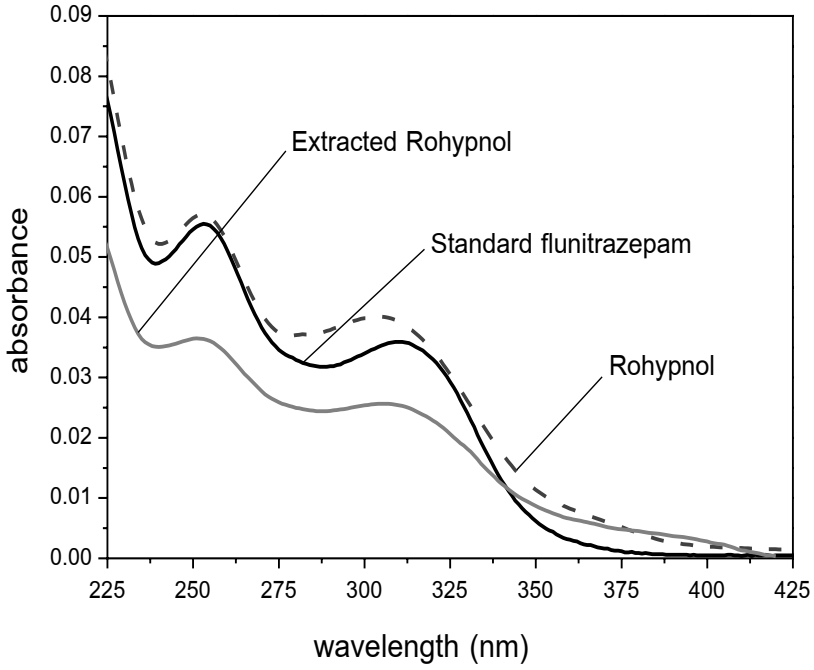
ผลการทดลอง

3.1 สมบัติทางกายภาพของสารมาตรฐานฟลูไนตราซีแพมและยาเม็ดโรฮิปนอล

สารมาตรฐานฟลูไนตราซีแพม (flunitrazepam standard) มีลักษณะเป็นผงละเอียดสีขาว สามารถละลายได้ดีในตัวทำละลายเมทานอล (methanol) เอทานอล (ethanol) และคลอโรฟอร์ม (chloroform) สารละลายมีลักษณะใส ไม่มีสีและกลิ่น ค่าพีเอช (pH) เท่ากับ 7.1 ในตัวทำละลายเอทานอล ฟลูไนตราซีแพมมีฤทธิ์เป็นเบสอ่อน เนื่องจากตำแหน่งที่ 1 และ 4 ของโครงสร้างฟลูไนตราซีแพม มีไนโตรเจนอะตอมและฟลูออรีนบนวงแหวนฟีนิล (phenyl) ที่มีอิเล็กตรอนคู่โดดเดี่ยวเหลืออิสระเคลื่อนที่ (Malanciuc *et al*., 2009) ทำให้ฟลูไนตราซีแพมมีความสามารถในการเกิดปฏิกิริยาโปรโตเนชัน (protonation)

ยาเม็ดโรฮิปนอล (Rohypnol®) ขนาด 1 มิลลิกรัม มีลักษณะเป็นเม็ดทรงรี สีฟ้าเขียว น้ำหนักประมาณ 0.1778 กรัมต่อเม็ด เมื่อทำการบดเม็ดยา จะได้เป็นผงสีขาวปนฟ้า ซึ่งมีค่าพีเอช (pH) เท่ากับ 6.8 ในตัวทำละลายเอทานอล องค์ประกอบของสารต่างๆในยาเม็ดโรฮิปนอล 1 เม็ด ประกอบด้วยสารฟลูไนตราซีแพม 1 มิลลิกรัม และสารประกอบอื่นๆ ได้แก่ แลคโตส (lactose) ไมโครคริสตัลลีนเซลลูโลส (microcrystalline cellulose) ไฮดรอกซีโพรพิลเมทิลเซลลูโลส (hydroxypropyl methylcellulose) โพลีวิโดน (polyvidone) โซเดียมสตาร์ชไกลโคเลท (sodium starch glycolate) อินดิโกติน (indigotine) แมกนีเซียมสเตียเรท (magnesium stearate) เอทิลเซลลูโลส (ethylcellulose) ทัลค (talc) ไทเทเนียมไดออกไซด์ (titanium dioxide) โลหะออกไซด์ (yellow iron oxide) และไตรอะซีติน (triacetin) (ข้อมูลจากเอกสารกำกับยาเม็ดโรฮิปนอล) เมื่อละลายในเอทานอล ได้สารละลายที่มีสีฟ้าใสมีตะกอนสีขาว และเมื่อทำการแยกสารฟลูไนตราซีแพมออกจากเม็ดยา ด้วยเทคนิคการสกัดแบบ Liquid – Liquid extraction โดยใช้ตัวทำละลายคลอโรฟอร์มและน้ำปราศจากไอออน (deionized water) ในอัตราส่วน 2:1 ฟลูไนตราซีแพมจากยาเม็ดละลายได้ดีในชั้นคลอโรฟอร์ม โดยสารละลายที่ได้มีลักษณะขุ่น ไม่มีสี สำหรับองค์ประกอบอื่นๆในเม็ดยาละลายได้ดีในชั้นน้ำ และให้สารละลายเป็นสีฟ้าใส

การดูดกลืนแสง (Absorption) ของสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพม และสารละลายฟลูไนตราซีแพมจากยาเม็ดโรฮิปนอลที่ผ่านการสกัด และสารละลายฟลูไนตราซีแพมจากยาเม็ดโรฮิปนอลที่ไม่ผ่านการสกัด เกิดขึ้นในช่วงความยาวคลื่น 230 – 425 นาโนเมตร โดยความยาวคลื่นที่เกิดการดูดกลืนแสงสูงสุด (ς_{max}) ของสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพมในเอทานอล และสารละลายฟลูไนตราซีแพมจากยาเม็ดโรฮิปนอลที่ผ่านการสกัดในคลอโรฟอร์มมีลักษณะของแถบการดูดกลืนแบบเดียวกันที่ความยาวคลื่น 253 และ 309 นาโนเมตร สำหรับการดูดกลืนแสงสูงสุดของสารละลายฟลูไนตราซีแพมจากยาเม็ดโรฮิปนอลที่ไม่ผ่านการสกัด ในเอทานอล เกิดการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 253 และ 304 นาโนเมตร (รูปที่ 16)

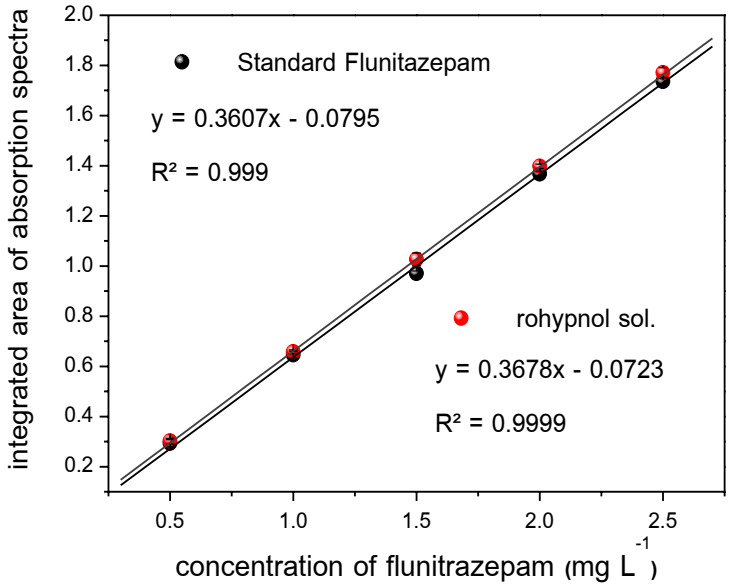


รูปที่ 16 แสดงสเปกตราการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพม สารละลายยาเม็ดโรฮิปนอลที่ผ่านการสกัด และสารละลายยาเม็ดโรฮิปนอลที่ไม่ผ่านการสกัด ที่ความเข้ม 1.000 มิลลิกรัมต่อลิตร ในตัวทำละลายเอทานอล

สำหรับวัตถุประสงค์ของการสกัดยาเม็ดโรฮิปนอลก่อนวัดการดูดกลืนแสง เพื่อศึกษาผลขององค์ประกอบอื่นๆ ที่มีในเม็ดยาต่อการดูดกลืนแสงของฟลูไนตราซีแพม และจากการศึกษาการดูดกลืนแสงของสารละลายยาเม็ดโรฮิปนอลที่ผ่านการสกัด พบว่าเกิดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นเดียวกับสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพม จึงสรุปว่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 253 และ 309 นาโนเมตร เป็นตำแหน่งที่แสดงถึงการดูดกลืนแสงของสารฟลูไนตราซีแพมในเอทานอล อย่างแท้จริง แต่ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นที่เกิดการ

ดูดกลืนแสงสูงสุดของสารละลายฟลูไนตราซีแพมจากยาเม็ดโรฮิปนอล ที่ผ่านการสกัด มีค่าต่ำกว่าสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพมและสารละลายฟลูไนตราซีแพมที่ไม่ผ่านการสกัด คิดเป็น 65.66% และ 71.00% ตามลำดับ ที่ความเข้มข้นของฟลูไนตราซีแพมเท่ากัน ซึ่งอาจเป็นผลจากการสกัดไม่สมบูรณ์หรือมีการสูญเสียสารฟลูไนตราซีแพม ในระหว่างขั้นตอนการสกัดสาร ดังนั้นการสกัดฟลูไนตราซีแพมจากเม็ดยาก่อนทำการวิเคราะห์ ไม่เหมาะต่อการนำมาใช้เพื่อตรวจพิสูจน์ฟลูไนตราซีแพมในตัวอย่าง

สำหรับการดูดกลืนแสงของฟลูไนตราซีแพมของสารละลายมาตรฐานและสารละลายยาเม็ดโรฮิปนอลที่ไม่ผ่านการสกัด ในตัวทำละลายเอทานอล พบว่า ค่าการดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของฟลูไนตราซีแพมในสารละลายตัวอย่าง ซึ่งเป็นไปตามกฎของเบียร์และแลมเบิร์ต (Beer – Lambert's Law) ที่ค่าการดูดกลืนแสงของสารมีความสัมพันธ์โดยตรงกับความเข้มข้นของสาร (ธีรศักดิ์ โรจนราธา, 2551) โดยการดูดกลืนแสงสูงสุดของสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพมและสารละลายฟลูไนตราซีแพมจากยาเม็ดโรฮิปนอลที่ไม่ผ่านการสกัดเกิดขึ้นที่ความยาวคลื่นใกล้เคียงกัน อีกทั้งค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 253 และ 309 นาโนเมตร ซึ่งเป็นตำแหน่งการดูดกลืนแสงสูงสุดของสารละลายมาตรฐานฟลูไน-ตราซีแพม ใกล้เคียงกับสารละลายยาเม็ดโรฮิปนอลที่ไม่ผ่านการสกัดมากกว่าสารละลายตัวอย่างยาเม็ดที่ผ่านการสกัด ดังนั้น การใช้สารละลายยาเม็ดโรฮิปนอลที่ไม่ผ่านการสกัดจึงเหมาะสมต่อการนำมาใช้เพื่อศึกษาการตรวจพิสูจน์ฟลูไนตราซีแพมในลำดับต่อไปมากกว่า



รูปที่ 17 แสดงกราฟมาตรฐานของพื้นที่ใต้กราฟของสเปกตรัมการดูดกลืนแสง ช่วงความยาวคลื่น 240 – 350 นาโนเมตร ของสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพม และสารละลายฟลูไนตราซีแพมจากยาเม็ดโรฮิปนอล ในตัวทำละลายเอทานอล

ตารางที่ 5 แสดงค่าการดูดกลืนแสงและพื้นที่ใต้กราฟของสเปกตรัมการดูดกลืนแสง ช่วงความยาวคลื่น 240 – 350 นาโนเมตร ของสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพม ในตัวทำละลายเอทานอล

ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น ($\bar{X}$ ±SD)		พื้นที่ใต้กราฟในช่วง 240 – 350 นาโนเมตร ($\bar{X}$ ±SD)
	253 นาโนเมตร	309 นาโนเมตร	
0.500	0.027 ± 0.001	0.017 ± 0.001	0.293 ± 0.015
1.000	0.054	0.036	0.646 ± 0.013
1.500	0.080	0.053	0.970 ± 0.010
2.000	0.111 ± 0.001	0.072 ± 0.001	1.368 ± 0.010
2.500	0.136 ± 0.001	0.088 ± 0.001	1.736 ± 0.016
สมการเส้นตรง y =	0.0547x - 0.0004	0.0356x - 0.0004	0.3607x - 0.0795
ความเป็นเส้นตรง	R^2 = 0.9993	R^2 = 0.9992	R^2 = 0.999
ε (M^{-1} cm^{-1})	17139	11147	

ตารางที่ 6 แสดงค่าการดูดกลืนแสงและพื้นที่ใต้กราฟของสเปกตรัมการดูดกลืนแสง ช่วงความยาวคลื่น 240 – 350 นาโนเมตร ของสารละลายฟลูไนตราซีแพมจากยาเม็ดโรฮิปนอล ในตัวทำละลายเอทานอล

ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น ($\bar{X}$ ±SD)		พื้นที่ใต้กราฟในช่วง 240 – 350 นาโนเมตร ($\bar{X}$ ±SD)
	253 นาโนเมตร	309 นาโนเมตร	
0.500	0.029	0.021	0.302 ± 0.011
1.000	0.058 ± 0.001	0.040± 0.001	0.658 ± 0.008
1.500	0.088 ± 0.001	0.062	1.026 ± 0.025
2.000	0.117	0.082	1.398 ± 0.008
2.500	0.148 ± 0.001	0.104± 0.001	1.771 ± 0.021
สมการเส้นตรง y =	0.0594x - 0.001	0.0414x - 0.0003	0.3678x - 0.0723
ความเป็นเส้นตรง	R^2 = 0.9996	R^2 = 0.9998	R^2 = 0.9999
ε (M^{-1} cm^{-1})	18605	12969	

อีกหนึ่งวิธี ที่เป็นการลดผลกระทบจากกรณีที่ baseline ไม่เท่ากันในแต่ละตัวอย่าง และกรณีที่เกิดการดูดกลืนแสงสูงสุดในช่วงความยาวคลื่นที่ใกล้เคียงกันหรือไม่มีความยาวคลื่นสูงสุดที่ชัดเจน การหาแนวโน้มของการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง คือ การหาพื้นที่ใต้กราฟของสเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างในช่วงความยาวคลื่นเดียวกัน จากรูปที่ 17 และข้อมูลในตารางที่ 5 และ 6 ผลการวิเคราะห์การดูดกลืนแสงและพื้นที่ใต้กราฟของสเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารละลายยาเม็ดโรฮิปนอล ภายใต้สภาวะที่ทำการวิจัย ในตารางที่ 5 และ 6 พบว่า ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 253 และ 309 นาโนเมตร และพื้นที่ใต้กราฟของสเปกตรัมการดูดกลืนแสงช่วงความยาวคลื่น 240 – 350 นาโนเมตร ของสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพมและสารละลายยาเม็ดโรฮิปนอล ที่ความเข้มข้นเดียวกัน มีค่าแตกต่างกันเพียงเล็กน้อยอย่างไม่มีนัยสำคัญ (ที่นัยสำคัญ 0.05) แสดงว่าองค์ประกอบอื่นๆในเม็ดยาโรฮิปนอลที่สามารถละลายได้ในตัวทำละลายเอทานอลนั้น ส่งผลต่อการวัดการดูดกลืนแสงของสารละลายฟลูไนตราซีแพมเพียงเล็กน้อย ซึ่งจากการทดสอบการละลายของฟลูไนตราซีแพมในยาเม็ดโร-ฮิปนอล ที่ได้ทำการเปรียบเทียบระหว่างการสกัดเม็ดยา และการไม่สกัดเม็ดยาก่อนทำการทดสอบ ดังที่ได้แสดงในรูปที่ 16 และข้อมูลตารางที่ 5 และ 6 สรุปได้ว่า ในการตรวจพิสูจน์ฟลูไนตราซีแพมจากตัวอย่างยาเม็ดโรฮิปนอล สามารถวิเคราะห์ได้โดยไม่ต้องผ่านกระบวนการสกัดแยกสารฟลูไนตราซีแพมออกจากตัวอย่าง เป็นการลดการสูญเสียสารฟลูไนตราซีแพมจากขั้นตอนการสกัด และคุณสมบัติของการตรวจพิสูจน์สารฟลูไนตราซีแพมจากยาเม็ดโรฮิปนอลโดยไม่ต้องผ่านการสกัดก่อนการวิเคราะห์นั้น ยังแสดงให้เห็นถึงความสะดวก และลดขั้นตอนความซับซ้อนของวิธีการวิเคราะห์สารฟลูไนตราซีแพมในตัวอย่างจริง ที่มีความน่าจะเป็นในการใช้ยาเม็ดที่มีฟลูไนตราซีแพมเป็นส่วนผสมมากกว่าการใช้สารมาตรฐานโดยตรง เนื่องจากราคาและความสะดวกในการหาซื้อ

ตารางที่ 7 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพม สารละลายยาเม็ดโรฮิปนอลที่ผ่านการสกัดและที่ไม่ผ่านการสกัดในตัวทำละลายเอทานอล

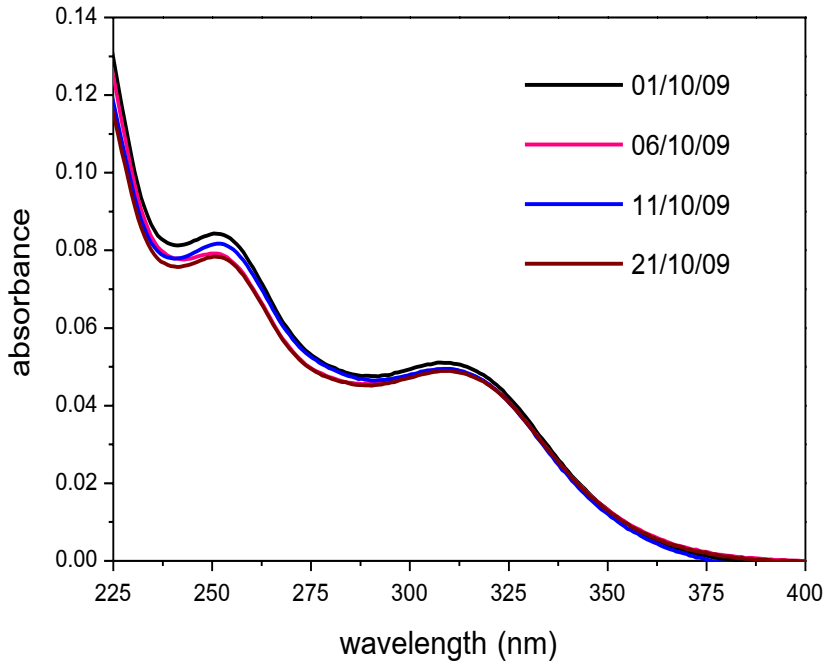
ตัวอย่างสารละลาย	ς_{max},nm (ε, M^{-1} cm^{-1})	
สารมาตรฐานฟลูไนตราซีแพม	253 (17390)	309 (11249)
ยาเม็ดโรฮิปนอลที่ผ่านการสกัด	253 (11405)	309 (8021)
ยาเม็ดโรฮิปนอลที่ไม่ผ่านการสกัด	253 (17879)	304 (12565)

จากข้อมูลตารางที่ 7 ที่ได้แสดงค่าโมลาร์แอบซอร์พติวิตี้ (molar absorptivity, ε) ซึ่งเป็นค่าคงที่ และเป็นคุณสมบัติเฉพาะตัวของสาร มีประโยชน์ต่อการวิเคราะห์สารทั้งในเชิงคุณภาพวิเคราะห์และปริมาณวิเคราะห์ และยังบอกขีดจำกัดของการวัด (detection limit) ในเบื้องต้นได้ โดยสารมีค่า ε มาก สามารถถูกตรวจวัดได้ที่ขีดจำกัดของการตรวจวัดต่ำกว่าสารที่มีค่า ε น้อย (ธีรศักดิ์ โรจนธารา, 2551) พบว่า สารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพมและสารละลายฟลูไนตราซีแพมจากยาเม็ดโรฮิปนอลในตัวทำละลายเอทานอล มีค่าโมลาร์แอบ-ซอร์พติวิตี้มากกว่า 10,000 M^{-1} cm^{-1} ในช่วงความยาวคลื่นที่มากกว่า 200 นาโนเมตร และจากรูปที่ 16 จะเห็นได้ว่า สารละลายฟลูไนตราซีแพมมีแถบการดูดกลืนแสงของสเปกตรัมที่กว้าง ซึ่งจากลักษณะดังกล่าวทั้งสอง คือ ค่า ε ที่สูงและแถบการดูดกลืนแสงที่กว้างนั้น มีความใกล้เคียงกับลักษณะเด่นของการดูดกลืนแสงของสารในกลุ่มวงแหวนอะโรมาติก (aromatic ring) และสารประกอบเฮทเทอโรไซคลิก (heterocyclic) และหากถ้ามีการแทนที่ขึ้นในวงแหวนอะโรมาติก จะทำให้ค่า ε นั้น มีค่ามากกว่า 10,000 M^{-1} cm^{-1} (แม้น. 2534) ซึ่งมีความสอดคล้องกัน ของค่า ε ที่คำนวณได้กับโครงสร้างโมเลกุลของสารฟลูไนตราซีแพม (รูปที่ 2) ที่มีวงแหวนอะโรมาติกและมีการแทนที่ของหมู่ไนโตร (NO_2)

นอกจากนี้ ค่า ε สามารถบอกถึงชนิดการทรานซิชันของอิเล็กตรอน (electron transition) ได้ โดยทั่วไปโมเลกุลที่มีการทรานซิชันของอิเล็กตรอนแบบ $n \Downarrow \phi^*$ จะมีค่า ε อยู่ในช่วงประมาณ 10 – 100 M^{-1} cm^{-1} และการทรานซิชันอิเล็กตรอนแบบ $\phi \Downarrow \phi^*$ จะมีค่า ε อยู่ในช่วงประมาณ 1,000 – 10,000 M^{-1} cm^{-1} (นิพนธ์และคณิตา ตังคณานุรักษ์, 2547) จากข้อมูลในตารางที่ 7 ได้แสดงค่า ε โดยการคำนวณจากค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นที่เกิดการดูดกลืนแสงสูงสุดของของสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพม สารละลายฟลูไนตรา-ซีแพมจากยาเม็ดโรฮิปนอลที่ผ่านการสกัด และสารละลายฟลูไนตราซีแพมจากยาเม็ดโรฮิปนอลที่ไม่ผ่านการสกัด ในตัวทำละลายเอทานอล พบว่ามีค่า ε อยู่ในช่วง 8,000 – 18,000 M^{-1} cm^{-1} แสดงว่าการทรานซิชันของอิเล็กตรอนของสารละลายฟลูไนตราซีแพมนั้นเป็นแบบ $\phi \Downarrow \phi^*$

3.2 ความเสถียรของสารละลายฟลูไนตราซีแพม

การทดสอบความเสถียรของสารละลายฟลูไนตราซีแพม เป็นการทดสอบจากสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพมในตัวทำละลายเอทานอล ที่ความเข้มข้น 1.500 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยการเปรียบเทียบลักษณะสเปกตรัมการดูดกลืนแสง ค่าการดูดกลืนแสง และพื้นที่ใต้กราฟของสเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพม เมื่อระยะเวลาผ่านไป 5 10 และ 20 วัน โดยสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพมที่นำมาวัดในแต่ละวันนั้นเป็นสารละลายตัวอย่างเดียวกับที่เตรียมขึ้นวันแรก และระหว่างการทดสอบได้ทำการเก็บรักษาสารละลายตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิประมาณ 4 องศาเซลเซียส



รูปที่ 18 แสดงสเปกตราการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพม ความเข้มข้น 1.500 มิลลิกรัมต่อลิตร ในตัวทำละลายเอทานอล หลังจากเตรียมสารละลาย 0, 5, 10 และ 20 วัน

จากสเปกตราการดูดกลืนแสงรูปที่ 18 พบว่าลักษณะของสเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพมในตัวทำละลายเอทานอล ช่วงระยะเวลา 20 วัน ยังคงให้รูปแบบของสเปกตรัมการดูดกลืนแสงที่เป็นลักษณะเดิม โดยมีแถบการดูดกลืนแสง 2 แถบ ในช่วงความยาวคลื่น 230 – 425 นาโนเมตร และมีความยาวคลื่นของการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 253 และ 309 นาโนเมตร (ตารางที่ 8) โดยมีค่าการดูดกลืนแสงและพื้นที่ใต้กราฟของ

สเปกตรัมการดูดกลืนแสงช่วงความยาวคลื่น 240 – 350 นาโนเมตร ลดลงเล็กน้อยอย่างไม่เป็นลำดับ (ประมาณ 2.7% – 5.7%)

ตารางที่ 8 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพม ที่ความเข้มข้น 1.500 มิลลิกรัมต่อลิตร ในตัวทำละลายเอทานอล ที่ความยาวคลื่นของการดูดกลืนแสงสูงสุด และพื้นที่ใต้กราฟของสเปกตรัมการดูดกลืนแสง เมื่อระยะเวลาผ่านไป

วันที่วัดการดูดกลืนแสง	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น		พื้นที่ใต้กราฟของการดูดกลืนแสง
	253 นาโนเมตร	309 นาโนเมตร	
1 ต.ค. 52	0.0844 ± 0.0002	0.0519 ± 0.0004	0.454 ± 0.030
6 ต.ค. 52	0.0803 ± 0.0019	0.0492 ± 0.0004	0.442 ± 0.055
11 ต.ค. 52	0.0824 ± 0.0023	0.0499 ± 0.00018	0.524 ± 0.048
21 ต.ค. 52	0.0837 ± 0.0058	0.0515 ± 0.0029	0.474 ± 0.028
ค่าเฉลี่ย	0.0826 ± 0.0017	0.0503 ± 0.0012	0.474 ± 0.036

ผลการศึกษาการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพม ในตัวทำละลายเอทานอล แสดงให้เห็นว่า สารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพมที่มีการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส สามารถที่คงสภาพและคุณสมบัติของสารละลายฟลูไนตราซีแพมได้นานถึง 20 วัน เมื่อถูกเก็บรักษาภายในสภาวะที่เหมาะสม ซึ่งเป็นประโยชน์ในการประเมินระยะเวลาที่เหมาะสมในการเก็บรักษาสารละลายฟลูไนตราซีแพมตั้งต้น (stock solution) ที่ใช้ในการงานวิจัย การที่สารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพมตั้งต้นที่ถูกเตรียมขึ้น สามารถเก็บรักษาไว้ได้นาน โดยไม่เกิดการสลายหรือการเปลี่ยนแปลงเป็นสารใหม่ จะช่วยลดความคลาดเคลื่อนของผลการวิเคราะห์ ที่เกิดจากการเตรียมสารละลายตั้งต้นเพื่อใช้ในการวิเคราะห์หลายๆครั้ง และมีความยืดหยุ่นของเวลาในการเริ่มตรวจวิเคราะห์

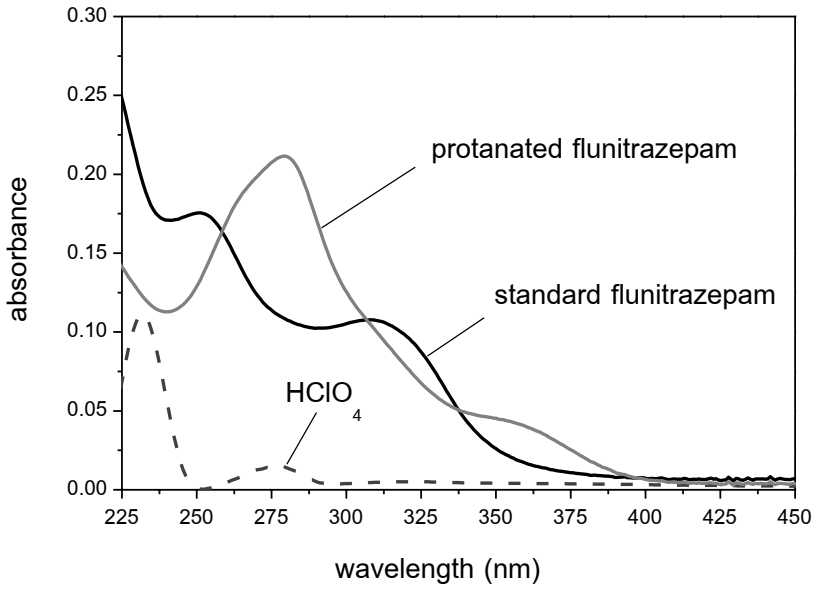
3.3 การตรวจพิสูจน์ฟลูไนตราซีแพมในเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ประเภทไม่มีสี ด้วยวิธีการโปรโตเนชัน

ในการตรวจพิสูจน์สารฟลูไนตราซีแพมในเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ ประเภทไม่มีสี ด้วยวการโปรโตเนชั่น ได้แบ่งหัวข้อการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการตรวจพิสูจน์ฟลูไนตรา-ซีแพมในเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ ประเภทไม่มีสี ออกเป็นดังต่อไปนี้

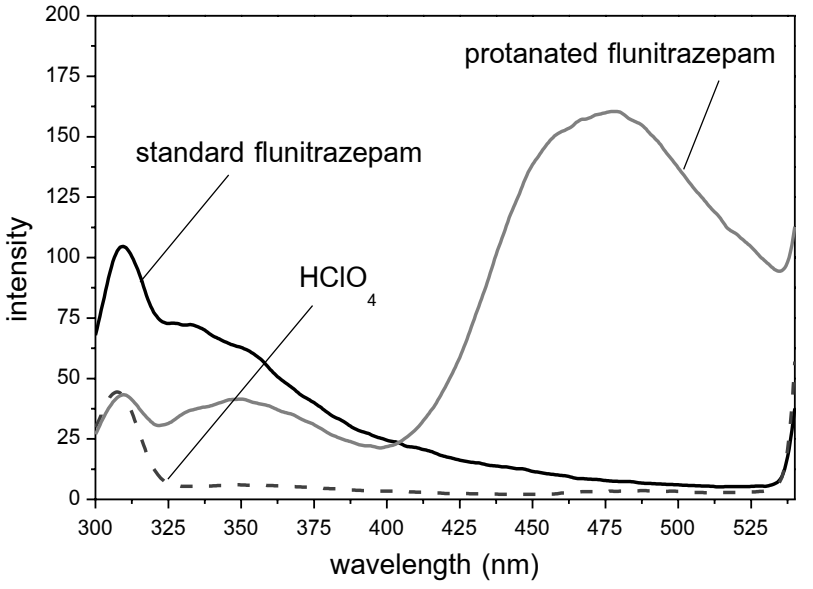
(1) ศึกษาการดูดกลืนแสง และการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์เบื้องต้น ของฟลูไนตราซีแพมที่ถูกโปรโตเนต
(2) ชนิดของกรดที่เหมาะสำหรับการตรวจพิสูจน์ฟลูไนตราซีแพม
(3) ความเข้มข้นของกรดที่เหมาะสำหรับการตรวจพิสูจน์ฟลูไนตราซีแพม
(4) การตรวจพิสูจน์ฟลูไนตราซีแพมที่ถูกโปรโตเนต ด้วยเทคนิคแมสสเปก-โทรเมทรี
(5) ศึกษาความเข้มข้นต่ำสุดของฟลูไนตราซีแพม ที่ตรวจพิสูจน์ได้
(6) วิเคราะห์ฟลูไนตราซีแพมที่ผสมในเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ ประเภทไม่มีสี

3.4.1 ศึกษาการดูดกลืนแสง และการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์ในเบื้องต้น ของฟลูไนตราซีแพมที่ถูกโปรโตเนต

เนื่องจากโครงสร้างของฟลูไนตราซีแพม (รูปที่ 2) ที่มีอิเล็กตรอนคู่โดดเดี่ยว (lone pair electron) ที่อะตอมของไนโตรเจน (nitrogen, N) และฟลูออรีน (fluorine, F) ทำให้ฟลูไนตราซีแพมมีความเป็นเบสอ่อนในตัวเอง และมีแนวโน้มที่จะเกิดปฏิกิริยากับสารละลายที่มีฤทธิ์เป็นกรดได้ (Malanciuc *et al*., 2009) การทดสอบการเปลี่ยนแปลงของฟลูไนตราซีแพม เมื่อเกิดปฏิกิริยากับกรดเบื้องต้น (รูปที่ 19) พบว่า สเปกตรัมการดูดกลืนแสงและความยาวคลื่นที่เกิดการดูดกลืนแสงสูงสุดของสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพมหลังการโปรโตเนต มีลักษณะที่เปลี่ยนไปจากเดิม สันนิษฐานว่าหลังเกิดปฏิกิริยาโปรโตเนชัน ได้เกิดสารชนิดใหม่ที่มีโครงสร้างโมเลกุลต่างจากโครงสร้างโมเลกุลเดิมของฟลูไนตราซีแพมขึ้น เห็นได้จากการเกิดแถบการดูดกลืนแสงสูงสุดขึ้นที่ความยาวคลื่นใหม่ คือ 280 (±2) นาโนเมตร และเกิดการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์ในช่วงความยาวคลื่น 400 – 530 นาโนเมตร โดยค่าความเข้มการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์สูงสุดที่ความยาวคลื่น 477 นาโนเมตร เมื่อกระตุ้นที่ความยาวคลื่น 280 นาโน-เมตร



รูปที่ 19 แสดงสเปกตราการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพมความเข้มข้น 3.000 มิลลิกรัมต่อลิตร สารละลายกรดเปอร์คลอริกความเข้มข้น 0.100 โมลาร์ และสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพมที่โปรโตเนตด้วยกรดเปอร์คลอริก ที่ความเข้มข้นเดียวกัน ในตัวทำละลายเอทานอล

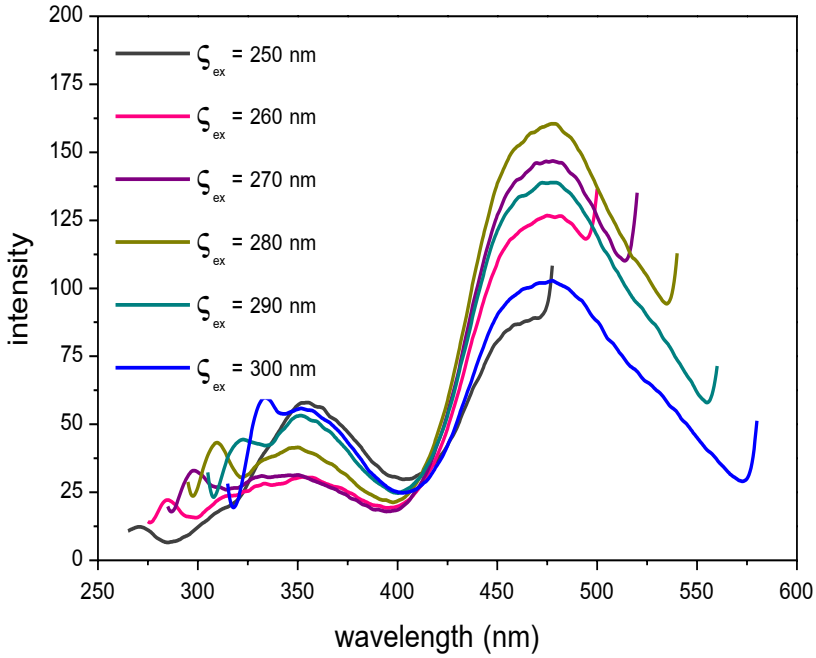


รูปที่ 20 แสดงสเปกตราการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์ของสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพมความเข้มข้น 3.000 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดเปอร์คลอริกความเข้มข้น 0.100 โมลาร์ และสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพมที่โปรโตเนตด้วยกรดเปอร์คลอริก ที่ความเข้มข้นเดียวกัน ในตัวทำละลายเอทานอล ที่ความยาวคลื่นกระตุ้น 280 นาโนเมตร

โดยหลักการแล้ว โมเลกุลที่มีการดูดกลืนแสงในช่วงอัลตราไวโอเลต ควรเกิดการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์ได้ แต่พบว่าโดยทั่วไปสารที่เกิดการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์ได้นั้น มักเป็นสารที่โครงสร้างมีวงแหวนอะโรมาติก ซึ่งมีระดับพลังงานของการทรานซิชันของอิเล็กตรอนเป็นแบบ $\phi \Downarrow \phi^*$ (ลาวัลย์ ศรีพงษ์, 2544) จากสเปกตราของการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์ (รูปที่ 20) พบว่า สารละลายฟลูไนตราซีแพมและสารละลายกรดที่ไม่มีฟลูไน-ตราซีแพม ในตัวทำละลายเอทานอล ไม่เกิดการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์ เมื่อกระตุ้นด้วยความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร ที่อุณหภูมิห้อง (26 องศาเซลเซียส) โดยปรากฏเพียงแสงที่เกิดจากการกระเจิง ในช่วงความยาวคลื่น 300 ถึง 370 นาโนเมตร แต่สารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพมในสภาวะที่เป็นกรด เมื่อเกิดการโปรโตเนตแล้วนั้น ให้คุณสมบัติการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์ขึ้นในช่วงความยาวคลื่น 400 – 530 นาโนเมตร แสดงว่า โครงสร้างของสารฟลูไนตราซีแพมนั้น ไม่ได้เป็นโครงสร้างที่จะเกิดฟลูออเรสเซนซ์ได้ด้วยตัวเอง แม้ว่าโครงสร้างจะมีวงแหวนอะโรมาติกประกอบอยู่ก็ตาม ทั้งนี้เป็นผลจากการแทนที่ของหมู่ไนโตร (NO_2) บนวงแหวนเบนซีน ทำให้เกิดการยับยั้งการเกิดฟลูออเรสเซนซ์ของสาร หรือทำให้ความเข้มของการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์หายไปอย่างสมบูรณ์

ความยาวคลื่นที่ใช้ในการกระตุ้นสารฟลูไนตราซีแพมที่ถูกโปรโตเนตนั้น ถือว่ามีความสำคัญเช่นกัน เพราะมีผลสำคัญต่อความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์ที่ตรวจวัดได้ การเลือกความยาวคลื่นกระตุ้นที่ถูกต้อง จะทำให้เกิดการดูดกลืนโฟตอนของสารเกิดขึ้นได้มาก เป็นผลให้การเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์เกิดขึ้นได้สูงสุด นอกจากนี้ การทดสอบโดยการเปลี่ยนความยาวคลื่นกระตุ้น (excitation wavelength; λ_{ex}) หลายๆ ค่า ยังเป็นการทดสอบเพื่อยืนยันว่าสเปกตรัมการเปล่งแสงที่ตรวจพบนั้น เป็นสเปกตรัมการเปล่งแสงที่แท้จริงหรือไม่ หากการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์ที่เกิดขึ้น ไม่มีการเปลี่ยนแปลงของความยาวคลื่นที่เกิดการเปล่งแสงสูงสุด แสดงว่าเป็นความยาวคลื่นที่เกิดการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์ของตัวอย่างที่แท้จริง

จากการศึกษา เมื่อทำการวัดการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์ของฟลูไนตราซีแพมที่ถูกโปรโตเนต โดยการเปลี่ยนความยาวคลื่นในการกระตุ้นเป็น 250 260 270 280 290 และ 300 นาโนเมตร พบว่าการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์ของฟลูไนตราซีแพมที่ถูกโปรโตเนตยังคงเกิดการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์สูงสุดที่ความยาวคลื่น 477 นาโนเมตร (รูปที่ 21) แสดงว่าที่ความยาวคลื่น 477 นาโนเมตร เป็นความยาวคลื่นที่เกิดการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์ของฟลูไนตราซีแพมที่ถูกโปรโตเนตในตัวทำละลายเอทานอลอย่างแท้จริง ส่วนการเปล่งแสงในช่วงความยาวคลื่น 270 – 370 นาโนเมตรนั้น เกิดการเปล่งแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่นไม่คงที่ เมื่อกระตุ้นด้วยความยาวคลื่นที่แตกต่างกัน โดยเกิดการเปล่งแสงสูงสุดในช่วงความยาวคลื่นที่ยาวขึ้น (red shife) ตามความยาวคลื่นที่ใช้กระตุ้น ดังนั้น การเปล่งแสงในช่วงความยาวคลื่น 270 ถึง 370 นาโนเมตร จึงไม่ใช่แถบการเปล่งแสงที่แท้จริงของสารฟลูไนตราซีแพมที่ถูกโปรโตเนต



รูปที่ 21 สเปกตราการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์ของสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซี-แพมความเข้มข้น 3.000 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ถูกโปรโตเนตด้วยกรดเปอร์คลอริกความเข้มข้น 0.1000 โมลาร์ ในตัวทำละลายเอทานอล ที่ความยาวคลื่นกระตุ้นต่าง ๆ

สำหรับการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์ของสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพมที่มีการโปรโตเนตด้วยกรด ในตัวทำละลายเอทานอล ให้ค่าความเข้มของการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์สูงสุดที่ความยาวคลื่น 477 นาโนเมตร เมื่อสารละลายถูกกระตุ้นด้วยความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร และค่าความเข้มการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์ที่ความยาวคลื่น 477 นาโนเมตร มีแนวโน้มลดลง เมื่อความยาวคลื่นกระตุ้นสูงกว่าหรือต่ำกว่า 280 นาโนเมตร ผลที่ได้จากการทดลองในข้างต้น แสดงให้เห็นว่าความยาวคลื่นกระตุ้นที่เหมาะสำหรับการตรวจพิสูจน์ฟลูไน-ตราซีแพมโดยใช้เทคนิคโฟโตลูมิเนสเซนซ์ ภายใต้สภาวะที่ทำการวิจัย คือ 280 นาโนเมตร

นอกจากนี้ อีกวิธีหนึ่งที่สามารถตรวจพิสูจน์ได้ว่าว่าสเปกตรัมการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์ที่ตรวจพบนั้น เป็นสเปกตรัมการเปล่งแสงที่แท้จริงหรือไม่ คือ การวิเคราะห์หาสเปกตรัมการะตุ้น (excitation spectrum) โดยทั่วไปแล้วรูปร่างของสเปกตรัมการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์ จะเหมือนกับสเปกตรัมการกระตุ้นหรือสเปกตรัมการดูดกลืนแสง ในรูปแบบของภาพเหมือนกระจกสะท้อน (mirror-image) ทั้งนี้ขึ้นกับความคล้ายคลึงของชั้นพลังงานการสั่นของสถานะพื้นกับสถานะกระตุ้น ถ้าชั้นพลังงานของสถานะกระตุ้นคล้ายกับพลังงานของสถานะพื้นมาก แนวโน้มการเกิดภาพเหมือนกระจกสะท้อนจะมีมากเช่นกัน (ลาวัลย์ ศรีพงษ์, 2544) ในการวิเคราะห์สเปกตรัมการกระตุ้น ได้กำหนดความยาวคลื่นที่คายพลังงานแสงคงที่เท่ากับ

477 นาโนเมตร ซึ่งเป็นความยาวคลื่นการเปล่งแสงสูงสุดของฟลูไนตราซีแพมที่ถูกโปรโตเนต จากนั้นวัดสเปกตรัมการกระตุ้นในช่วงความยาวคลื่นที่ต่ำกว่าความยาวคลื่นของการเปล่งแสง เนื่องจากความยาวคลื่นของการเกิดฟลูออเรสเซนซ์ จะยาวกว่าความยาวคลื่นการกระตุ้น เป็นผลมาจากชั้นพลังงานของอิเล็กตรอนที่ทำให้เกิดฟลูออเรสเซนซ์นั้น เกิดจากระดับชั้นพลังงานการสั่นต่ำสุดของสถานะกระตุ้น ทำให้ความแตกต่างของระดับพลังงานมีค่าน้อยกว่าการกระตุ้นที่เกิดจากอิเล็กตรอนที่ชั้นต่ำสุดของการสั่นในสถานะพื้น ไปยังชั้นพลังงานการสั่นชั้นต่างๆ ในสถานะกระตุ้น (ลาวัลย์ ศรีพงษ์, 2544) ซึ่งความสัมพันธ์ของความเหมือนภาพกระจกสะท้อนของสเปกตรัมการกระตุ้นและสเปกตรัมการเปล่งแสง ช่วยยืนยันการเกิดการเปล่งแสงฟลูออ-เรสเซนซ์และตำแหน่งการเปล่งแสงสูงสุดของสารเบื้องต้นได้ เนื่องด้วยความสัมพันธ์ของระดับพลังงานในการกระตุ้นและการคายพลังงานเพื่อการกลับสู่สถานะพื้นของสารหลังถูกกระตุ้น

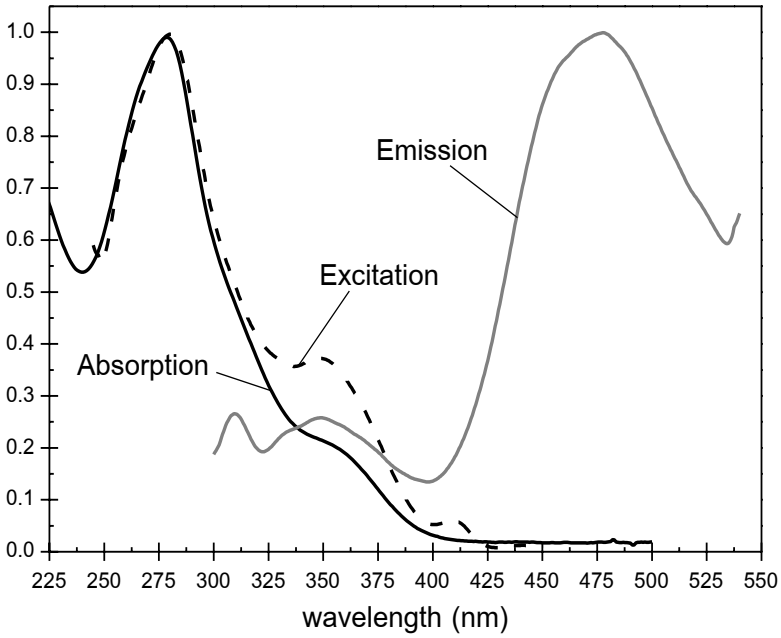
จากรูปแบบสเปกตรัมการดูดกลืนแสงและสเปกตรัมการกระตุ้นของสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพมที่ถูกโปรโตเนต ในตัวทำละลายเอทานอล (รูปที่ 22) มีลักษณะสเปกตรัมที่คล้ายคลึงกัน อีกทั้งความยาวคลื่นที่เกิดการดูดกลืนแสงสูงสุดและความยาวคลื่นที่เกิดการกระตุ้นสูงสุดของสารละลายฟลูไนตราซีแพม พบว่าเกิดขึ้นที่ความยาวคลื่นใกล้เคียงกัน (280 ± 2 นาโนเมตร) สเปกตรัมการดูดกลืนแสงและสเปกตรัมการกระตุ้นให้ภาพเหมือนกระจกสะท้อนกับสเปกตรัมการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์ ซึ่งเกิดการเปล่งแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 477 นาโนเมตร สรุปได้ว่าการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์ของฟลูไนตราซีแพมหลังการโปรโตเนตที่ความยาวคลื่น 477 นาโนเมตรนั้น เป็นความยาวคลื่นที่เกิดการเปล่งแสงที่แท้จริง และจากสามารถสรุปความสัมพันธ์ของสเปกตรัมทั้ง 3 ชนิดได้ ดังแสดงในตารางที่ 9

ตารางที่ 9 แสดงความยาวคลื่นของสเปกตรัมชนิดต่างๆ ของสารละลายมาตรฐานฟลูไนตรา-ซีแพม เมื่อเติมกรดเปอร์คลอริกความเข้มข้น 0.1000 โมลาร์ ในตัวทำละลายเอทานอล

การวิเคราะห์สเปกตรัม	ความยาวคลื่นที่กำหนด (นาโนเมตร)	ช่วงความยาวคลื่นของการวัด (นาโนเมตร)	ความยาวคลื่นสูงสุดที่วัดได้ (นาโนเมตร)
การดูดกลืนแสง (absorption)	ไม่มี	225 – 500	280
การเปล่งแสง (emission)	280 ($^{a}\lambda_{ex}$)	300 – 530	477
การกระตุ้นแสง (excitation)	477 ($^{b}\lambda_{em}$)	245 – 450	280

$^{a}\lambda_{ex}$ คือ ความยาวคลื่นที่ใช้กระตุ้น (นาโนเมตร)

$^{b}\lambda_{em}$ คือ ความยาวคลื่นของการเปล่งแสงสูงสุด (นาโนเมตร)



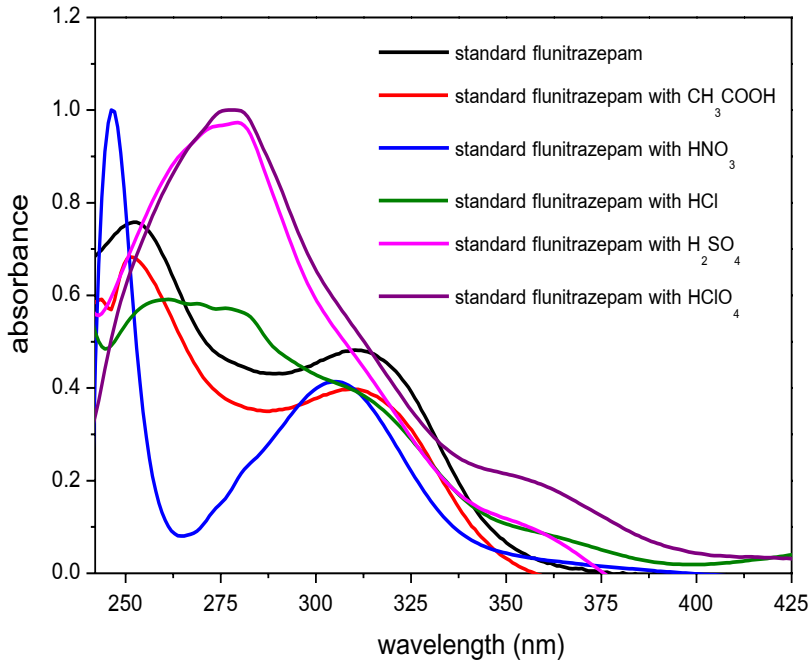
รูปที่ 22 แสดงสเปกตรา (normalized spectra) การดูดกลืนแสง การกระตุ้น และการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์ของสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพม ความเข้มข้น 3.000 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่มีการโปรโตเนตด้วยกรดเปอร์คลอริกความเข้มข้น 0.1000 โมลาร์ ในตัวทำละลายเอทานอล

ความสัมพันธ์ของสเปกตรัมทั้ง 3 ชนิด อธิบายได้ว่า การดูดกลืนแสงสูงสุดของฟลูไนตราซีแพมที่ถูกโปรโตเนต ในสภาวะที่ทำการวิจัย เกิดขึ้นที่ความยาวคลื่น 280 (±2) นาโนเมตร แสดงว่าสารสามารถจะถูกกระตุ้นได้ดีที่ความยาวคลื่นประมาณ 280 นาโนเมตรเช่นกัน และเมื่อกระตุ้นฟลูไนตราซีแพมที่ถูกโปรโตเนตด้วยความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร พบว่าสารเกิดการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์สูงสุดที่ความยาวคลื่น 477 นาโนเมตร เมื่อทดสอบหาความยาวคลื่นที่สามารถกระตุ้นให้เกิดการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนต์ได้ดีที่สุด โดยตั้งค่าความยาวคลื่นการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนต์ที่ความยาวคลื่น 477 นาโนเมตร ฟลูไนตราซีแพมที่ถูกโปรโตเนตเกิดการกระตุ้นสูงสุดที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร ซึ่งตรงกับความยาวคลื่นเกิดการดูดกลืนแสงสูงสุดของฟลูไนตราซีแพมที่ถูกโปรโตเนต

สรุปได้ว่าฟลูไนตราซีแพมที่ถูกโปรโตเนต ดูดกลืนแสงได้ดีที่สุดที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร และเป็นความยาวคลื่นเดียวกับที่สามารถกระตุ้นสารได้ดีที่สุดเช่นกัน ซึ่งจากการกระตุ้นสารด้วยที่ความยาวคลื่นดังกล่าว ทำให้สารฟลูไนตราซีแพมที่ถูกโปรโตเนตสามารถเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์ได้ที่ความยาวคลื่น 477 นาโนเมตร อันเป็นสมบัติเชิงแสงของสารที่เป็นประโยชน์ต่อการนำไปใช้ในการตรวจพิสูจน์สารฟลูไนตราซีแพมในตัวอย่างต่อไป

3.4.2 ชนิดของกรดที่เหมาะสำหรับการตรวจพิสูจน์ฟลูไนตราซีแพม

การศึกษาชนิดกรดที่เหมาะสมต่อการเกิดปฏิกิริยาโปรโตเนชั่น (protonation) กับฟลูไนตราซีแพม ได้ทำการศึกษาโดยใช้กรด 5 ชนิด แบ่งเป็นกรดแก่ 4 ชนิด ได้แก่ กรดเปอร์คลอริก กรดไฮโดรคลอริก กรดซัลฟิวริก และกรดไนตริก และกรดอ่อน 1 ชนิด คือ กรดอะซิติก ซึ่งกรดแต่ละชนิดได้เตรียมที่ความเข้มข้นเท่ากัน คือ 0.1000 โมลาร์ จากนั้นวัดการดูดกลืนแสงของสารละลายกรดแต่ละชนิด แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายกรดลบออกจากค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพมที่เติมด้วยกรดชนิดนั้นๆ ที่ความยาวคลื่นเดียวกัน โดยควบคุมความเข้มข้นกรดแต่ละชนิดและความเข้มข้นสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพมให้คงที่ การลบค่าของสเปกตรัมเช่นนี้ ผลที่ได้คือสเปกตรัมการดูดกลืนแสงของฟลูไนตราซีแพมที่ถูกโปรโตเนตด้วยกรดชนิดนั้นๆ



รูปที่ 23 แสดงสเปกตราการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพม ความเข้มข้น 1.000 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่โปรโตเนตด้วยกรดแต่ละชนิด ที่ความเข้มข้น 0.1000 โมลาร์ ในตัวทำละลายเอทานอล หลังการทำ baseline correction และ normalization absorption spectra

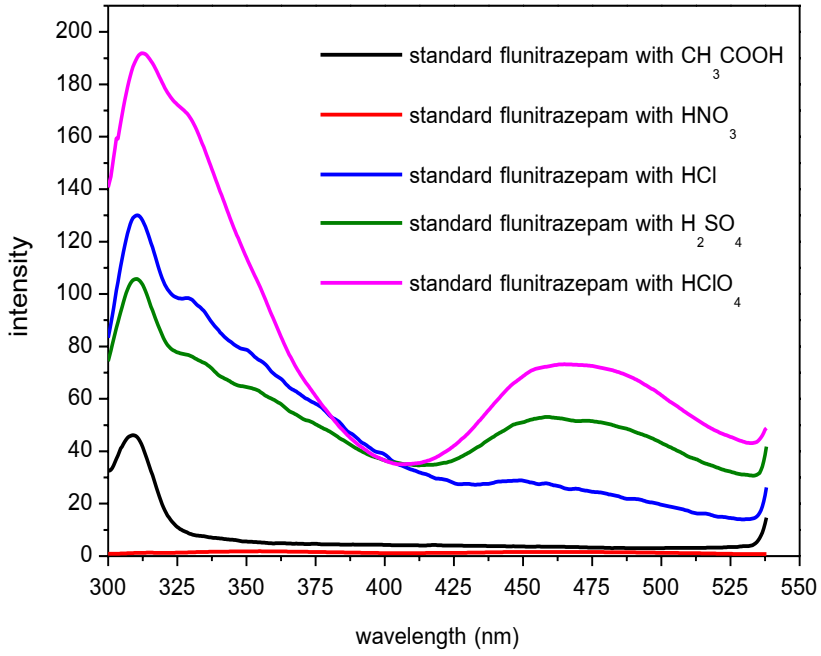
จากกรดทั้ง 5 ชนิดที่ได้ศึกษา พบว่า สารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพมที่ถูกโปรโตเนตด้วยกรดเปอร์คลอริก (perchloric acid) กรดซัลฟิวริก (sulfuric acid) และกรดไฮโดรคลอริก (hydrochloric acid) ในตัวทำละลายเอทานอล เกิดแถบการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 280 (±3) นาโนเมตร (รูปที่ 23) โดยการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพมที่ถูกโปรโตเนตด้วยกรดเปอร์คลอริก มีค่าการดูดกลืนแสง (หลังทำ baseline collection) สูงกว่าสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพมที่ถูกโปรโตเนตด้วยกรดซัลฟิวริกและกรดไฮโดรคลอริก ตามลำดับ แต่สารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพมที่ถูกโปรโตเนตด้วยกรดไนตริกและกรดอะซิติก ไม่พบการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นดังกล่าว

พื้นที่ใต้กราฟของสเปกตรัมการดูดกลืนแสง ในช่วงความยาวคลื่น 250 – 330 นาโนเมตร ของสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพมที่ถูกโปรโตเนตด้วยกรดซัลฟิวริก กรดไฮโดรคลอริกและกรดซัลฟิวริก (ตารางที่ 10) พบว่า สารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพมที่ถูกโปรโตเนตด้วยกรดเปอร์คลอริก มีพื้นที่ใต้กราฟสเปกตรัมการดูดกลืนแสงสูงกว่ากรดซัลฟิวริกและกรดไฮโดรคลอริก สอดคล้องกับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 (±3) นาโนเมตร สำหรับสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพมที่โปรโตเนตด้วยกรดไนตริกและกรดอะซิติก ไม่เกิดการดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่นดังกล่าว จึงไม่สามารถหาพื้นที่ใต้กราฟของสเปกตรัมการดูดกลืนแสง สำหรับอนุพันธ์ใหม่ที่เกิดขึ้นหลังการโปรโตเนตได้

ตารางที่ 10 แสดงค่าการดูดกลืนและพื้นที่ใต้กราฟของสเปกตรัมการดูดกลืนแสงช่วงความยาวคลื่น 250 – 330 นาโนเมตร ของสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพมความเข้มข้น 1.000 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่โปรโตเนตด้วยกรดแต่ละชนิด (เข้มข้น 0.1000 โมลาร์) ในตัวทำละลายเอทานอล

ชนิดของกรด	ς_{max},nm (ε, M^{-1} cm^{-1})	พื้นที่ใต้กราฟของสเปกตรัมการดูดกลืนแสง ในช่วงความยาวคลื่น 250-300 นาโนเมตร
ไฮโดรคลอริก	280 (9980)	0.370 ± 0.024
เปอร์คลอริก	280 (12702)	0.801 ± 0.038
ซัลฟิวริก	280 (10332)	0.587 ± 0.040
ไนตริก	280 (15921)	-
อะซิติก	280 (8416)	-

การเปลี่ยนแปลงความยาวคลื่นของการดูดกลืนแสงของสารละลายฟลูไนตราซี-แพมหลังการโปรโตเนตด้วยกรดชนิดต่าง ๆ ที่ใช้ในการศึกษา ยกเว้นกรดอะซิติกนั้น แสดงให้เห็นว่า หลังการเติมกรด ฟลูไนตราซีแพมมีการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างกลายเป็นสารใหม่ที่มีโครงสร้างแตกต่างไปจากโครงสร้างเดิมของฟลูไนตราซีแพม เป็นผลให้ความยาวคลื่นของการดูดกลืนแสงสูงสุดของสารหลังการโปรโตเนต แตกต่างจากสารฟลูไนตราซีแพมที่ไม่มีการโปรโตเนต ในการเปลี่ยนแปลงของสารหลังการโปรโตเนตนั้น กรดไนตริกเกิดการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างของฟลูไนตราซีแพมด้วยเช่นเดียวกัน เห็นได้จากความยาวคลื่นของการดูดกลืนแสงที่เปลี่ยนไปจากฟลูไนตราซีแพมที่ไม่ถูกโปรโตเนต แต่โครงสร้างที่ได้หลังการโปรโตเนตด้วยกรดไนตริก อาจแตกต่างไปจากกรดเปอร์คลอริก กรดซัลฟิลริก และกรดไฮโดรคลอริก เพราะความยาวคลื่นของการดูดกลืนแสงสูงสุด แตกต่างไปจากฟลูไนตราซีแพมที่ถูกโปรโตเนตด้วยกรดอีก 3 ชนิดข้างต้น สำหรับฟลูไนตราซีแพมที่เติมกรดอะซิติก ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของสารตัวอย่าง



รูปที่ 24 แสดงสเปกตราการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์ของสารละลายมาตรฐานฟลูไนตรา-ซีแพมความเข้มข้น 1.000 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ถูกโปรโตเนตด้วยกรดชนิดต่าง ๆที่ความเข้มข้น 0.1000 โมลาร์ ในตัวทำละลายเอทานอล

การเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์ของสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพม ที่มีการโปรโตเนตด้วยกรดทั้ง 5 ชนิด ได้แก่ กรดซัลฟิวริก กรดไฮโดรคลอริก กรดเปอร์คลอริก กรดไนตริก และกรดอะซิติก ในเอทานอล (รูปที่ 24) ที่ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพมและกรดเท่ากัน พบว่า สารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพมที่ถูกโปรโตเนตด้วยกรดเปอร์คลอริก มีค่าความเข้มของการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์ (fluorescence intensity) สูงกว่ากรดซัลฟิวริก และกรดไฮโดรคลอริก ตามลำดับ สำหรับสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพมที่ถูกโปรโตเนตด้วยกรดไนตริกและกรดอะซิติก ไม่พบการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์

จากข้อมูลในตารางที่ 11 พื้นที่ใต้กราฟสเปกตรัมการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์ของสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพมที่ถูกโปรโตเนตด้วยกรดชนิดต่างๆ ที่ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพมและกรดเท่ากัน ในตัวทำละลายเอทานอล ภายใต้สภาวะที่ทำการวิจัย สอดคล้องกับค่าความเข้มของการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์ คือ พื้นที่ใต้กราฟของสเปกตรัมการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์ของสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพม ที่ถูกโปรโตเนตด้วยกรดเปอร์คลอริก สูงกว่าฟลูไนตราซีแพมที่ถูกโปรโตเนตด้วยกรดซัลฟิวริกและกรดไฮโดรคลอริก ตามลำดับ แสดงว่ากรดเปอร์คลอริกสามารถเกิดการโปรโตเนตกับฟลูไนตราซีแพม และทำให้เกิดอนุพันธ์ของสารหลังการโปรโตเนตที่ให้การเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์ขึ้นในช่วงความยาวคลื่น 420 – 530 นาโนเมตร ได้ดีกว่ากรดชนิดอื่นๆ ที่ทำการทดลอง สำหรับฟลูไนตราซีแพมหลังการโปรโตเนตด้วยกรดไนตริก พบว่า อนุพันธ์ที่เกิดขึ้นไม่ให้การเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์ ทำให้ไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างตัวอย่างที่มีสารฟลูไนตราซีแพม และตัวอย่างที่ไม่มีสารฟลูไนตราซีแพมได้ สำหรับการศึกษาสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพมที่โปรโตเนตด้วยกรดอะซิติก ไม่พบการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์เช่นเดียวกัน

แม้สารฟลูไนตราซีแพมจะมีฤทธิ์เป็นเบสอ่อน แต่ผลจากการโปรโตเนตด้วยกรดของสารฟลูไนตราซีแพมจะเกิดขึ้นได้ดีเมื่อเป็นการโปรโตเนตโดยใช้กรดแก่ จากค่า pKa ของฟลูไนตราซีแพมเท่ากับ 1.8 (http://www.unitedchem.com/sitefiles/library/llcpaper-10-Flunitrazepam.pdf, สืบค้นเมื่อ 25 เมษายน 2554) ในขณะที่กรดเปอร์คลอริกมีความแรงของกรด (strength of acid) ในน้ำมากกว่ากรดซัลฟิวริก กรดไฮโดรคลอริก และกรดไนตริก ตามลำดับ (Housecroft and Constable, 2006) สำหรับกรดอะซิติก มีค่า pKa เท่ากับ 4.76 (http://evans.harvard.edu/pdf/evans_pKa_table.pdf, สืบค้น 25 เมษายน 2554) ผลจากการแตกตัวให้ไฮโดรเจนไอออน [hydrogen ion ; H^+] ของกรดแก่ที่สมบูรณ์ ทำให้การโปรโตเนตสารเกิดขึ้นได้ดี ตามรูปแบบการแตกตัวของกรด

$$HA \;\; 2 \;\; H_2O \;\; \Downarrow \;\; H_3O^2 \;\; 2 \;\; A^4$$

BrØnsted acid

ในขณะที่กรดอ่อน สามารถแตกตัวให้ไฮโดรเจนไอออนเพียงบางส่วน และมีโอกาสเกิดปฏิกิริยาย้อนกลับได้ การโปรโตเนตจึงเกิดขึ้นได้น้อยมาก และจากการเปลี่ยนแปลงของสเปกตรัมการดูดกลืนแสงและการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์ข้างต้น แสดงให้เห็นว่า กรดอ่อนไม่เหมาะต่อการนำมาใช้เพื่อตรวจพิสูจน์ฟลูไนตราซีแพมด้วยเทคนิคทางโฟโตเคมี ในสภาวะที่ทำการวิจัย ซึ่งต้องอาศัยการเกิดปฏิกิริยาโปรโตเนชัน

ตารางที่ 11 แสดงพื้นที่ใต้กราฟของสเปกตรัมการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์ ช่วงความยาวคลื่น 420 – 530 นาโนเมตร ที่ความยาวคลื่นกระตุ้น 280 นาโนเมตร หลังทำ baseline correction ของสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพมความเข้มข้น 1.000 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ถูกโปรโต-เนตด้วยกรดแต่ละชนิด ที่มีความเข้มข้น 0.1000 โมลาร์ ในตัวทำละลายเอทานอล

ชนิดกรด	พื้นที่ใต้กราฟของสเปกตรัมการเปล่งแสง ในช่วงความยาวคลื่น 420-530 นาโนเมตร
กรดไฮโดรคลอริก	161.4 (± 6.35)
กรดเปอร์คลอริก	2129.4 (± 5.34)
กรดซัลฟิวริก	1231.5 (± 4.75)
กรดไนตริก	37.4 (± 0.71)
กรดอะซิติก	-

* พื้นที่ใต้กราฟของสเปกตรัมการเปล่งแสง (± %RSD)

แม้ว่ากรดแก่จะสามารถแตกตัวได้ดีกว่ากรดอ่อน แต่ความสามารถในการแตกตัวของกรดแก่แต่ละชนิดเอง ก็มีความสามารถในการแตกตัวที่ต่างกัน ทำให้มีความสามารถในการโปรโตเนตได้ไม่เท่าเทียมกัน เช่นเดียวกับในกรณีของกรดเปอร์คลอริก และกรดซัลฟิวริกที่แม้จะเป็นกรดแก่ทั้งคู่ แต่ในการแตกตัวเป็นไอออนของกรดเปอร์คลอริกนั้น สามารถแตกตัวได้สมบูรณ์ในครั้งเดียว ในขณะที่กรดซัลฟิวริกมีการแตกตัวถึง 2 ครั้ง โดยการแตกตัวสมบูรณ์จะเกิดขึ้นในขั้นแรก จากนั้นซัลเฟตไอออนจะแตกตัวในขั้นที่ 2 ซึ่งแตกตัวได้น้อยมาก ดังแสดง

$$HClO_{4\,(aq)} + H_2O_{\,(l)} \longrightarrow H_3O^+_{\,(aq)} + ClO_4^-{}_{\,(aq)} \quad \text{fully dissocicated}$$

$$H_2SO_{4\,(aq)} + H_2O_{\,(l)} \longrightarrow H_3O^+_{\,(aq)} + HSO_4^-{}_{\,(aq)} \quad \text{fully dissocicated}$$

$$HSO_4^-{}_{\,(aq)} + H_2O_{\,(l)} \rightleftharpoons H_3O^+_{\,(aq)} + SO_4^{2-}{}_{\,(aq)} \quad pK_a\,(2) = 1.92$$

การทำปฏิกิริยาโปรโตเนตของกรดเปอร์คลอริกจึงเกิดขึ้นได้ดี และแรงกว่ากรดซัลฟิวริก ดังจะเห็นได้จากค่าความเข้มการเปล่งแสงของฟลูไนตราซีแพมที่ถูกโปรโตเนตด้วยกรดเปอร์คลอริก ที่สูงกว่ากรดซัลฟิวริก (รูปที่ 24) ความสามารถในการเกิดปฏิกิริยาโปรโตเนชัน ประเมินได้จากความสามารถในการแตกตัวเป็นไอออนของกรดในตัวทำละลายที่ไม่ใช่น้ำ โดยกำหนดให้ความเข้มข้นของ [H^+] ในกรดแต่ละชนิดเท่ากัน แล้วทำการวัดค่าการนำไฟฟ้า (Electrical conductivity) ซึ่งเป็นการวัดการแตกตัวเป็นไอออนของสารประกอบที่มีพันธะไอออนิก (ionic bond) ยิ่งมีการละลายและแตกตัวให้ไอออนมาก ค่าการนำไฟฟ้าที่วัดได้จะยิ่งมีค่าสูงและความสามารถในการแตกตัวเป็นไอออนของกรดแต่ละชนิดจะบอกถึงความแรง (strength) ของกรดนั้นด้วยเช่นกัน (นภดล ไชยคำ, 2544)

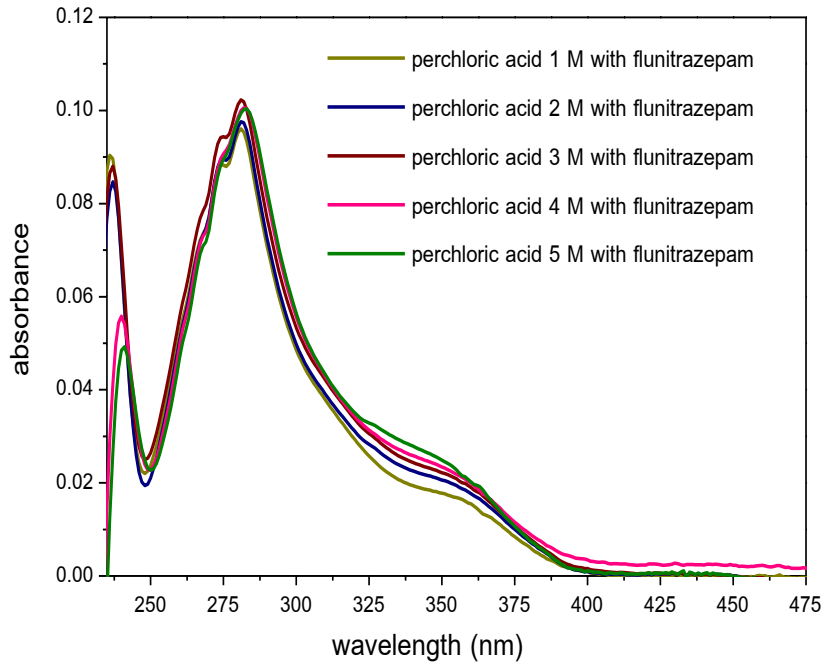
ตารางที่ 12 แสดงค่าการนำไฟฟ้าของสารละลายกรดแต่ละชนิด ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 2.000 โมลาร์ ในเอทานอล อุณหภูมิขณะวัดค่าการนำไฟฟ้าประมาณ 28.0 องศาเซลเซียส (ค่าการนำไฟฟ้าของตัวทำละลายเอทานอล = 0.70 $\mu S\ cm^{-1}$)

ชนิดของกรด	ค่าการนำไฟฟ้า ($\mu S\ cm^{-1}$)
ไฮโดรคลอริก	5.92
เปอร์คลอริก	12.76
ซัลฟิวริก	6.69
ไนตริก	4.64

ข้อมูลในตารางที่ 12 แสดงผลการวัดค่าการนำไฟฟ้าของสารละลายกรดแก่ทั้ง 4 ชนิด ที่มีความเข้มข้นเท่ากันในตัวทำละลายเอทานอล ซึ่งเป็นการวัดความสามารถในการแตกตัวเบื้องต้นของกรด พบว่า กรดเปอร์คลอริกมีค่าการนำไฟฟ้าที่สูงกว่ากรดซัลฟิวริก กรดไฮโดรคลอริกและกรดไนตริก ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าความสามารถในการแตกตัวให้ไอออนของกรดเปอร์คลอริกสูงกว่ากรดชนิดอื่นๆ ที่ทำการศึกษา โอกาสในการทำปฏิกิริยาโปรโตเนชันต่อฟลูไนตราซีแพม จึงมีสูงกว่าเช่นเดียวกัน เมื่อพิจารณาจากความสามารถในการแตกตัวของกรดเบื้องต้น และสมบัติเชิงแสงของสารตัวอย่างที่เปลี่ยนไปหลังการโปรโตเนต ได้แก่ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร และค่าความเข้มการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์ที่ความยาวคลื่น 477 นาโนเมตร รวมถึงพื้นที่ใต้กราฟของสเปกตรัมการดูดกลืนแสงและพื้นที่ใต้กราฟของสเปกตรัมการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์ สรุปได้ว่า กรดเปอร์คลอริกเป็นกรดที่มีความเหมาะสมที่สุดต่อการตรวจพิสูจน์สารฟลูไนตราซีแพมด้วยเทคนิคทางโฟโตเคมี ภายใต้สภาวะที่ทำการวิจัย

3.4.3 ความเข้มข้นของกรดที่เหมาะสำหรับตรวจพิสูจน์ฟลูไนตราซีแพม

ความเข้มข้นของกรดที่ใช้ในการโปรโตเนตเป็นอีกปัจจัยที่สำคัญ ความเข้มข้นที่มากหรือน้อยเกินไปของกรด อาจส่งผลต่อประสิทธิภาพ และอนุพันธ์ของที่เกิดขึ้นหลังการเกิดปฏิกิริยาโปรโตเนชันได้ จากการศึกษาเพื่อหาความเข้มข้นของกรดเปอร์คลอริกที่เหมาะต่อการตรวจพิสูจน์ฟลูไนตราซีแพม โดยวิเคราะห์การดูดกลืนแสงและการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์ของสารละลายตัวอย่าง พบว่า สารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพมที่ถูกโปรโตเนตด้วยกรดเปอร์คลอริก ในตัวทำละลายเอทานอล (รูปที่ 25) ที่ความเข้มข้นของกรดแตกต่างกัน ยังคงเกิดการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่นเดียวกัน คือ 280 (±3) นาโนเมตร แต่ค่าการดูดกลืนแสงที่ไม่เป็นลำดับตามความเข้มข้นของกรดเปอร์คลอริกในสารละลายตัวอย่าง แสดงว่าค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร ของสารละลายฟลูไนตราซีแพมที่ถูกโปรโตเนตด้วยกรดเปอร์คลอริกในตัวทำละลายเอทานอลนั้น เป็นค่าการดูดกลืนแสงที่เกิดจากความเข้มข้นของฟลูไนตราซีแพมในสารละลายตัวอย่าง ไม่ใช่ค่าความเข้มข้นของกรดที่ใช้ในการโปรโตเนต เพราะหากค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร เป็นค่าการดูดกลืนแสงที่เป็นผลจากความเข้มข้นของกรดเป็นหลัก ผลที่ได้จากการทดสอบนี้ควรจะมีแนวโน้มที่เป็นลำดับตามความเข้มข้นของกรดในสารละลายตัวอย่างด้วยเช่นเดียวกัน



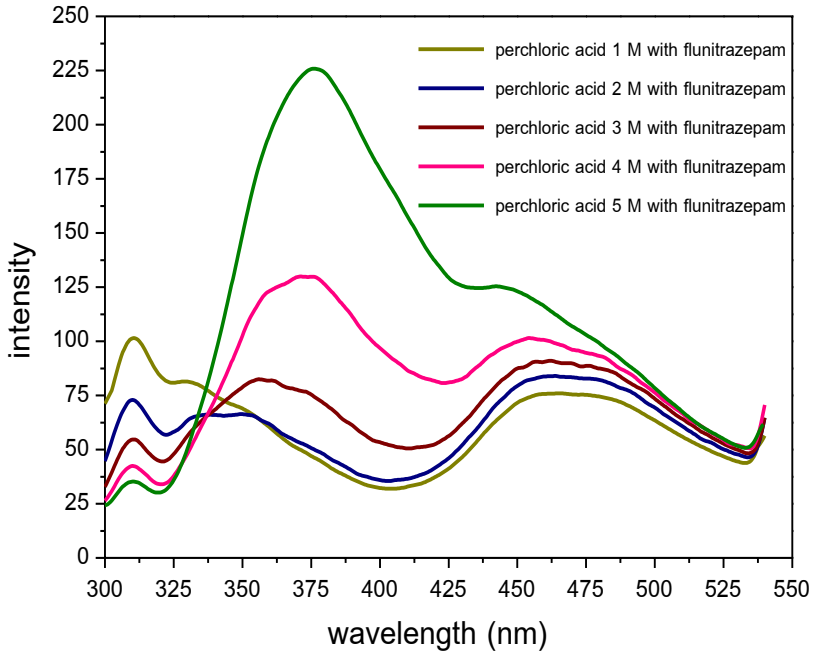
รูปที่ 25 แสดงสเปกตราการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพม ความเข้มข้น 1.000 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ถูกโปรโตเนตด้วยกรดเปอร์คลอริก ที่ความเข้มข้น 1.000 – 5.000 โมลาร์ ในตัวทำละลายเอทานอล

ตารางที่ 13 แสดงพื้นที่ใต้กราฟของสเปกตรัมการดูดกลืนแสง ในช่วงความยาวคลื่น 250 - 300 นาโนเมตร หลังการทำ baseline correction ของสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพม ความเข้มข้น 1.000 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ถูกโปรโตเนตด้วยกรดเปอร์คลอริก ในตัวทำละลายเอทานอล

ความเข้มข้นของกรด (โมลาร์)	พื้นที่ใต้กราฟของสเปกตรัมการดูดกลืนแสง
1.000	1.189 ± 0.044
2.000	1.236 ± 0.029
3.000	1.259 ± 0.055
4.000	1.271 ± 0.024
5.000	1.267 ± 0.031

การหาค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายฟลูไนตราซีแพมที่ถูกโปรโตเนตแท้จริง โดยใช้พื้นที่ใต้กราฟของสเปกตรัมการดูดกลืนแสงของฟลูไนตราซีแพมที่ถูกโปรโตเนต หลังลบค่าการดูดกลืนแสงของกรดเปอร์คลอริกที่ความเข้มข้นเดียวกับที่ใช้ในการโปรโตเนต ในช่วงความยาวคลื่น 250 – 300 นาโนเมตร (ตารางที่ 13) พบว่า มีพื้นที่ใต้กราฟของสเปกตรัมการดูดกลืนแสงไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

ส่วนการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์ของสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพม ที่ความเข้มข้น 1.000 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ถูกโปรโตเนตด้วยกรดเปอร์คลอริกความเข้มข้นต่างๆ ในตัวทำละลายเอทานอล โดยใช้ความยาวคลื่นกระตุ้นที่ 280 นาโนเมตร (รูปที่ 26) นั้น พบว่า ค่าความเข้มของการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์ของสารละลายตัวอย่าง ที่ความยาวคลื่น 477 นาโนเมตร มีค่าความเข้มการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของกรดเปอร์คลอริกอย่างเป็นลำดับ ถึงแม้ว่าค่าความเข้มการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์ของสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพมที่ถูกโปรโตเนตด้วยกรดเปอร์คลอริก ที่ความยาวคลื่น 477 นาโนเมตร มีค่าสูงขึ้นตามความเข้มข้นของกรดเปอร์คลอริก แต่รูปแบบของสเปกตรัมการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์ของสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพมที่ถูกโปรโตเนต ในช่วงความยาวคลื่นที่ทำการศึกษาปรากฏไม่ชัดเจน เมื่อความเข้มข้นของกรดเปอร์คลอริกสูงขึ้น แสดงให้เห็นว่าช่วงความเข้มข้นของกรดเปอร์คลอริกที่เหมาะต่อการนำมาใช้เพื่อการโปรโตเนตสารฟลูไนตราซีแพม ในตัวทำละลายเอทานอล คือ 1.000 - 3.000 โมลาร์



รูปที่ 26 แสดงสเปกตราการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนต์ของสารละลายมาตรฐานฟลูไนตรา-ซีแพมความเข้มข้น 1.000 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ถูกโปรโตเนตด้วยกรดเปอร์คลอริกเข้มข้น 1.000 – 5.000 โมลาร์ ในตัวทำละลายเอทานอลที่ความยาวคลื่นกระตุ้น 280 นาโนเมตร

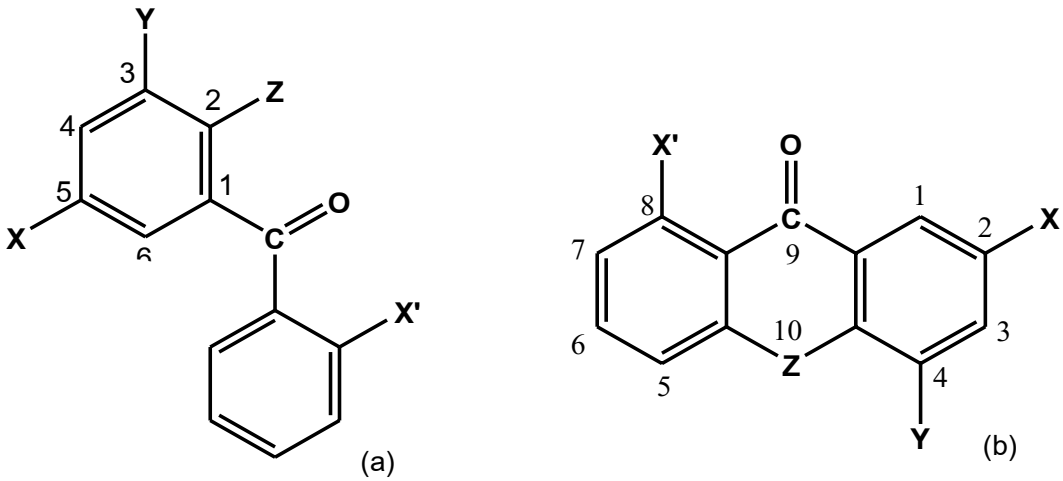
ตารางที่ 14 พื้นที่ใต้กราฟของสเปกตรัมการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์ ความยาวคลื่น 420 – 530 นาโนเมตร ของสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพมความเข้มข้น 1.000 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ถูกโปรโตเนตด้วยกรดเปอร์คลอริก ความเข้มข้น 1.000 – 5.000 โมลาร์ ในตัวทำละลายเอทานอล ที่ความยาวคลื่นกระตุ้น 280 นาโนเมตร

ความเข้มข้นของกรด (โมลาร์)	พื้นที่ใต้กราฟของสเปกตรัมการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์
1.000	2214
2.000	2459
3.000	2328
4.000	1850
5.000	612

พื้นที่ใต้กราฟของสเปกตรัมการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์ ในช่วงความยาวคลื่นที่ศึกษา คือ 420 – 530 นาโนเมตร ของสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพมที่ถูกโปรโตเนตด้วยกรดเปอร์คลอริกความเข้มข้นต่างๆ ในเอทานอล ที่ความยาวคลื่นกระตุ้น 280 นาโนเมตร (ตารางที่ 14) พบว่า เมื่อความเข้มข้นของกรดเปอร์คลอริกสูงกว่า 2.000 โมลาร์ พื้นที่ใต้กราฟของสเปกตรัมการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์ของสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพม ที่ถูกโปรโตเนตด้วยกรดเปอร์คลอริก ในสภาวะที่ทำการวิจัย มีแนวโน้มของพื้นที่ใต้กราฟลดลงอย่างเป็นลำดับ ทั้งนี้เนื่องจากการเปล่งแสงของแถบการเปล่งแสงในช่วงความยาวคลื่นก่อน 400 นาโนเมตร ที่สูงขึ้นตามความเข้มข้นของกรดในสารละลายตัวอย่าง และมีความกว้างของแถบการเปล่งแสงที่เพิ่มขึ้น จนเกิดการซ้อนทับกับแถบการเปล่งแสงที่ทำการศึกษา ทำให้พื้นที่ใต้กราฟของสเปกตรัมการเปล่งแสงในช่วงที่ศึกษาลดลง และมีลักษณะของแถบการเปล่งแสงที่ไม่ชัดเจน

จากการวิเคราะห์ความเข้มข้นของกรดเปอร์คลอริกที่เหมาะสำหรับนำมาใช้ในการโปรโตเนต เพื่อการตรวจพิสูจน์สารฟลูไนตราซีแพมในตัวทำละลายเอทานอล ในช่วงความเข้มข้นของกรด 1.000 - 5.000 โมลาร์ สรุปได้ว่า ความเข้มข้นของกรดเปอร์คลอริก 2.000 โมลาร์ เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการโปรโตเนตสารฟลูไนตราซีแพม ภายใต้สภาวะที่ทำการวิจัยมากที่สุด เนื่องจากให้สเปกตรัมการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์ของฟลูไนตราซีแพมหลังการโปรโตเนตชัดเจน และมีพื้นที่ใต้กราฟของสเปกตรัมการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนต์สูงสุด

ในการศึกษาโครงสร้างเบื้องต้นของสารฟลูไนตราซีแพมหลังการโปรโตเนตด้วยกรดเปอร์คลอริกศึกษาโดยใช้เทคนิคแมสสเปกโตรเมทรี และผลจากการทำเคมีคำนวณ โดยอาศัยข้อมูลพื้นฐานจากงานวิจัยของ Bruyne และคณะ ในปี1984 โดยในงานวิจัยดังกล่าวเป็นการศึกษาสารผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสในกรดของสารคลอนาซีแพม (clonazepam) ฟลูไนตราซีแพม (flunitrazepam) และไนตราซีแพม (nitrazepam) โดยจำแนกคุณสมบัติทางเคมีของสารผลิตภัณฑ์ข้างเคียง (by product) ที่เกิดขึ้นหลายชนิดด้วยเทคนิค TLC, HPLC, MS และ ^{1}H-NMR พบว่าอนุพันธ์หลังการทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสสารฟลูไนตราซีแพมด้วยกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 10 โมลาร์ ฟลูไนตราซีแพมมีโอกาสเปลี่ยนเป็นโครงสร้างหลักได้ 2 รูปแบบใหม่ คือ Benzophenones (รูปที่ 27a) และ 9,10-dihydroacridin-9-ones (รูปที่ 27b) และพบหมู่แทนที่บนตำแหน่ง X X’ Y และ Z แตกต่างกัน ซึ่งผู้วิจัยสนใจเฉพาะหมู่แทนที่ที่มีความสอดคล้องกับงานวิจัยดังแสดงในตารางที่ 15 โดยจากผลการศึกษาด้วยเทคนิคแมสสเปก-โตรเมทรีนั้น หมู่แทนที่ในโครงสร้างและค่ามวลต่อประจุ (m/z) ของ 8 พีคหลัก ที่มีเปอร์เซ็นต์อุดมสัมพัทธ์ (%abundant) มากที่สุด พบว่าแต่ละโครงสร้างมีค่า m/z แตกต่างกัน (ตารางที่ 15)



Benzophenones **9,10-Dihydroacridin-9-ones**

รูปที่ 27 โครงสร้างของฟลูไนตราซีแพม หลังการโปรโตเนตด้วยกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 10 โมลาร์ (Bruyne. *et al*., 1984)

ตารางที่ 15 แสดงหมู่แทนที่ในโครงสร้างของฟลูไนตราซีแพม หลังจากโปรโตเนตด้วยกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 10 โมลาร์ และค่ามวลต่อประจุ (Bruyne. *et al*., 1984)

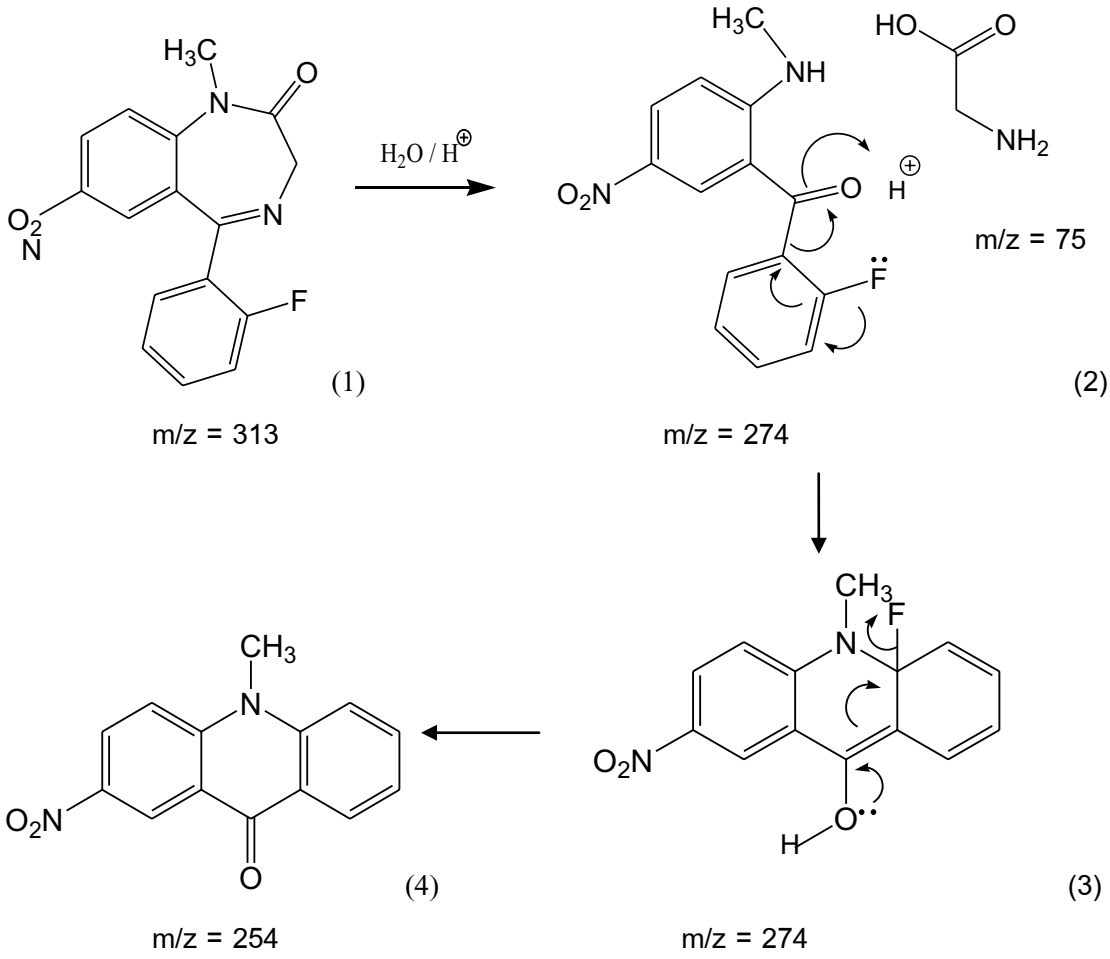
โครงสร้าง	หมู่แทนที่ในตำแหน่ง				ค่ามวลต่อประจุ (m/z)
	X	Y	Z	X'	
Benzophenones	NO_2	H	$NHCH_3$	F	274 211 273 123 257 95 275 133
9,10-Dihydroacridin-9-ones	NO_2	Cl	NCH_3	H	288 242 290 179 152 178 151 164

ในงานวิจัยชิ้นนี้ ได้ศึกษาโครงสร้างของสารฟลูไนตราซีแพมที่ถูกโปรโตเนตด้วยกรดเปอร์คลอริก ด้วยเทคนิคแมสสเปกโทรเมทรี พบว่า สารฟลูไนตราซีแพมแสดงค่า m/z สอดคล้องกับโครงสร้างที่ 313.1(29%) 312.1(36%) 294.1(12%) 286.1(36%) 266.1(23%) 238.1(22%) และมีพีคที่เกิดจากการแตกของโครงสร้างด้วย m/z ค่าต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 16 โดยมวลโมเลกุลของฟลูไนตราซีแพมเท่ากับ 313 และผลที่ได้จากการวิเคราะห์ให้ผลที่มีความสอดคล้องกับผลของแมสสเปกตรัมจากผลงานวิจัยของ Malanciuc และ

คณะ (2009) ซึ่งได้รายงานค่า m/z ของฟลูไนตราซีแพม คือ 285 312 313 286 266 238 294 และ 284 ค่า m/z ของสารฟลูไนตราซีแพมมีความแตกต่างอย่างชัดเจน เมื่อเทียบกับค่า m/z ของสารฟลูไนตราซีแพมหลังถูกโปรโตเนต โดยพีคหลักเกิดขึ้นที่ค่า m/z เท่ากับ 253.5 [M^+] (55%) 126.8 [M^+-127] (100%) 68.9 [M^+-185] (33%) และ 66.9 [M^+-187] (55%) เป็นต้น สอดคล้องกับโครงสร้างที่เป็นอนุพันธ์หลัก ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสตามงานวิจัยของ Bruyne และคณะ (1984) เมื่อพิจารณาผลจากแมสสเปกตรัมของสารฟลูไนตราซีแพมที่ถูกโปรโตเนต พบว่าค่า m/z ที่ 253.5 มีความเป็นไปได้สูงที่จะเป็นอนุพันธ์ของ 9,10-dihydroacridin-9-ones (มวลโมเลกุล 288) ที่สูญเสียอะตอมคลอรีนในตำแหน่ง Y (รูปที่ 27b) แต่กลับไม่พบพีคที่ค่า m/z เท่ากับ 274 ของอนุพันธ์ benzophenone จึงตั้งสมมติฐานได้ว่าโครงสร้างสารใหม่ที่เกิดจากสารฟลูไนตราซีแพมที่ถูกโปรโตเนต ซึ่งมีสมบัติเชิงแสงเปลี่ยนไปนั้น เป็นโครงสร้างของอนุพันธ์ 2-nitro-*N*-methylacridone ส่วน benzophenone นั้น อาจอยู่ในรูปของสารมัธยันต์ หรือสารอินเทอร์มีเดียท (intermediate) ที่มีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างต่ออย่างรวดเร็วมาเป็น 2-nitro-*N*-methylacridone

ตารางที่ 16 แสดงค่ามวลต่อประจุของสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพม และสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพม ที่ถูกโปรโตเนตด้วยกรดเปอร์คลอริกเข้มข้น 2.000 โมลาร์ ในตัวทำละลายเอทานอล

ตัวอย่าง	ค่ามวลต่อประจุ (m/z)
สารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพม	313 312 294 286 266 248 239 238 237 210 183 178 161 149 133 111 97 85 83 และ 71
สารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพมที่ถูกโปรโตเนต	280.7 253.5 218.8 180.8 168.8 130.9 126.8 118.9 68.9 และ 66.9



รูปที่ 28 แสดงการแตกตัวของโครงสร้างโมเลกุลของฟลูไนตราซีแพมที่ถูกโปรโตเนต ด้วยกรดเปอร์คลอริกความเข้มข้น 2.000 โมลาร์ ในตัวทำละลายเอทานอล

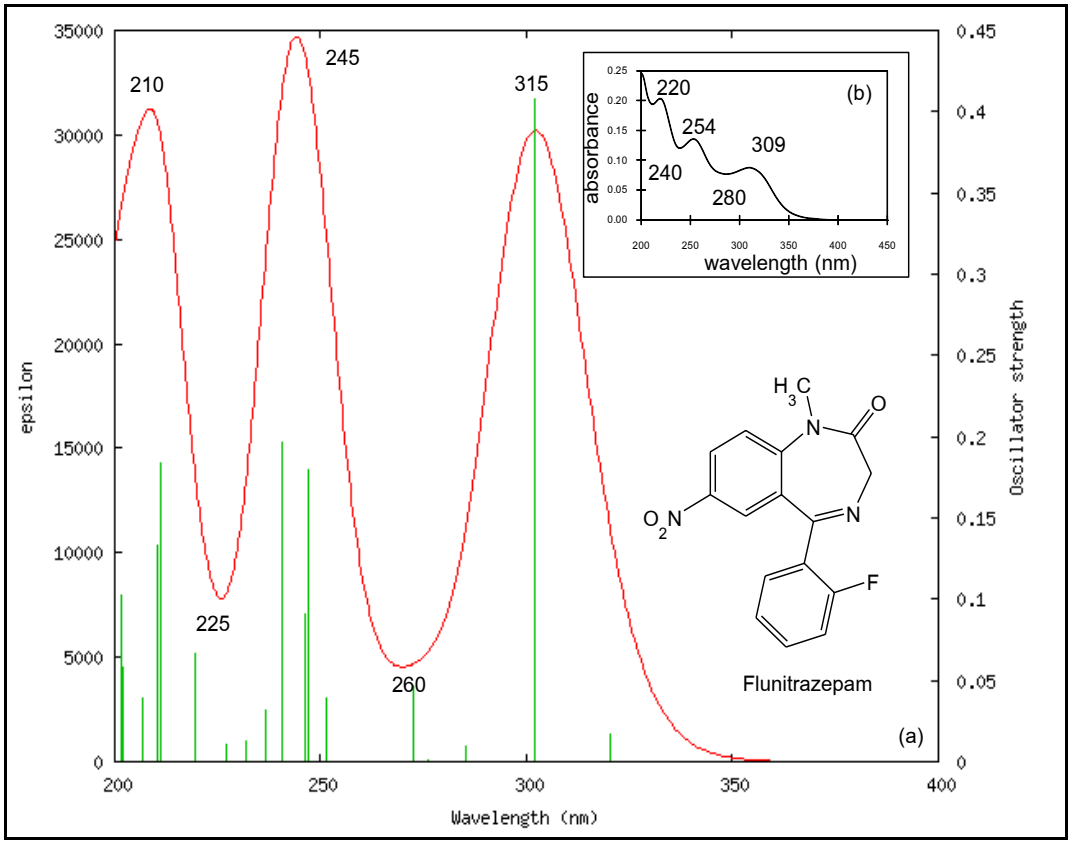
รูปแบบการแตกตัวของสารฟลูไนตราซีแพมที่ถูกโปรโตเนตนั้น มีความซับซ้อนและแตกต่างจากรูปแบบการแตกตัวของสาร 2-nitro-*N*-methylacridone ที่ได้รายงานไว้ในตารางที่ 15 เนื่องจากสภาวะที่ใช้ในการทดลองและการมีสารเริ่มต้นที่แตกต่างกันที่หมู่แทนที่คลอรีนในตำแหน่ง Y โดยฟลูไนตราซีแพมที่ถูกโปรโตเนตนั้นเริ่มต้นจากโครงสร้างที่ไม่มีอะตอมคลอรีน นอกจากนี้สารตัวอย่างที่ใช้ในการวัดหาแมสสเปตรัมนั้น ไม่ได้อยู่ในรูปของแข็งบริสุทธิ์ แต่เป็นของเหลวที่มีเอทานอลเป็นตัวทำละลายและมีกรดเปอร์คลอริก เพื่อทำให้เกิดการโปรโต-เนตบนสารฟลูไนตราซีแพม ซึ่งไม่สามารถที่จะนำสารผสมที่มีปริมาณของสารฟลูไนตราซีแพมเพียงเล็กน้อย มาระเหยตัวทำละลายหรือกำจัดกรดออกได้ ดังนั้น การทำนายกลไกการแตกตัวเพื่อให้เบสพีคที่ m/z 126.8 และพีคที่มีค่าความอุดมสัมพัทธ์สูงๆ อื่น จึงทำได้ยาก

ข้อมูลที่เป็นประโยชน์และคณะผู้วิจัยให้ความสนใจจากการวัดหาแมสสเปกตรัมของสารฟลูไนตราซีแพมที่ถูกโปรโตเนตด้วยสารละลายละลายกรด คือ ข้อมูลที่ m/z 253.5 เพื่อทำนายโครงสร้างเริ่มต้นหลังจากเติมกรด ว่ามีการเปลี่ยนแปลงได้โครงสร้างใหม่ในรูปแบบใด ระหว่างอนุพันธ์ของ acridone และอนุพันธ์ของ benzophenone ซึ่งในเบื้องต้นค่า m/z สอดคล้องกับค่าโครงสร้างของอนุพันธ์ของ acridone รวมถึงคุณสมบัติในการเปล่งแสงที่ได้ควรเกิดขึ้นในรูปของอนุพันธ์ acridone มากกว่า benzophenone เนื่องจากมีความเป็นวง-แหวนที่อยู่ในระนาบเดียวกันเกิดพันธะไพคอนจูเกชันของ acridone ได้มากกว่า โดยในปี 2002 Lunardi และคณะ ได้รายงานการเปล่งแสงของสาร 10-alkyl-9(10H)-acridone ในตัวทำละลายชนิดต่างๆ ในช่วงความยาวคลื่น 410-460 นาโนเมตร ข้อมูลดังกล่าวจึงเป็นการยืนยันในเบื้องต้นว่า สารที่เกิดขึ้นจากการโปรโตเนตมีแนวโน้มเป็นสารอนุพันธ์ของ acridone ซึ่งมีคุณสมบัติในการเปล่งแสงได้

เนื่องจากข้อจำกัดเรื่องปริมาณของสารฟลูไนตราซีแพม จึงทำให้ไม่สามารถทำบริสุทธิ์และยืนยันโครงสร้างของสารฟลูไนตราซีแพมที่ผ่านการโปรโตเนต ด้วยเทคนิคเบื้องต้นอื่นๆ จึงได้ประยุกต์ใช้การคำนวณทางเคมีโดยใช้โปรแกรม Guassian 09 (Frisch *et.al*., 2009) หาโครงสร้างที่เหมาะสม (optimized structure) ด้วย B3LYP basis set เป็น 6-31+G(d,P) หาพลังงานของ electronic state ด้วยเทคนิค Time Dependent Density Functional Theory (TDDFT) CAM-B3LYP basis set เป็น 6-311++G (2d,2P) และสร้างแบบจำลองด้วยโปรแกรม Guassum (Oboyle *et al*., 2008) ในการช่วยทำนายโครงสร้างหลักของฟลูไนตราซีแพมที่ถูกโปรโตเนตในตัวทำละลายเอทานอล ทั้งในรูปแบบของ benzophenone และ 9,10-dihydro-acridin-9-one โดยวิธี Self, Consistent Reaction Field (SCRF) และใช้ Polarized Comti-nuum Model (PCM) (Yunai *et al*., 2004, Miertus *et al*.,1996, Miertus and Tomasi, 1982 and Cossi *et al*., 1996) ในการยืนยันว่าข้อมูลที่ได้จากการทำคำนวณด้วยพารามิเตอร์ที่กำหนดมีความน่าเชื่อถือ จึงได้เทียบผลการคำนวณและสร้างแบบจำลองการดูดกลืนแสงกับสเปกตรัมการดูดกลืนแสงของ สารมาตรฐานฟลูไนตราซีแพมในตัวทำละลายเอทานอล

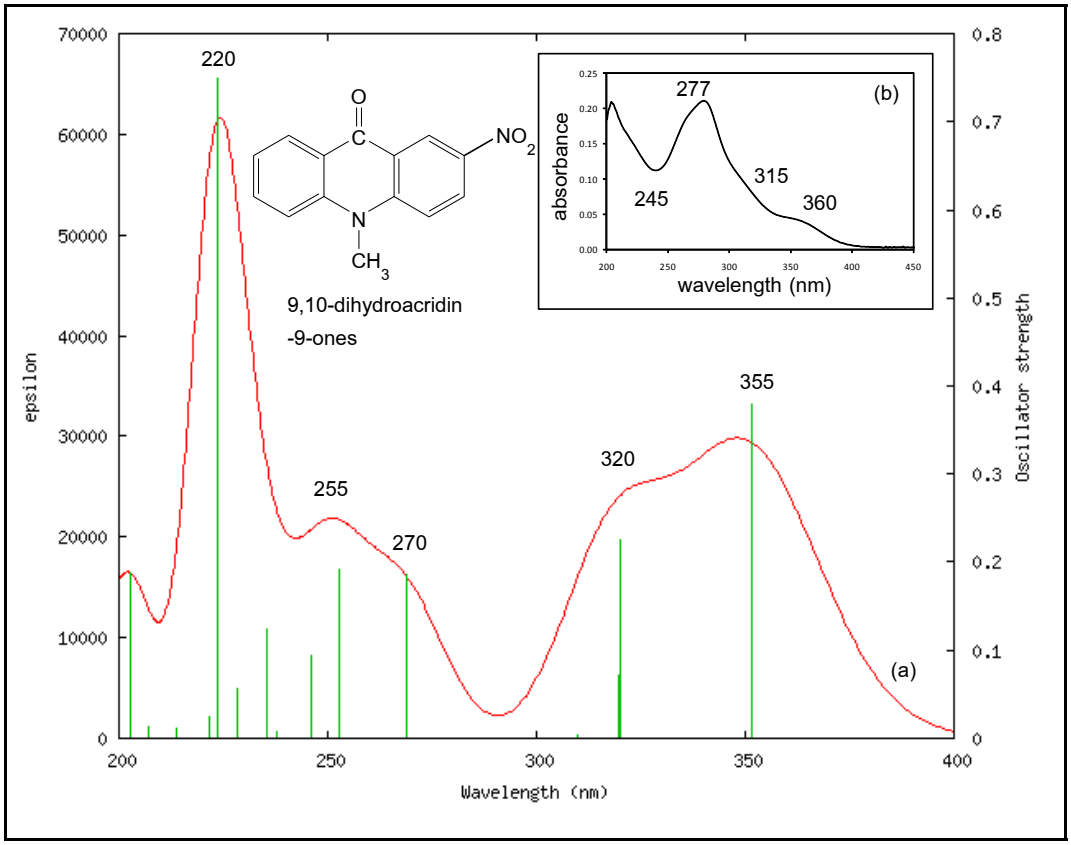
แม้ว่าโครงสร้างของ benzophenone และ 9,10-dihydroacridin-9-one (รูปที่ 27a และ 27b) มีจำนวนโครโมฟอร์ใกล้เคียงกัน แต่จากการปิดของวงแหวนตรงกลางของสาร 9,10-dihydroacridin-9-one มีผลทำให้ความยาวคลื่นของการดูดกลืนแสงของสาร 9,10-dihy-droacridin-9-one เกิดขึ้นที่ความยาวคลื่นเพิ่มขึ้น

ในการสร้างแบบจำลองของสเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารฟลูไนตราซีแพมในตัวทำละลายเอทานอล เปรียบเทียบกับสเปกตรัมการดูดกลืนแสงที่ได้จากการทดลอง ดังรูปที่ 28 พบว่าสเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารฟลูไนตราซีแพมที่ได้จากการทดลอง และที่ได้จากการคำนวณมีความสอดคล้องกันของจำนวนพีคและความยาวคลื่นของพีคหลักที่ปรากฏ ในขั้นต้นได้ทำการวิเคราะห์โครงสร้างเบื้องต้นของสารฟลูไนตราซีแพมใน ตัวทำละลายเอทานอล พบว่าทั้งผลจากการคำนวณ และผลจากการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายตัวอย่างจริงให้ความยาวคลื่นที่สารละลายตัวอย่างเกิดการดูดกลืนแสงสูงสุด 3 พีคหลัก คือ 210 245 และ 315 นาโนเมตร จากการทำเคมีคำนวณ และ 220 254 และ 309 นาโนเมตร จากการวัดการดูดกลืนแสง (รูปที่ 29) แสดงว่าวิธีการทำเคมีคำนวณ สามารถที่จะนำมาใช้ในการทำนายโครงสร้างเบื้องต้นของสารตัวอย่าง จากการสร้างแบบจำลองสเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารได้



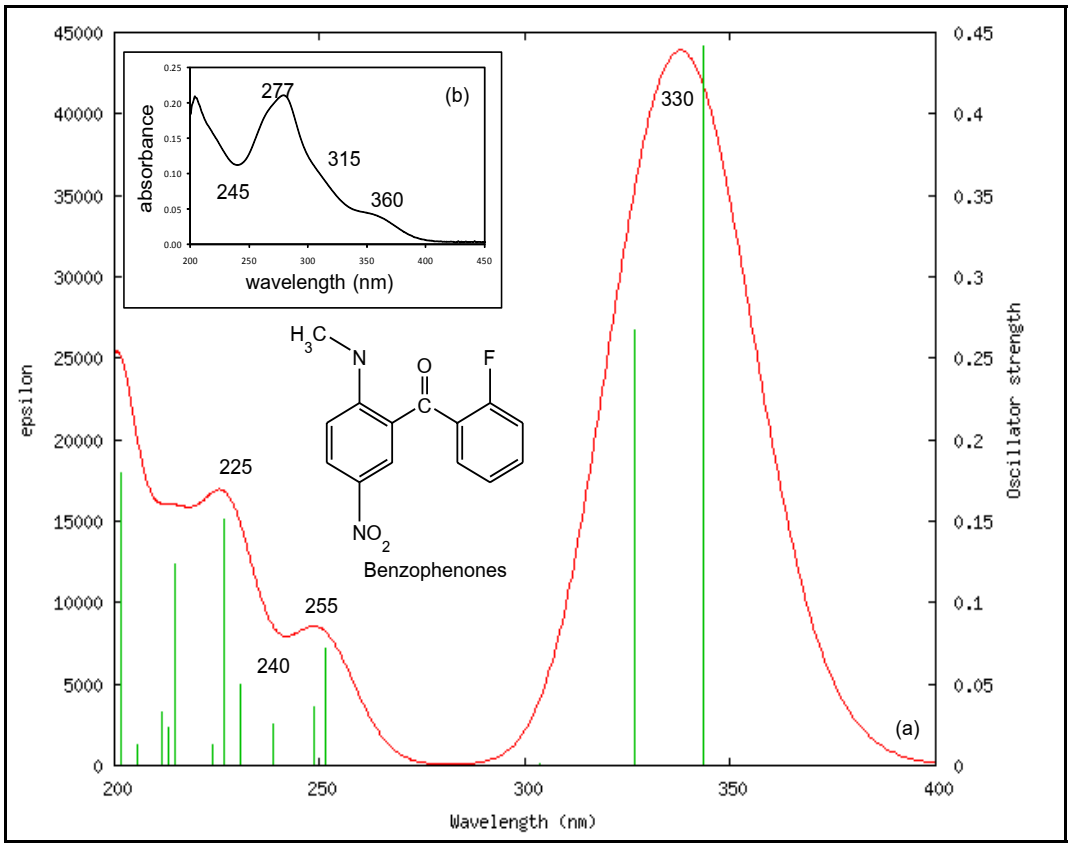
รูปที่ 29 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของฟลูไนตราซีแพม ในตัวทำละลาเอทานอล จาก (a) การทำเคมีคำนวณ และ (b) ผลการวิเคราะห์ในงานวิจัยนี้

หลังจากนั้น ทำการสร้างแบบจำลองแถบการดูดกลืนแสงของสาร 2-nitro-*N*-methylacridone ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของสาร 9,10-dihydro-acridin-9-one ในตัวทำละลายเอทา-นอล เพื่อเปรียบเทียบกับสเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารฟลูไนตราซีแพมหลังผ่านการเติมกรดเปอร์คลอริก พบว่า สเปกตรัมจากการทำเคมีคำนวณปรากฏแถบการดูดกลืนแสงหลักในช่วงความยาวคลื่น 225 – 400 นาโนเมตร โดยปรากฏแถบการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 255 270 320 และ 355 นาโนเมตร ตามลำดับ (รูปที่ 30a) ขณะที่ความยาวคลื่นที่มีการดูดกลืนแสงสูงสุดจากการวิเคราะห์ปรากฏที่ความยาวคลื่น 3 ตำแหน่ง ได้แก่ 275 นาโนเมตร เป็นตำแหน่งที่มีการดูดกลืนแสงสูงสุด และปรากฏ shoulder ที่ตำแหน่งความยาวคลื่น 315 และ 360 นาโนเมตร (รูปที่ 30b) ซึ่งมีความใกล้เคียงกัน



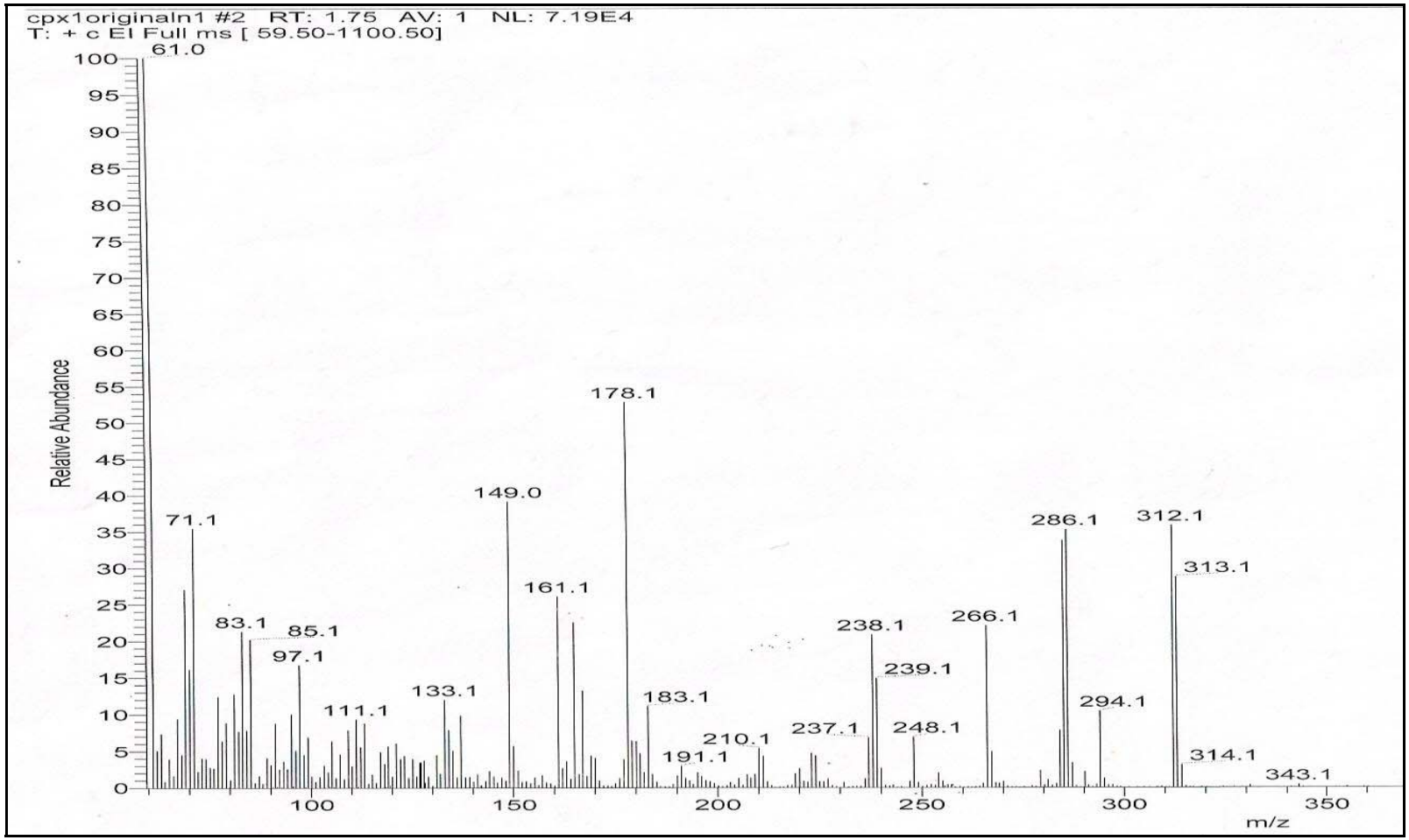
รูปที่ 30 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของ 9,10-dihydroacridin-9-ones ในตัวทำละลายเอทานอล จาก (a) การทำเคมีคำนวณ และ (b) ผลการวิเคราะห์ในงานวิจัยนี้

แต่เมื่อเปรียบเทียบสเปกตรัมการดูดกลืนแสงจากการทำเคมีคำนวณ และจากการวิเคราะห์การดูดกลืนแสงของฟลูไนตราซีแพมหลังจากถูกโปรโตเนต ในรูปที่ 31a และ 31b ตามลำดับ โดยใช้โครงสร้างแบบ benzophenone ในการเปรียบเทียบผลที่ได้ พบว่าสเปกตรัมการดูดกลืนแสงของฟลูไนตราซีแพมเมื่อมีการเติมกรด ที่ได้จากการทำการวิเคราะห์ในงานวิจัยนั้น มีความแตกต่างของตำแหน่งการดูดกลืนแสงกับผลที่ได้จากการทำเคมีคำนวณมากกว่าใช้โครงสร้างแบบ 2-nitro-*N*-methylacridone คือ ตำแหน่งการดูดกลืนแสงสูงสุดหลังการโปรโตเนตที่ความยาวคลื่น 277 นาโนเมตรนั้น ไม่ปรากฏในผลการดูดกลืนแสงจากการทำเคมีคำนวณ

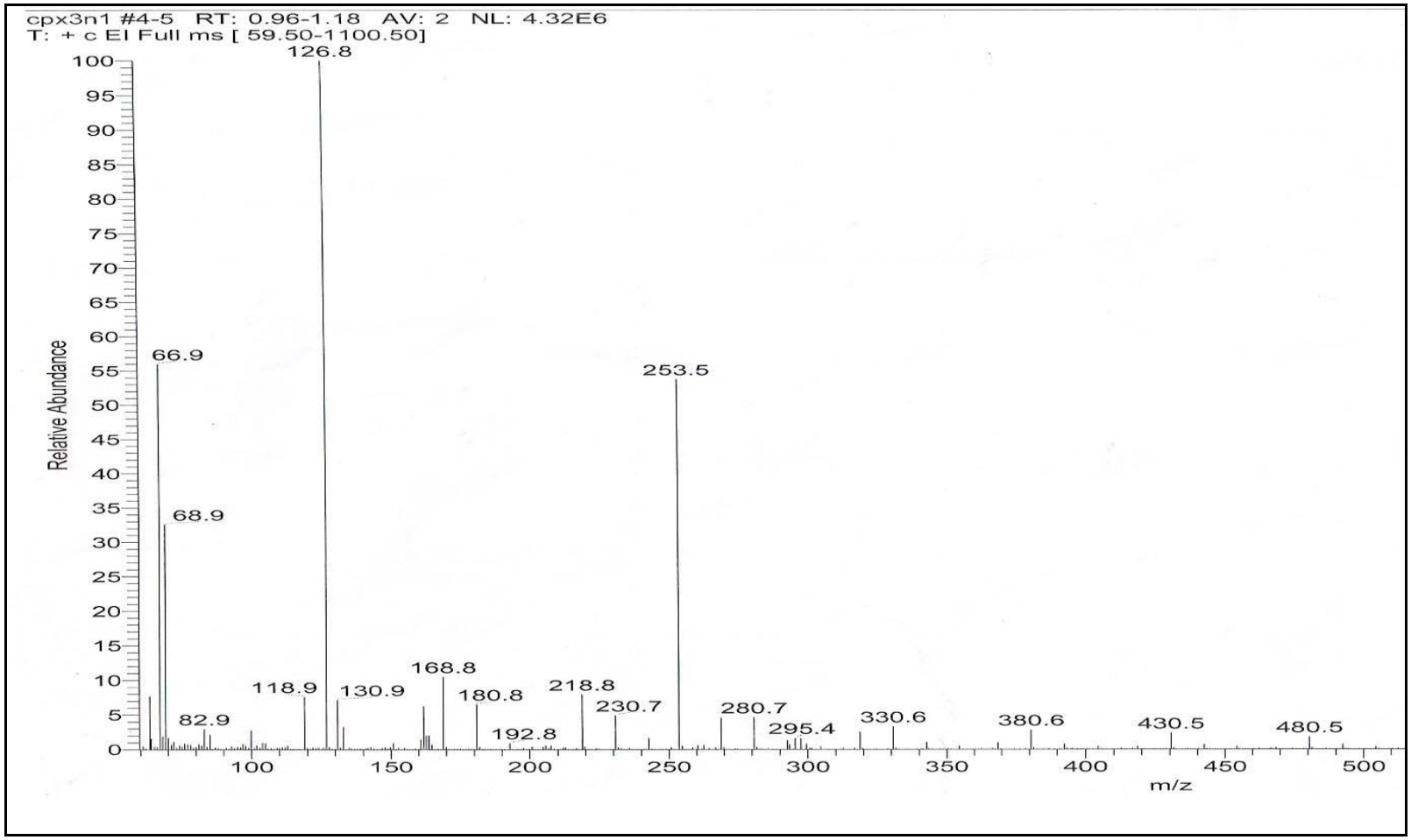


รูปที่ 31 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของ benzophenone ในตัวทำละลายเอทานอล จาก (a) การทำเคมีคำนวณ และ (b) ผลการทดลองที่ได้จากงานวิจัยนี้

จากการทำนายโครงสร้างด้วยเทคนิคแมสสเปกโตรเมทรี ข้อมูลการเปล่งแสงลูมิเนสเซนซ์ และการศึกษาแบบจำลองการดูดกลืนแสงจากการทำเคมีคำนวณ จึงสรุปได้ว่าสารฟลูไนตราซีแพมที่ผ่านการเติมกรดหรือเกิดการโปรโตเนตแล้วนั้น มีโครงสร้างใหม่ที่จัดอยู่ในรูปของอนุพันธ์ของสาร acridone



รูปที่ 32 แสดงแมสสเปกตรัมของฟลูไนตราซีแพม ในตัวทำละลายเอทานอล

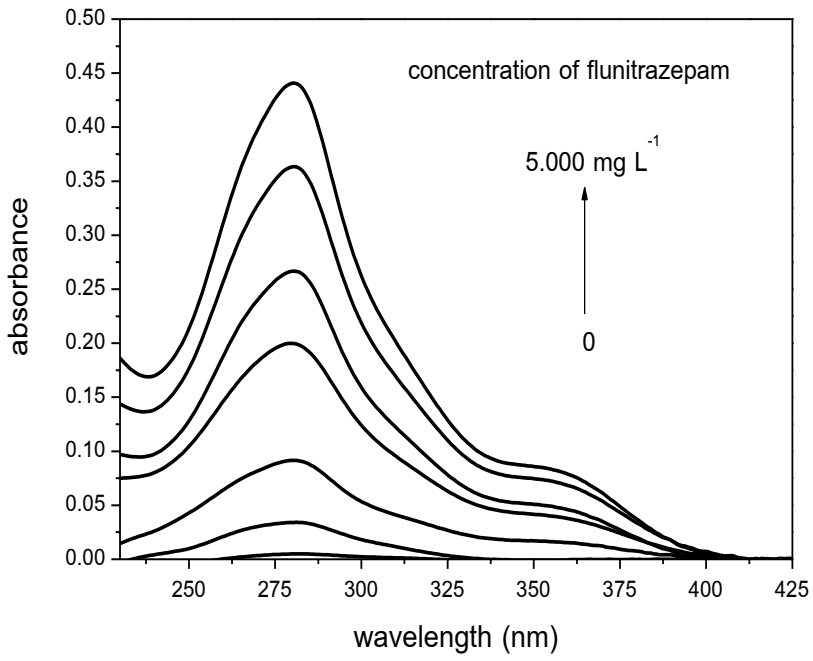


รูปที่ 33 แสดงแมสเปกตรัมของฟลูไนตราซีแพมที่ถูกโปรโตเนตด้วยกรดเปอร์คลอริก ในตัวทำละลายเอทานอล

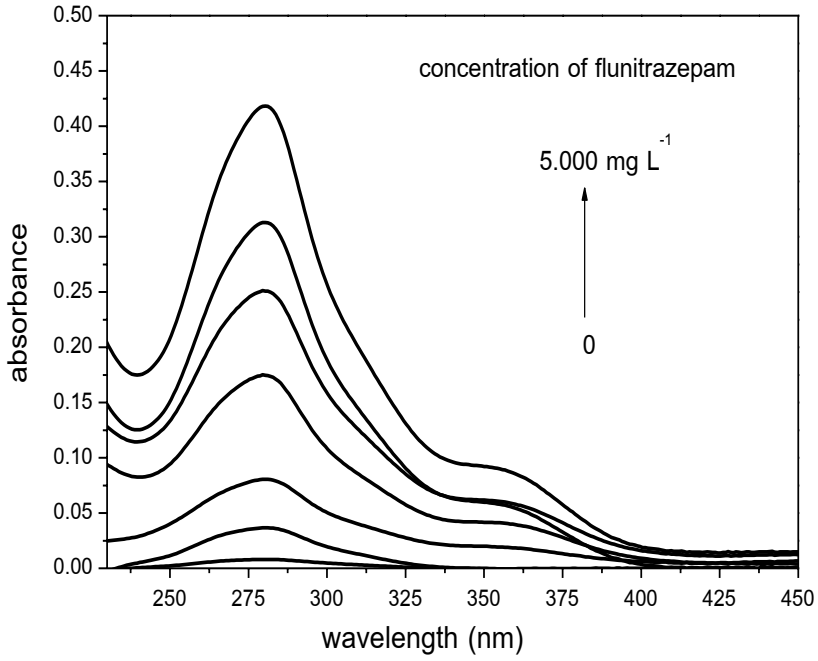
3.4.4 ศึกษาความเข้มข้นต่ำสุดของฟลูไนตราซีแพม ที่สามารถตรวจพิสูจน์ได้

เป็นการศึกษาความสามารถของวิธีการที่ใช้ในการทดลอง สำหรับการตรวจพิสูจน์เข้มข้นต่ำสุดของสารฟลูไนตราซีแพม โดยประเมินจากผลของการวิเคราะห์การดูดกลืนแสงและการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์ ที่ตรวจพบความเข้มข้นต่ำสุดสารละลายฟลูไนตราซีแพมที่ถูกโปรโตเนตด้วยกรดเปอร์คลอริกความเข้มข้น 2.000 โมลาร์ ในตัวทำละลายเอทานอล

จากรูปที่ 34 และ 35 และข้อมูลในตารางที่ 17 แสดงให้เห็นว่า สารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพม และสารละลายฟลูไนตราซีแพมจากยาเม็ดโรฮิปนอล ในช่วงความเข้มข้นที่ทำการทดสอบ คือ 0.100 – 5.000 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังการโปรโตเนตด้วยกรดเปอร์คลอริกในตัวทำละลายเอทานอล มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นดูดกลืนแสงสูงสุด คือ 280 (±3) นาโนเมตร เพิ่มขึ้นเป็นลำดับตามความเข้มข้นของฟลูไนตราซีแพมในสารละลายตัวอย่าง



รูปที่ 34 แสดงสเปกตราการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพม ที่ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อถูกโปรโตเนตด้วยกรดเปอร์คลอริก ความเข้มข้น 2.000 โมลาร์ ในตัวทำละลายเอทานอล

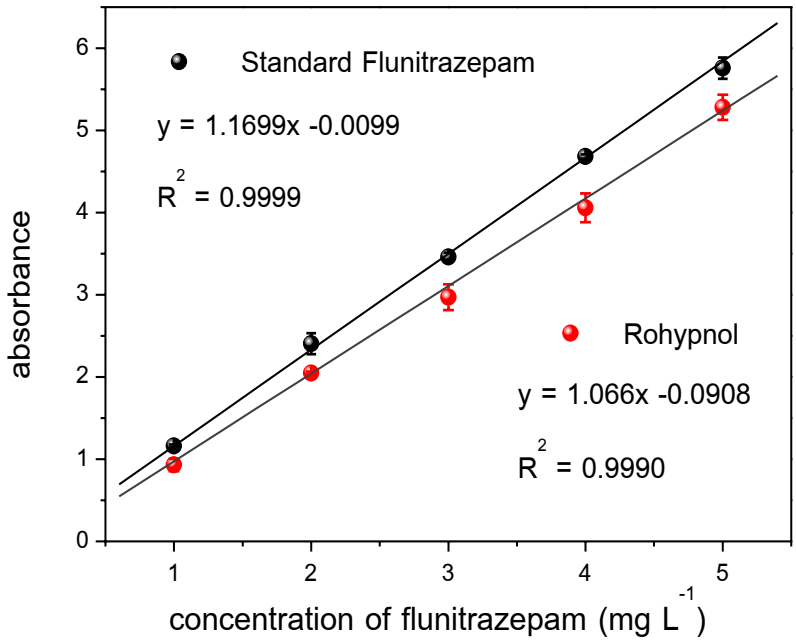


รูปที่ 35 แสดงสเปกตราการดูดกลืนแสงของสารละลายฟลูไนตราซีแพมจากยาเม็ดโร-ฮิปนอลที่ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อถูกโปรโตเนตด้วยกรดเปอร์คลอริกความเข้มข้น 2.000 โมลาร์ ในตัวทำละลายเอทานอล

ตารางที่ 17 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร ของสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพมและสารละลายฟลูไนตราซีแพมจากยาเม็ดโรฮิปนอล ที่ถูกโปรโตเนตด้วยกรดเปอร์คลอริกความเข้มข้น 2.000 โมลาร์ ในตัวทำละลายเอทานอล หลังการทำ baseline correction

ความเข้มข้นของ ฟลูไนตราซีแพม (mg L^{-1})	ค่าการการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร	
	สารละลายมาตรฐาน	สารละลายยาเม็ดโรฮิปนอล
0.100	0.0096 ±0.0017	0.0137 ±0.0019
0.500	0.0388 ±0.0007	0.0412 ±0.0008
1.000	0.0963 ±0.0029	0.0851 ±0.0035
2.000	0.2044 ±0.0019	0.1792 ±0.0104
3.000	0.2715 ±0.0064	0.2555 ±0.0099
4.000	0.3681 ±0.0034	0.3234 ±0.0073
5.000	0.4456 ±0.0110	0.4229 ±0.0101

ค่าการดูดกลืนแสงของฟลูไนตราซีแพม หลังการโปรโตเนตด้วยกรดเปอร์-คลอริกในตัวทำละลายเอทานอล จากสารละลายมาตรฐานและสารละลายยาเม็ดโรฮิปนอล ให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ใกล้เคียงกัน (รูปที่ 36) และให้ความสัมพันธ์ที่เป็นเส้นตรงของกราฟระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับค่าความเข้มข้นของฟลูไนตราซีแพมในสารละลายตัวอย่าง ในช่วงความเข้มข้น 1.000 – 5.000 มิลลิกรัมต่อลิตร



รูปที่ 36 แสดงกราฟมาตรฐานค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร ของสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพม และสารละลายฟลูไนตราซีแพมจากยาเม็ดโรฮิป-นอล ที่ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อถูกโปรโตเนตด้วยกรดเปอร์คลอริกเข้มข้น 2.000 โมลาร์ ในตัวทำละลายเอทานอล หลังการทำ baseline correction

การตรวจพิสูจน์ฟลูไนตราซีแพมในสารละลายตัวอย่างเบื้องต้น ควรพิจารณาทั้งรูปแบบของสเปกตรัมการดูดกลืนแสง และพื้นที่ใต้กราฟของสเปกตรัมการดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่น 250 – 300 นาโนเมตร เนื่องจากสารละลายฟลูไนตราซีแพม (จากสารมาตรฐานและยาเม็ดโรฮิปนอล) ที่โปรโตเนตด้วยกรดเปอร์คลอริกความเข้มข้น 2.000 โมลาร์ ตามสภาวะที่ทำการวิจัย เกิดการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่นใกล้เคียงกับสารละลายกรดเปอร์คลอริกที่ไม่มีสารฟลูไนตราซีแพม แม้ว่าค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโน-เมตร เป็นผลจากความเข้มข้นของฟลูไนตราซีแพมที่ถูกโปรโตเนตก็ตาม แต่การวิเคราะห์ตัวอย่างที่มีความเข้มข้นของสารฟลูไนตราซีแพมเล็กน้อย ค่าการดูดกลืนแสงมีค่าใกล้เคียงกับสารละลายตัวอย่างกรดเปอร์คลอริกที่ไม่มีสารฟลูไนตราซีแพม จึงยากที่จะพิสูจน์ว่าสารละลาย

ตัวอย่างมีฟลูไนตราซีแพมหรือไม่ ดังนั้น การวิเคราะห์พื้นที่ใต้กราฟสเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพมและสารละลายฟลูไนตราซีแพมจากยาเม็ดโรฮิปนอลที่ถูกโปรโตเนตด้วยกรดเปอร์คลอริกความเข้มข้น 2.000 โมลาร์ หลังการทำ baseline correction สามารถหาความเข้มข้นของฟลูไนตราซีแพมที่ถูกโปรโตเนตอย่างแท้จริงได้ (ตารางที่ 18)

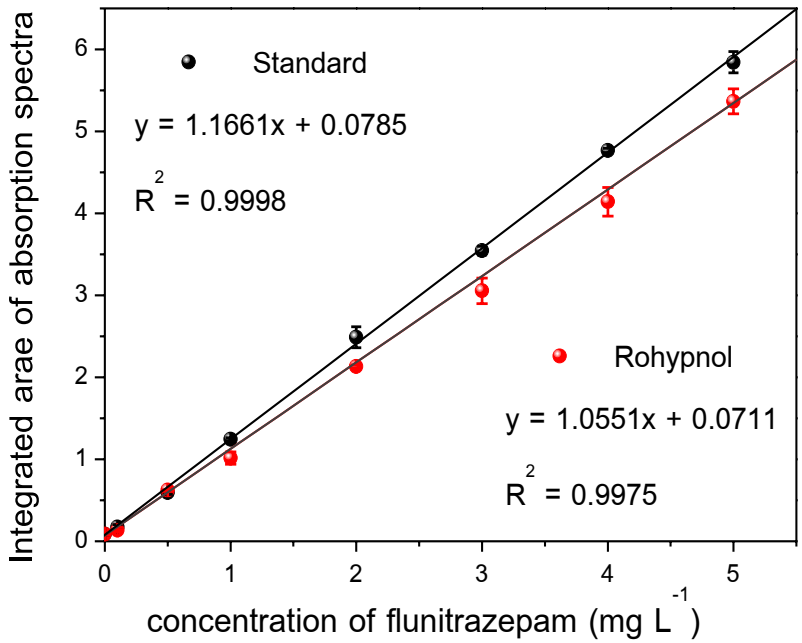
ตารางที่ 18 แสดงพื้นที่ใต้กราฟของสเปกตรัมการดูดกลืนแสงช่วงความยาวคลื่น 250 – 300 นาโนเมตร ของสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพมและสารละลายฟลูไนตราซีแพมจากยาเม็ดโรฮิปนอลที่ถูกโปรโตเนตด้วยกรดเปอร์คลอริกความเข้มข้น 2.000 โมลาร์ ในตัวทำละลายเอทานอล

ความเข้นข้นของ ฟลูไนตราซีแพม ($mg\ L^{-1}$)	พื้นที่ใต้กราฟของสเปกตรัมการดูดกลืนแสง	
	สารละลายมาตรฐาน	สารละลายยาเม็ดโรฮิปนอล
0	0.0852 ± 0.0066	0.0852 ± 0.0066
0.100	0.1718 ± 0.0315	0.1348 ± 0.0062
0.500	0.5938 ± 0.0212	0.6228 ± 0.0050
1.000	1.2454 ± 0.0192	1.0152 ± 0.0752
2.000	2.49 ± 0.128	2.1315 ± 0.0180
3.000	3.5437 ± 0.0523	3.0557 ± 0.1557
4.000	4.7669 ± 0.028	4.1422 ± 0.1749
5.000	5.843 ± 0.1289	5.3655 ± 0.1531

จากข้อมูลในตารางที่ 18 พบว่า พื้นที่ใต้กราฟของสเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพม และสารละลายฟลูไนตราซีแพมจากยาเม็ดโรฮิปนอลที่ถูกโปรโตเนตด้วยกรดเปอร์คลอริก ในสภาวะที่ทำการวิจัย ในช่วงความยาวคลื่น 250 -300 นาโนเมตร หลังทำ baseline correction พบว่า ในช่วงความเข้มข้นเท่ากัน สารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพมและสารละลายฟลูไนตราซีแพม มีค่าพื้นที่ใต้กราฟของสเปกตรัมการดูดกลืนแสงเท่ากันที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 และมีค่าของพื้นที่ใต้กราฟเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของฟลูไนตราซีแพมในสารละลายตัวอย่าง อย่างเป็นลำดับ ซึ่งค่าพื้นที่ใต้กราฟของสเปกตรัมการดูดกลืนแสงต่างกันตามความเข้มข้นอย่างมีนัยสำคัญ (ระดับนัยสำคัญ 0.05) จากการหาขีดจำกัดของการตรวจวัด (Limit of detection ; LOD) คือ ปริมาณหรือความเข้มข้นของสารที่ให้สัญญาณในการตรวจวัดเท่ากับสัญญาณที่วัดได้จากแบลงค์ (blank) บวกกับสามเท่าของส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation) ของสัญญาณจากแบลงค์ และความเข้มข้นต่ำสุดที่ใช้ในการวิเคราะห์เชิงปริมาณ (Limit of Quantitation ; LOQ) จะเท่ากับผลบวกค่าเฉลี่ยจาก

สัญญาณของแบลงค์กับสิบเท่าของส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของแบลงค์ (ธีรศักดิ์ โรจนธารา, 2551) ในที่นี้แบลงค์คือสารละลายกรดเปอร์คลอริกความเข้มข้น 2.000 โมลาร์ พบว่าขีดจำกัดในการตรวจวัด จากการวิเคราะห์ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 277 นาโนเมตร พบว่า ให้สัญญาณของขีดจำกัดในการตรวจวัดเท่ากับ 0.004 เมื่อคำนวณหาความเข้มข้นที่จะตรวจวัดได้จากค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร ของสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพมและสารละลายยาเม็ดโรฮิปนอล เท่ากับ 0.036 และ 0.041 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ และขีดจำกัดความเข้มข้นในการวิเคราะห์เชิงปริมาณ เท่ากับ 0.262 และ 0.296 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ

จากการสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์พื้นที่ใต้กราฟของสเปกตรัมการดูดกลืนแสง ในช่วงความยาวคลื่น 250 – 300 นาโนเมตร หลังทำ baseline correction กับความเข้มข้นของสารฟลูไนตราซีแพมในสารละลายตัวอย่างทั้งสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพมและสารละลายยาเม็ดโรฮิปนอล มีช่วงความเส้นตรงของพื้นที่ใต้กราฟของสเปกตรัมการดูดกลืนแสง ในช่วงความเข้มข้น 0.1000 – 5.000 มิลลิกรัมต่อลิตร (รูปที่ 37)

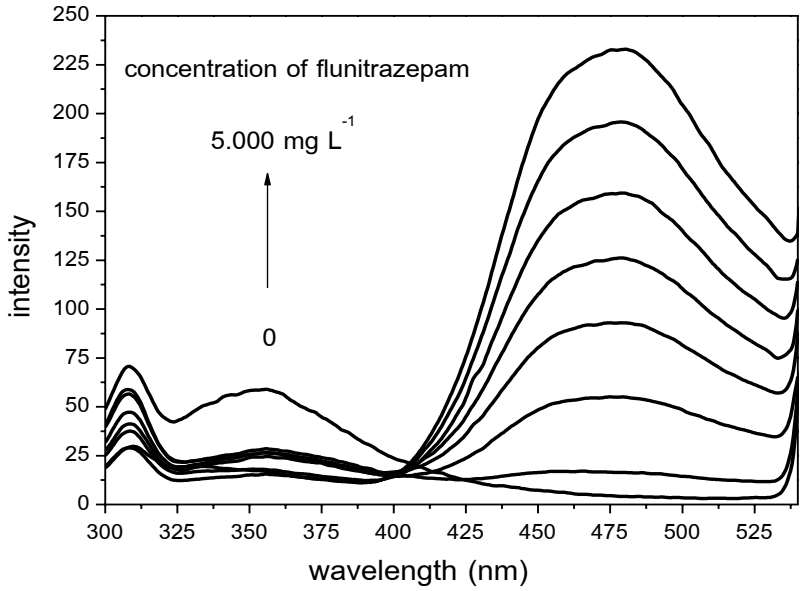


รูปที่ 37 แสดงกราฟมาตรฐานของพื้นที่ใต้กราฟของสเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพม และสารละลายฟลูไนตราซีแพมจากยาเม็ดโรฮิปนอล ที่ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อถูกโปรโตเนตด้วยกรดเปอร์คลอริกเข้มข้น 2.000 โมลาร์ ในตัวทำละลายเอทานอล ช่วงความยาวคลื่น 250 – 300 นาโนเมตร หลังการทำ baseline correction

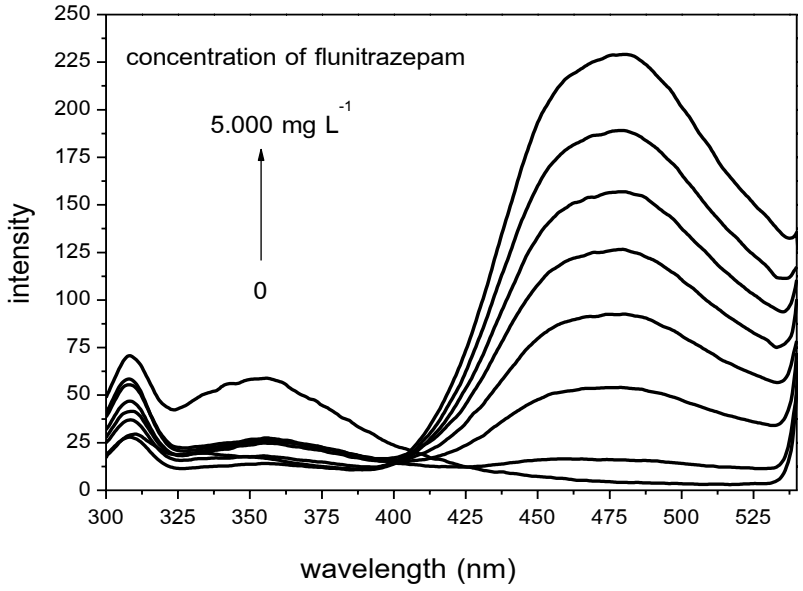
จากกราฟความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ใต้กราฟของสเปกตรัมการดูดกลืนแสงและความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพม และสารละลายฟลูไนตราซีแพมจากยาเม็ดโรฮิปนอล (รูปที่ 37) พบว่า เมื่อสารละลายตัวอย่างมีความเข้มข้นเพิ่มขึ้น พื้นที่ใต้กราฟของสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพม และสารละลายฟลูไนตราซีแพมจากยาเม็ดโรฮิปนอล มีแนวโน้มที่ห่างออกจากกัน มีความเป็นไปได้จากผลขององค์ประกอบอื่นๆ ในเม็ดยาที่ละลายได้ในตัวทำละลายเอทานอล ถึงแม้ว่าองค์ประกอบเหล่านั้นจะไม่ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของลักษณะสเปกตรัมการดูดกลืนแสง แต่เมื่อองค์ประกอบอื่นๆ ในเม็ดยามีปริมาณมากขึ้น อาจเกิดการบดบังหรือทำให้เกิดการกระเจิงของแสงก่อนที่จะผ่านสารละลายตัวอย่าง เป็นผลให้ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายตัวอย่างที่ตรวจวัดได้มีค่าลดลง อย่างไรก็ตาม ในการตรวจสารฟลูไนตราซีแพมในงานวิจัยนี้ เน้นการตรวจในเชิงคุณภาพวิเคราะห์ ดังนั้น การลดลงของค่าความเข้มการดูดกลืนแสงเพียงเล็กน้อย จึงไม่ได้ส่งผลให้ที่สำคัญต่อการตรวจพิสูจน์

ในการเพิ่มความเชื่อมั่น และความถูกต้องของผลการตรวจพิสูจน์เบื้องต้นนั้น โดยทั่วไปแล้วจะมีการใช้วิธีการหรือเทคนิคอื่นๆ ในการตรวจพิสูจน์ซ้ำ เพื่อยืนยันผลของการตรวจพิสูจน์ ในงานวิจัยนี้ได้ใช้ผลของการตรวจพิสูจน์การเปล่งแสงฟลูออเรสซ์ของสารละลายตัวอย่าง เป็นวิธีในยืนยันผลการตรวจพิสูจน์ฟลูไนตราซีแพมในเชิงคุณภาพวิเคราะห์เบื้องต้น ซึ่งวิธีดังกล่าวเป็นวิธีการที่มีขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์ที่ไม่ยุ่งยาก ไม่ซับซ้อน มีความรวดเร็วในการวิเคราะห์ สามารถตรวจวิเคราะห์ต่อจากการวิเคราะห์การดูดกลืนแสงได้ทันที

ผลจากการวัดการเปล่งแสงของสารตัวอย่าง พบว่า สเปกตราการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์ของสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพมและสารละลายฟลูไนตราซีแพมจากยาเม็ดโรฮิปนอล ที่ถูกโปรโตเนตด้วยกรดเปอร์คลอริกความเข้มข้น 2.000 โมลาร์ ในตัวทำละลายเอทานอล เมื่อกระตุ้นด้วยความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร (รูปที่ 38 และ 39) มีค่าความเข้มของการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์ในช่วงความยาวคลื่น 400 – 530 นาโนเมตร เพิ่มขึ้นอย่างเป็นลำดับตามความเข้มข้นของฟลูไนตราซีแพม โดยให้ความเข้มการเปล่งแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 477 (±3) นาโนเมตร



รูปที่ 38 แสดงสเปกตราการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์ของสารละลายมาตรฐานฟลูไน-ตราซีแพมที่ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อโปรโตเนตด้วยกรดเปอร์คลอริกความเข้มข้น 2.000 โมลาร์ ในตัวทำละลายเอทานอล ที่ความยาวคลื่นกระตุ้น 280 นาโนเมตร



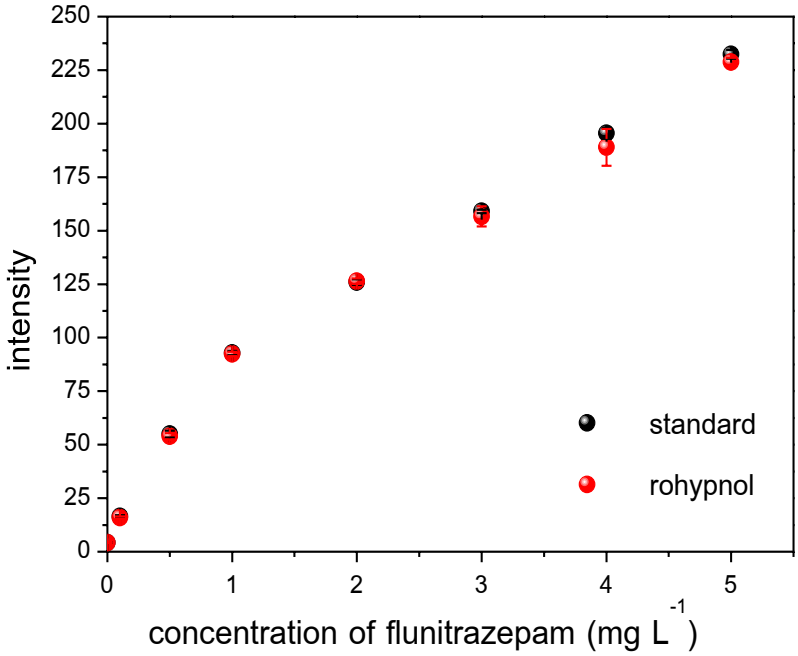
รูปที่ 39 แสดงสเปกตราการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์ของสารละลายฟลูไนตราซีแพมจากยาเม็ดโรฮิปนอล ที่มีการโปรโตเนตด้วยกรดเปอร์คลอริกความเข้มข้น 2.000 โมลาร์ ในตัวทำละลายเอทานอล ที่ความยาวคลื่นกระตุ้น 280 นาโนเมตร

จากข้อมูลตารางที่ 19 แสดงค่าความเข้มการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์ของสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพม และสารละลายฟลูไนตราซีแพมจากยาเม็ดโรฮิปนอล ที่ความยาวคลื่น 477 นาโนเมตร หลังโปรโตเนตด้วยกรดเปอร์คลอริกความเข้มข้น 2.000 โมลาร์ ตามสภาวะที่ได้ทำการทดลอง พบว่า ค่าความเข้มการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์ของสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพม และสารละลายฟลูไนตราซีแพมจากยาเม็ดโรฮิปนอล เพิ่มขึ้นอย่างเป็นลำดับตามความเข้มข้นของฟลูไนตราซีแพม และเมื่อเปรียบเทียบค่าความเข้มการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์ ที่ความยาวคลื่น 477 นาโนเมตร ของสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพม และสารละลายฟลูไนตราซีแพมจากยาเม็ดโรฮิปนอล เมื่อสารละลายตัวอย่างมีความเข้มข้นของฟลูไนตราซีแพมเท่ากัน พบว่า สารละลายฟลูไนตราซีแพมจากยาเม็ดโรฮิปนอลมีค่าความเข้มการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์สูงกว่าสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพมอย่างมีนัยสำคัญ ทั้งนี้มีความเป็นไปได้ที่เป็นผลมาจากการ baseline หรือองค์ประกอบอื่นๆที่มีในเม็ดยาโรฮิปนอล

ตารางที่ 19 แสดงค่าความเข้มการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์ที่ความยาวคลื่น 477 นาโนเมตร ของสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพม และสารละลายฟลูไนตราซีแพมจากยาเม็ดโรฮิปนอล ที่โปรโตเนตด้วยกรดเปอร์คลอริกความเข้มข้น 2.000 โมลาร์ ในเอทานอล เมื่อใช้ความยาวคลื่นกระตุ้นที่ 280 นาโนเมตร

ความเข้มข้นของ ฟลูไนตราซีแพม ($mg\ L^{-1}$)	ค่าความเข้มการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์	
	สารละลายมาตรฐาน	สารละลายยาเม็ดโรฮิปนอล
0	4.263 ± 0.132	4.263 ± 0.132
0.100	16.43 ± 0.58	15.96 ± 0.59
0.500	54.91 ± 1.60	53.94 ± 1.40
1.000	92.82 ± 1.01	92.35 ± 1.04
2.000	125.9 ± 1.3	126.3 ± 1.3
3.000	159.0 ± 0.8	156.6 ± 4.7
4.000	195.5 ± 2.6	188.9 ± 8.7
5.000	232.4 ± 2.0	228.7 ± 2.0

เมื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเข้มการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์และความเข้มข้นของฟลูไนตราซีแพมที่ถูกโปรโตเนตด้วยกรดเปอร์คลอริกความเข้มข้น 2.000 โมลาร์ ในตัวทำละลายเอทานอล (ตารางที่ 19) พบว่า ทั้งสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพมและสารละลายฟลูไนตราซีแพมจากยาเม็ดโรฮิปนอล ไม่ให้ช่วงความเป็นเส้นตรงของกราฟ (รูปที่ 40) โดยมีแนวโน้มให้ค่าการเปล่งแสงลดลงจากช่วงความเป็นเส้นตรง ทั้งนี้เป็นผลจากการเกิด self-quenching reaction ซึ่งเป็นการชนกันของโมเลกุลในสภาวะพื้นกับโมเลกุลที่อยู่ในสภาวะกระตุ้น แล้วเกิดกระบวนการถ่ายเทพลังงานแบบไม่เกิดแสงระหว่างโมเลกุลขึ้นหรือเกิดการชนกับตัวทำละลาย เกิด external conversion ซึ่งเป็นการถ่ายทอดพลังงานที่ไม่เกิดแสง (ลาวัลย์ ศรีพงษ์, 2544) ซึ่งจะเกิดขึ้นเมื่อสารละลายตัวอย่างมีความเข้มข้นสูง หรือเมื่อมีค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายในเซลล์ขนาด 1 เซนติเมตร สูงกว่า 0.02 ยิ่งความเข้มข้นของสารมากขึ้น การเกิด self-quenching reaction จะเพิ่มขึ้น และผลจากการชนกันของโมเลกุล ทำให้การเกิดฟลูออเรสเซนซ์ของสารน้อยลง ค่าความเข้มของการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์ที่ตรวจวัดได้จึงมีค่าลดลง



รูปที่ 40 กราฟความสัมพันธ์ของค่าความเข้มการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์ ที่ความยาวคลื่น 477 นาโนเมตร กับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพม และสารละลายฟลูไนตราซีแพมจากยาเม็ดโรฮิปนอล ที่โปรโตเนตด้วยกรดเปอร์คลอริกความเข้มข้น 2.000 โมลาร์ ในเอทานอล เมื่อใช้ความยาวคลื่นกระตุ้น 280 นาโนเมตร

ตารางที่ 20 แสดงพื้นที่ใต้กราฟของสเปกตรัมการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์ ช่วงความยาวคลื่น 420 ถึง 530 นาโนเมตร หลังทำ baseline correction ของสารละลายมาตรฐานฟลูไนตรา-ซีแพม และสารละลายฟลูไนตราซีแพมจากยาเม็ดโรฮิปนอล หลังผ่านการโปรโตเนตด้วยกรดเปอร์คลอริกความเข้มข้น 2.000 โมลาร์ ในตัวทำละลายเอทานอล ที่ความยาวคลื่นกระตุ้น 280 นาโนเมตร

ความเข้มข้นของฟลูไนตราซีแพม (mg L^{-1})	พื้นที่ใต้กราฟของสเปกตรัมการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์	
	สารละลายมาตรฐาน	สารละลายยาเม็ดโรฮิปนอล
0.100	603.6 ± 33.61	604.7 ± 33
0.500	2192 ± 67	2143 ± 61
1.000	3686 ± 31	3687 ± 32
2.000	5022 ± 45	5011 ± 44
3.000	6399 ± 12	6282 ± 156
4.000	7464 ± 83	7596 ± 352
5.000	9271 ± 80	9130 ± 77

พื้นที่ใต้กราฟของสเปกตรัมการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์ ในช่วงความยาวคลื่น 420 – 530 นาโนเมตร ของสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพมและสารละลายฟลูไนตราซี-แพมจากยาเม็ดโรฮิปนอล ที่ถูกโปรโตเนตด้วยกรดเปอร์คลอริก ตามสภาวะที่ทำการวิจัย (ตารางที่ 20) มีค่าเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของฟลูไนตราซีแพมที่มีในตัวอย่าง นอกจากนี้ ค่าของพื้นที่ใต้กราฟของสเปกตรัมการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์ ที่ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานและสารละลายยาเม็ดโรฮิปนอลเท่ากัน มีค่าของพื้นที่ใต้กราฟที่เท่ากัน (ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05) สามารถสรุปได้ว่าความแตกต่างของค่าความเข้มการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์ที่ความยาวคลื่น 477 นาโนเมตร ระหว่างสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพมและสารลละลายฟลูไนตราซีแพมจากยาเม็ดโรฮิปนอลเป็นผลของ baseline และยังแสดงให้เห็นว่าองค์ประกอบในเม็ดยา ไม่ได้ส่งผลต่อการตรวจพิสูจน์การเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์ของสารฟลูไนตราซีแพมที่ถูกโปรโตเนต ในสภาวะที่ทำการวิจัย

พื้นที่ใต้กราฟของสเปกตรัมการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์ ในช่วงความยาวคลื่น 420–530 นาโนเมตร หลังทำ baseline correction ของสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพม และสารละลายฟลูไนตราซีแพมจากยาเม็ดโรฮิปนอล ในช่วงความเข้มข้นของฟลูไนตราซีแพมที่ทำการทดลองนั้น ไม่ได้ให้ช่วงความเป็นเส้นตรงของกราฟความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ใต้กราฟสเปกตรัมการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์กับความเข้มข้นของฟลูไนตราซีแพม เช่นเดียวกับค่าความเข้มการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์ เมื่อคำนวณขีดจำกัดในการตรวจวัดฟลูไนตราซีแพม

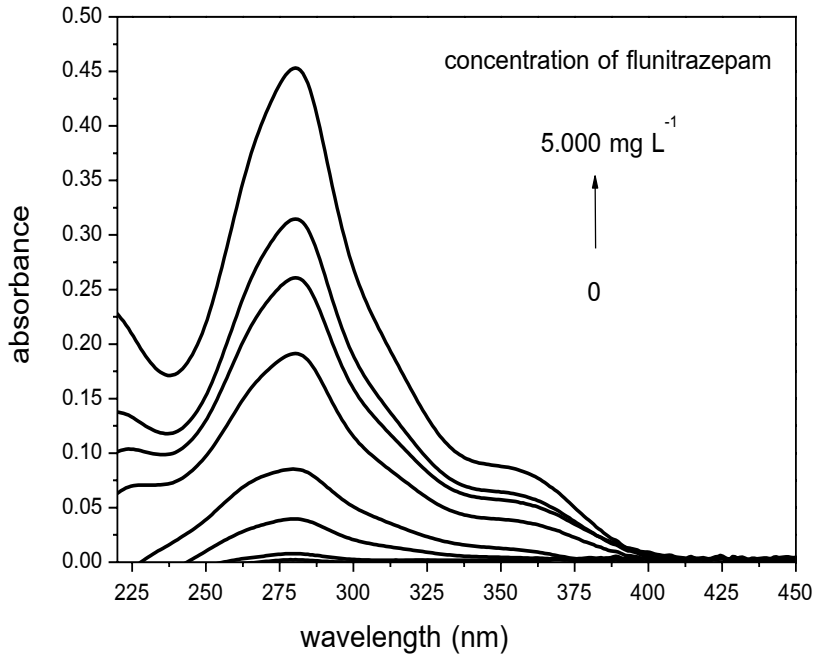
จากค่าความเข้มของการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์ที่ความยาวคลื่น 477 นาโนเมตร พบว่ามีค่าขีดจำกัดการตรวจวัดอยู่ที่ 13.38 เมื่อคำนวณความเข้มข้นต่ำสุดของสารฟลูไนตราซีแพมจากสารละลายมาตรฐานและสารละลายยาเม็ดโรฮิปนอลที่สามารถตรวจวัดได้ จากค่าความเข้มการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์ คือ 0.165 และ 0.166 มิลลิกรัมต่อลิตร และความเข้มข้นต่ำสุดของการวิเคราะห์ในเชิงปริมาณที่สามารถตรวจวัดได้คือ 0.212 และ 0.213 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ

จากการตรวจพิสูจน์ฟลูไนตราซีแพมที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่มีการโปรโตเนตด้วยกรดเปอร์คลอริกความเข้มข้น 2.000 โมลาร์ ในตัวทำละลายเอทานอล โดยใช้เทคนิคการดูดกลืนแสงและการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์ พบว่า สารละลายมาตรฐานและสารละลายยาเม็ดโรฮิปนอล ที่ความเข้มข้นของฟลูไนตราซีแพมเท่ากัน ให้ผลการวิเคราะห์ที่ไม่แตกต่างกัน (ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05) นั่นแสดงว่า วิธีการที่ใช้ในงานวิจัยนี้สามารถตรวจพิสูจน์สารฟลูไนตราซีแพมได้ ทั้งจากสารมาตรฐานหรือตัวอย่างยาเม็ด โดยให้ผลการวิเคราะห์ที่ไม่แตกต่างกัน ซึ่งเป็นผลดีต่อการนำไปประยุกต์ใช้เพื่อการตรวจพิสูจน์สารฟลูไนตราซีแพมในตัวอย่างจริง ซึ่งไม่อาจทราบที่มาและรูปแบบของสารได้ อีกทั้งวิธีการที่ใช้ในการวิเคราะห์นี้ สามารถทำการวิเคราะห์ได้โดยไม่ต้องผ่านกระบวนการอื่นๆ เพื่อที่จะแยกสารฟลูไนตราซีแพมออกจากตัวอย่างก่อนทำการวิเคราะห์ โดยผลการวิเคราะห์ได้แสดงถึงความจำเพาะต่อการตรวจวิเคราะห์สารฟลูไนตราซีแพม ซึ่งผลขององค์ประกอบอื่นๆ ในเม็ดยาไม่ได้ส่งผลที่สำคัญต่อการวิเคราะห์สารฟลูไนตราซีแพมด้วยสภาวะและวิธีการที่ใช้ในงานวิจัย นอกจากนี้ ความไม่แตกต่างของผลการวิเคราะห์ระหว่างสารมาตรฐานและยาเม็ด ยังสามารถประเมินปริมาณหรือความเข้มข้นเบื้องต้นของสารฟลูไนตราซีแพมที่มีในตัวอย่างจริง ก่อนที่จะทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคขั้นสูงต่อไป โดยการเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์จากตัวอย่าง กับผลการวิเคราะห์จากสารมาตรฐานฟลูไนตราซีแพมที่ทราบความเข้มข้นแน่นอนของฟลูไนตราซีแพมที่ทำการวิเคราะห์ โดยวิธีการและสภาวะที่ใช้งานวิจัยนี้ สามารถให้ความถูกต้องของผลการตรวจวิเคราะห์ จากวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร และค่าความเข้มการเปล่งแสงฟลูเรสเซนซ์ที่ความยาวคลื่น 477 นาโนเมตร เมื่อสารละลายตัวอย่างมีความเข้มข้นของฟลูไนตราซีแพมมากกว่า 0.17 มิลลิกรัมต่อลิตร ในเชิงคุณภาพวิเคราะห์ และ 0.300 มิลลิกรัมต่อลิตร ในเชิงปริมาณวิเคราะห์

3.4.5 การตรวจพิสูจน์ฟลูไนตราซีแพมในเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ ประเภทไม่มีสี

จากสภาวะที่เหมาะสมของการตรวจพิสูจน์ฟลูไนตราซีแพมข้างต้น ได้แก่ การโปรโตเนตด้วยกรดเปอร์คลอริกความเข้มข้น 2.000 โมลาร์ ในตัวทำละลายเอทานอล จะได้นำมาใช้ในลำดับต่อไป เพื่อการตรวจพิสูจน์สารฟลูไนตราซีแพมจากยาเม็ดโรฮิปนอล ที่ผสมในเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ประเภทไม่มีสี ได้แก่ Vodka และ Tequila ซึ่งเป็นตัวอย่างเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ชนิดไม่มีสี ที่เป็นที่นิยมและรู้จักกันแพร่หลาย ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์ของแอลกอฮอล์ในช่วง 38 – 40 %. เพื่อให้ใกล้เคียงกับตัวอย่างในสถานการณ์จริง

การตรวจพิสูจน์สารละลายฟลูไนตราซีแพมที่มี Vodka ปริมาตร 1.00 มิลลิลิตร โดยการโปรโตเนตด้วยกรดเปอร์คลอริกความเข้มข้น 2.000 โมลาร์ ในตัวทำละลายเอทานอล (รูปที่ 41) พบว่า สารละลายตัวอย่างเกิดการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 280 นาโน-เมตร และมีค่าการดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของฟลูไนตราซีแพมในตัวอย่าง



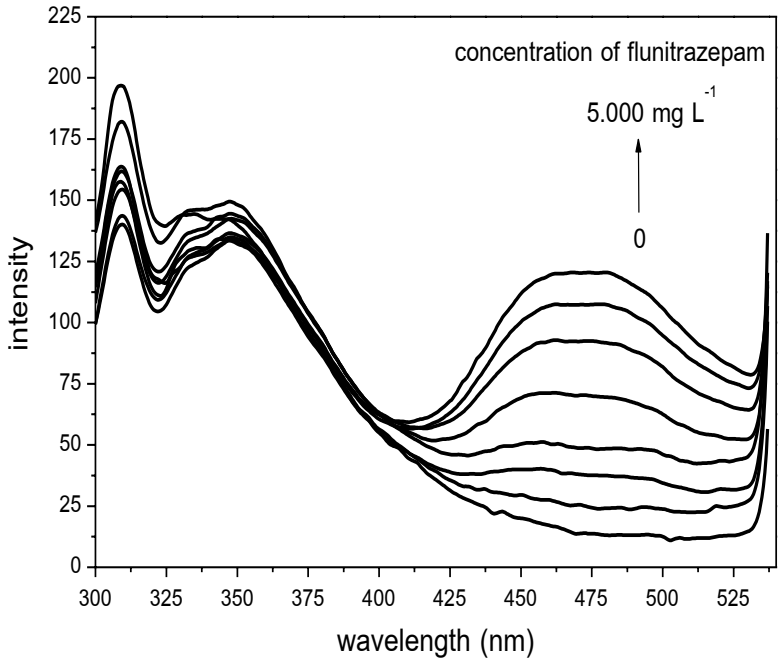
รูปที่ 41 แสดงสเปกตราการดูดกลืนแสงของสารละลายฟลูไนตราซีแพมที่มี Vodka 1.00 มิลลิลิตร ที่ถูกโปรโตเนตด้วยกรดเปอร์คลอริกความเข้มข้น 2.000 โมลาร์ ในตัวทำละลายเอทานอล

ตารางที่ 21 แสดงค่าการดูดกลืนแสงและพื้นที่ใต้กราฟของสเปกตรัมการดูดกลืนแสงช่วงความยาวคลื่น 250 – 300 นาโนเมตร ของสารละลายฟลูไนตราซีแพมที่มี Vodka 1.00 มิลลิลิตร หลังโปรโตเนตด้วยกรดเปอร์คลอริกความเข้มข้น 2.000 โมลาร์ ในตัวทำละลายเอทานอล

ความเข้มข้นของฟลูไนตราซีแพม (mg L^{-1})	ค่าการดูดกลืนแสง	พื้นที่ใต้กราฟของสเปกตรัมการดูดกลืนแสง
0	0.002 ± 0.010	0.168 ± 0.006
0.100	0.008 ± 0.002	0.253 ± 0.044
0.500	0.039 ± 0.001	0.711 ± 0.009
1.000	0.085 ± 0.005	1.227 ± 0.018
2.000	0.189 ± 0.002	2.450 ± 0.127
3.000	0.257 ± 0.026	3.338 ± 0.016
4.000	0.310 ± 0.043	4.133 ± 0.624
5.000	0.447 ± 0.015	6.007 ± 0.178

พื้นที่ใต้กราฟของสเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารละลายฟลูไนตราซีแพม ในเครื่องดื่ม Vodka ที่ถูกโปรโตเนตด้วยกรดเปอร์คลอริกความเข้มข้น 2.000 โมลาร์ ในช่วงความยาวคลื่น 250 – 300 นาโนเมตร พบว่า มีพื้นที่ใต้กราฟของการดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของฟลูไนตราซีแพมในสารละลายตัวอย่างเช่นเดียวกับค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายตัวอย่าง (ตารางที่ 21)

สำหรับการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์ของสารละลายฟลูไนตราซีแพมในเครื่องดื่ม Vodka 1.00 มิลลิลิตร หลังการโปรโตเนตด้วยกรดเปอร์คลอริกความเข้มข้น 2.000 โมลาร์ ในตัวทำละลายเอทานอล มีค่าความเข้มการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์ที่ความยาวคลื่น 477 นาโนเมตร เพิ่มขึ้นอย่างเป็นลำดับตามความเข้มข้นของฟลูไนตราซีแพมในสารละลายตัวอย่าง ดังแสดงในรูปที่ 42



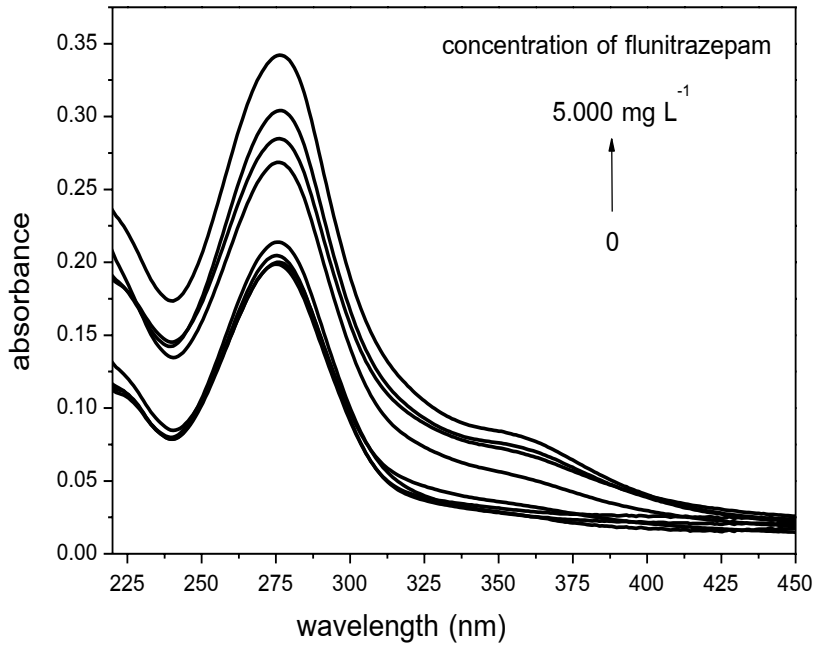
รูปที่ 42 แสดงสเปกตราการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์ของสารละลายฟลูไนตราซีแพม ที่มี Vodka 1.00 มิลลิลิตร เมื่อโปรโตเนตด้วยกรดเปอร์คลอริกความเข้มข้น 2.000 โมลาร์ ในตัวทำละลายเอทานอล (ความยาวคลื่นกระตุ้น 280 นาโนเมตร)

ตารางที่ 22 แสดงค่าความเข้มและพื้นที่ใต้กราฟของสเปกตรัมการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์ ช่วงความยาวคลื่น 420 – 530 นาโนเมตร ของสารละลายฟลูไนตราซีแพมที่มี Vodka 1.000 มิลลิลิตร หลังโปรโตเนตด้วยกรดเปอร์คลอริกเข้มข้น 2.000 โมลาร์ ในตัวทำละลายเอทานอล ที่ความยาวคลื่น 477 นาโนเมตร เมื่อกระตุ้นที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร

ความเข้มข้นของฟลูไนตราซีแพม (mg L^{-1})	ค่าการดูดกลืนแสง	พื้นที่ใต้กราฟของสเปกตรัมการเปล่งแสง
0	13.56 ± 0.74	-
0.100	23.90 ± 2.84	-
0.500	37.54 ± 1.64	895 ± 41
1.000	48.27 ± 0.03	940 ± 5
2.000	69.78 ± 0.73	2032 ± 97
3.000	92.20 ± 5.61	3069 ± 283
4.000	107.5 ± 1.59	3632 ± 62
5.000	120.3 ± 4.79	4223 ± 184

ในสถานการณ์จริงการตรวจพิสูจน์สารฟลูไนตราซีแพม ในเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ อาจไม่แน่ชัดว่า ตัวอย่างเครื่องดื่มที่ทำการวิเคราะห์เป็นชนิดหรือชื่อทางการค้าใด สามารถระบุเบื้องต้นได้เพียง เป็นเครื่องดื่มประเภทที่มีสีหรือไม่มีสีเท่านั้น ดังนั้น การหาพื้นที่ใต้กราฟของสเปกตรัมการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์ และทำ baseline correction โดยลบพื้นที่ใต้กราฟสเปกตรัมการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์ของกรดเปอร์คลอริกความเข้มข้น 2.000 โมลาร์ ในช่วงความยาวคลื่น 420 – 530 นาโนเมตร จะได้พื้นที่ใต้กราฟของสเปกตรัมการเปล่งแสงฟลูออ-เรสเซนซ์เปรียบเทียบระหว่างสารละลายตัวอย่างที่มีสารฟลูไนตราซีแพมและสารละลายตัวอย่างที่ไม่มีสารฟลูไนตราซีแพมได้

สำหรับการตรวจพิสูจน์ฟลูไนตราซีแพมในเครื่องดื่ม Tequila หลังโปรโตเนตด้วยกรดเปอร์คลอริกความเข้มข้น 2.000 โมลาร์ พบว่า เกิดการดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่น 250 – 330 นาโนเมตร โดยมีการดูดกลืนแสงสูงสุดขึ้นที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร และเพิ่มขึ้นเป็นลำดับตามความเข้มข้นของฟลูไนตราซีแพมในสารละลายตัวอย่าง เมื่อตัวอย่างมีสารฟลูไนตราซีแพมความเข้มข้นมากกว่า 1.000 มิลลิกรัมต่อลิตร (รูปที่ 43)



รูปที่ 43 แสดงสเปกตราการดูดกลืนแสงของสารละลายฟลูไนตราซีแพมที่มี Tequila 1.00 มิลลิลิตร หลังโปรโตเนตด้วยกรดเปอร์คลอริกความเข้มข้น 2.000 โมลาร์ ในตัวทำละลายเอทานอล

พื้นที่ใต้กราฟของสเปกตรัมการดูดกลืนแสงของเครื่องดื่ม Tequila ที่มีฟลูไน-ตราซีแพม หลังโปรโตเนตด้วยกรดเปอร์คลอริกความเข้มข้น 2.000 โมลาร์ ในช่วงความยาวคลื่น 250-300 นาโนเมตร พบว่า พื้นที่ใต้กราฟมีค่าเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของสารละลายฟลูไนตราซีแพม และมีความแตกต่างจากพื้นที่ใต้กราฟของสเปกตรัมการดูดกลืนแสงของเครื่องดื่ม Tequila เมื่อความเข้มข้นของฟลูไนตราซีแพมมากกว่า 1.000 มิลลิกรัมต่อลิตร สอดคล้องกับค่าการดูดกลืนแสงที่ตรวจวัดได้ (ตารางที่ 23)

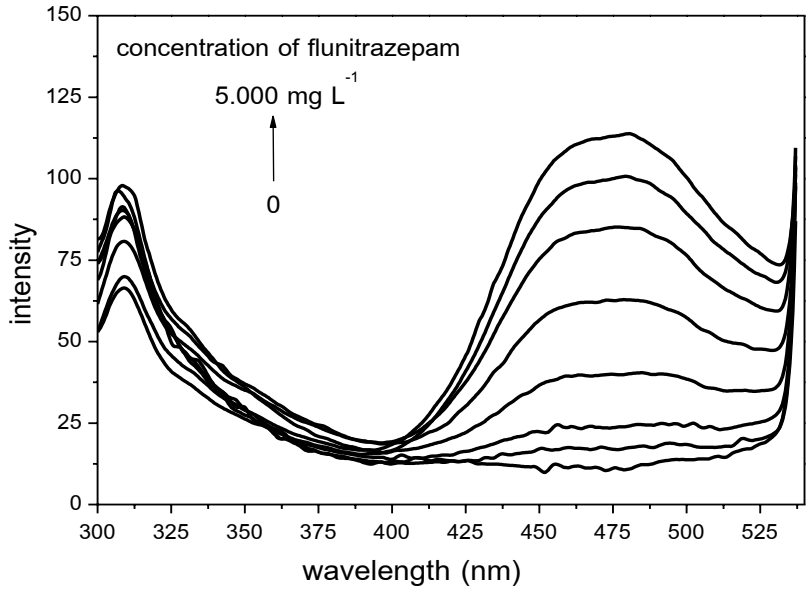
ตารางที่ 23 แสดงค่าการดูดกลืนแสงและพื้นที่ใต้กราฟของสเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารละลายฟลูไนตราซีแพม ใน Tequila 1.000 มิลลิลิตร หลังโปรโตเนตด้วยกรดเปอร์คลอริกความเข้มข้น 2.000 โมลาร์

ความเข้นข้นของฟลูไนตราซีแพม ($mg\ L^{-1}$)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร	พื้นที่ใต้กราฟของสเปกตรัมการดูดกลืนแสง ช่วงความยาวคลื่น 250 – 300 นาโนเมตร
0	0.198 ± 0.006	2.983 ± 0.007
0.100	0.204 ± 0.016	3.119 ± 0.013
0.500	0.213 ± 0.011	3.263 ± 0.071
1.000	0.200 ± 0.002	2.882 ± 0.029
2.000	0.268 ± 0.035	3.479 ± 0.449
3.000	0.285 ± 0.019	3.544 ± 0.052
4.000	0.304 ± 0.007	3.936 ± 0.057
5.000	0.342 ± 0.020	4.295 ± 0.064

จากการวิเคราะห์การดูดกลืนแสงของฟลูไนตราซีแพมหลังการโปรโตเนตด้วยกรดเปอร์คลอริกความเข้มข้น 2.000 โมลาร์ ในเครื่องดื่มประเภทที่ไม่มีสี จะเห็นได้ว่าผลของเครื่องดื่มส่งผลต่อการตรวจวิเคราะห์สารในช่วงความเข้มข้นหนึ่งๆ เช่นในเครื่องดื่ม Tequila จะสามารถตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารฟลูไนตราซีแพมที่มีในตัวอย่างหลังการโปรโตเนตได้เมื่อมีความเข้มข้นของฟลูไนตราซีแพมมากกว่า 1.000 มิลลิกรัมต่อลิตร ทั้งนี้เพราะเครื่องดื่มนั้นมีการดูดกลืนแสงขึ้นที่ความยาวคลื่นเดียวกับฟลูไนตราซีแพมที่ถูกโปรโตเนต ดังจะเห็นได้จากสเปกตรัมการดูดกลืนแสงของ Tequila ที่มีการเติมกรดเปอร์คลอริกความเข้มข้น 2.000 โมลาร์ โดยที่ไม่มีสารฟลูไนตราซีแพม มีการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร ซึ่งจากการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นดังกล่าวของ Tequila 1.00 มิลลิลิตร จะส่งผลต่อการ

วิเคราะห์ฟลูไนตราซีแพมที่มีความเข้มข้นต่ำกว่า 1.000 มิลลิกรัมต่อลิตรเท่านั้น โดยค่าการดูดกลืนแสงของ Tequila เท่ากับ 0.198 (±0.006) ซึ่งใกล้เคียงเป็นอย่างมากกับค่าการดูดกลืนแสงของฟลูไนตราซีแพมที่ถูกโปรโตเนตใน Tequila ซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.200 (±0.002) ในขณะที่เครื่องดื่ม Vodka กลับไม่ส่งผลต่อการวิเคราะห์ค่าการดูดกลืนแสงของสารฟลูไนตราซีแพมในเครื่องดื่มหลังการโปรโตเนตด้วยกรด ดังนั้น ในการนำไปประยุกต์ใช้ในงานจริง การวิเคราะห์ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายตัวอย่าง จำเป็นต้องคำนึงถึงสมบัติเชิงแสงของเครื่องดื่มที่ทำการวิเคราะห์ด้วยเช่นกัน และสำหรับกรณีที่เครื่องดื่มมีการทดสอบแล้วว่าให้ค่าการดูดกลืนแสงคงที่ หรือในกรณีที่ไม่ทราบชนิดของเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ สามารถทำการวิเคราะห์ได้ด้วยวิธี standard addition ก่อนทำการวิเคราะห์ตามวิธีที่ใช้ในงานวิจัย ซึ่งเทคนิค standard addition เป็นการวิเคราะห์สารโดยมีการเติมสารมาตรฐานชนิดเดียวกับที่ต้องการวิเคราะห์ ลงในตัวอย่างในปริมาณที่ทราบแน่นอน แล้วคำนวณปริมาณของสารที่ต้องการวิเคราะห์จากความเข้มของสัญญาณที่มีความสัมพันธ์กับปริมาณของสารมาตรฐานที่เติมลงไป (ธีรศักดิ์ โรจนธารา, 2551) เป็นเทคนิคที่เหมาะสมกับตัวอย่างที่มีส่วนประกอบซับซ้อน ไม่ทราบชนิด หรือปริมาณของส่วนประกอบแต่ละชนิดที่แน่นอน หรือกรณีที่ส่วนประกอบอื่นๆ ส่งผลรบกวนการวัดสัญญาณสารที่ต้องการวิเคราะห์

เมื่อทำการวิเคราะห์การเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์ของสารฟลูไนตราซีแพม ในเครื่องดื่ม Tequila หลังโปรโตเนตด้วยกรดเปอร์คลอริกความเข้มข้น 2.000 โมลาร์ โดยใช้ความยาวคลื่นกระตุ้นที่ 280 นาโนเมตร พบว่า การเปล่งแสงฟลูออเรสเซนต์ของสารตัวอย่างยังเกิดขึ้นในช่วงความยาวคลื่น 400 – 530 นาโนเมตร โดยความยาวคลื่นที่ให้ค่าความเข้มการเปล่งแสงสูงสุดอยู่ที่ความยาวคลื่น 477 (±3) นาโนเมตร (รูปที่ 44) ซึ่งค่าความเข้มของการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์มีค่าเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของฟลูไนตราซีแพม แสดงผลของส่วนประกอบใน Tequila ให้การดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่นเดียวกันก็จริง แต่ไม่ได้ส่งผลกระทบก่อนการตรวจพิสูจน์การเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์ของฟลูไนตราซีแพมที่ถูกโปรโตเนต ซึ่งเป็นผลดีต่อการแยกแยะสารในเบื้องต้นได้ทันที ว่าในตัวอย่างเครื่องดื่มมี หรือไม่มีสารฟลูไนตราซีแพม และยังสามารถระบุความเข้มข้นของฟลูไนตราซีแพมที่ช่วงความเข้มข้นต่ำกว่า 1.000 มิลลิกรัมต่อลิตรได้ จากการวิเคราะห์ค่าความเข้มของการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์ได้ มีความสอดคล้องกับพื้นที่ใต้กราฟของสเปกตรัมการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์ ในช่วงความยาวคลื่น 420 – 530 นาโนเมตร (ตารางที่ 24) ค่าการเปล่งแสงและพื้นที่ใต้กราฟสเปกตรัมการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์ มีค่าแตกต่างเพียงเล็กน้อยกับผลการวิเคราะห์ในเครื่องดื่ม Vodka แสดงว่าส่วนประกอบในเครื่องดื่ม ไม่ได้ส่งผลกระทบต่อการวิเคราะห์การเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์ของสารฟลูไนตราซีแพมที่ถูกโปรโตเนต ในสภาวะที่ทำการวิจัย



รูปที่ 44 แสดงสเปกตราการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์ของสารละลายฟลูไนตราซีแพม ที่มี Tequila 1.00 มิลลิลิตร เมื่อโปรโตเนตด้วยกรดเปอร์คลอริกความเข้มข้น 2.000 โมลาร์ ในตัวทำละลายเอทานอล (ความยาวคลื่นกระตุ้น 280 นาโนเมตร)

ตารางที่ 24 แสดงค่าความเข้มการเปล่งแสงและพื้นที่ใต้กราฟสเปกตรัมการเปล่งแสงฟลูออเรส-เซนซ์ของสารละลายฟลูไนตราซีแพมที่มี Tequila 1.000 มิลลิลิตร หลังโปรโตเนตด้วยกรดเปอร์คลอริกความเข้มข้น 2.000 โมลาร์ ในตัวทำละลายเอทานอล เมื่อกระตุ้นด้วยความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร หลังการทำ baseline correction

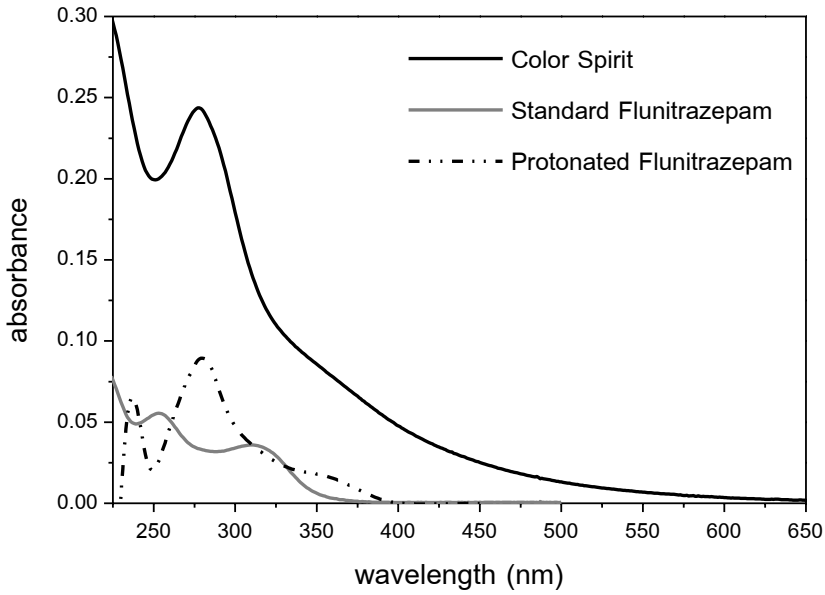
ความเข้นข้นของฟลูไนตราซีแพม (mg L^{-1})	ค่าความเข้มการเปล่งแสงที่ความยาวคลื่น 477 นาโนเมตร	พื้นที่ใต้กราฟสเปกตรัมการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์ ช่วงความยาวคลื่น 420 – 530 นาโนเมตร
0	11.00 ± 0.18	-
0.100	16.86 ± 2.83	413.0 ± 97.5
0.500	23.83 ± 1.69	636.4 ± 60.0
1.000	40.87 ± 0.31	1175 ± 22.0
2.000	62.70 ± 0.71	2255 ± 107
3.000	85.15 ± 5.59	3153 ± 278
4.000	100.4 ± 1.57	3850 ± 60.8
5.000	113.2 ± 4.79	4440 ± 182

จากการทดลองข้างต้นทั้งหมด ได้แสดงให้เห็นว่าเทคนิคทางโฟโตเคมี ภายใต้สภาวะที่ทำการวิจัย สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจพิสูจน์สารฟลูไนตราซีแพมเบื้องต้นได้ โดยการวิเคราะห์จากค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง หลังโปรโตเนตด้วยกรดเปอร์คลอริก ความเข้มข้น 2.000 โมลาร์ และหาพื้นที่ใต้กราฟของสเปกตรัมการดูดกลืนแสง ในช่วงความยาวคลื่น 250 – 300 นาโนเมตร หักลบด้วยพื้นที่ใต้กราฟของสเปกตรัมการดูดกลืนแสงของกรดเปอร์คลอริก และยืนยันผลการทดลองโดยใช้เทคนิคลูมิเนสเซนซ์สเปกโทรสโกปี วิเคราะห์ค่าความเข้มการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์ของสารตัวอย่างที่ความยาวคลื่น 477 นาโนเมตร ที่ความยาวคลื่นกระตุ้น 280 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับค่าความเข้มการเปล่งแสงฟลูออเรส-เซนซ์ของสารละลายตัวอย่างกับสารละลายกรด และวิเคราะห์พื้นที่ใต้กราฟสเปกตรัมการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์ในช่วงความยาวคลื่น 420 – 530 นาโนเมตร ซึ่งความสามารถในการวิเคราะห์ฟลูไนตราซีแพมในตัวอย่างเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ประเภทไม่มีสีนั้น ขึ้นอยู่กับชนิดของเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ แต่จากการวิเคราะห์การเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์เบื้องต้นของสารฟลูไน-ตราซีแพมที่มีในเครื่องดื่ม Vodka และ Tequila พบว่าให้ผลการวิเคราห์ที่ใกล้เคียงกันมาก

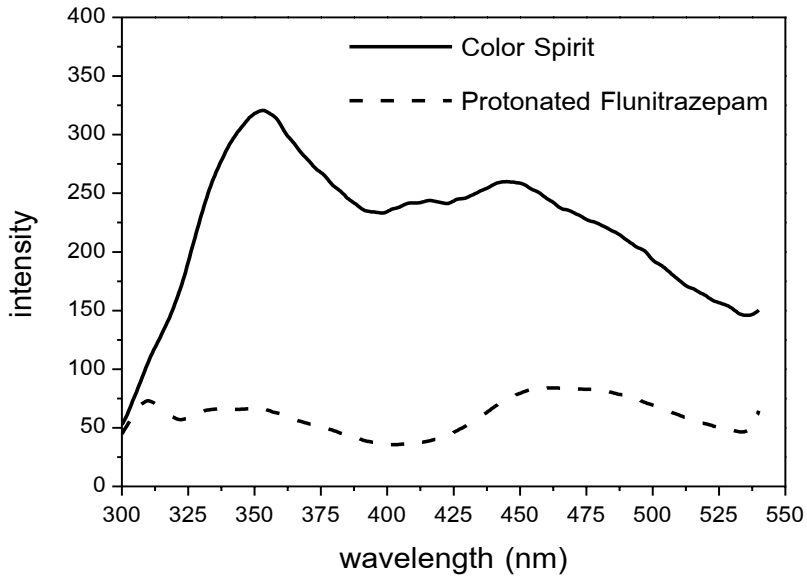
ดังนั้น เทคนิคการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์ สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจพิสูจน์สารฟลูไนตราซีแพมเบื้องต้นในเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ประเภทไม่มีสีได้ และผลจากการวิเคราะห์ในเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ประเภทไม่มีสีใกล้เคียงกับผลที่ได้จากการวิเคราะห์ในตัวทำละลายเอทานอล 99.8% เพราะในการตรวจพิสูจน์ สารละลายตัวอย่างจะถูกปรับปริมาตรด้วยตัวทำละลายเอทานอล คิดเป็นสัดส่วนของตัวอย่างต่อตัวทำละลายเอทานอล คือ 1 : 9 และแม้เครื่องดื่มแอลกอฮอล์ที่ทำการวิเคราะห์ จะมีความแตกต่างของเปอร์เซ็นต์แอลกอฮอล์ก็ยังสามารถที่จะทำการตรวจวิเคราะห์หาฟลูไนตราซีแพมได้ แสดงว่าเปอร์เซ็นต์ของเอทานอลในเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ ไม่ได้ส่งผลกระทบต่อการตรวจพิสูจน์ฟลูไนตราซีแพมด้วยวิธีการที่ใช้ในงานวิจัยนี้ สำหรับสิ่งที่จะทำให้เกิดความแตกต่างของผลการวิเคราะห์ขึ้นนั้น น่าจะเป็นผลจากองค์ประกอบอื่นๆ ที่มีการแต่งเติมเพื่อเพิ่มรสชาด หรือกลิ่น ที่มีความแตกต่างกันของเครื่องดื่มแอลกอฮอล์แต่ละชนิดมากกว่าผลจากปริมาณแอลกอฮอล์

3.4 การตรวจพิสูจน์ฟลูไนตราซีแพมในเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ประเภทมีสี

เนื่องจากเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ประเภทมีสีทุกชนิดที่ใช้ในการวิจัย เกิดการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่นประมาณ 278 นาโนเมตร ซึ่งใกล้เคียงกับความยาวคลื่นที่เกิดการดูดกลืนแสงสูงสุดของสารละลายฟลูไนตราซีแพมที่ถูกโปรโตเนต คือ 280 นาโนเมตร (รูปที่ 45) นอกจากนี้ยังพบว่า เครื่องดื่มแอลกอฮอล์ประเภทที่มีสี ให้ค่าความเข้มการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์ในช่วงความยาวคลื่น 420 – 530 นาโนเมตร บดบังค่าความเข้มการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์ของฟลูไนตราซีแพมที่ถูกโปรโตเนตอีกด้วย ทำให้ไม่สามารถตรวจพิสูจน์ฟลูไนตราซีแพมในเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ประเภทมีสีด้วยวิธีการโปรโตเนชันเช่นเดียวกับในเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ประเภทไม่มีสีได้

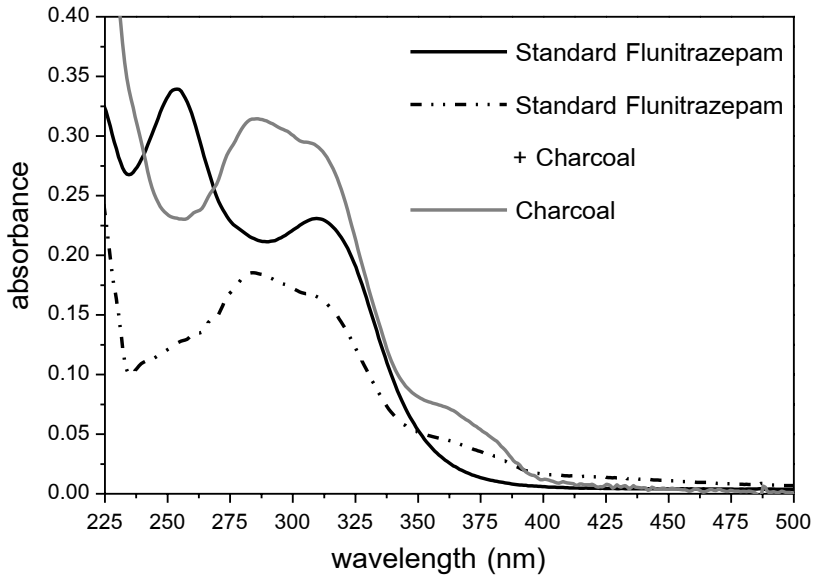


รูปที่ 45 แสดงสเปกตราการดูดกลืนแสงของเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ประเภทมีสี 1.00 มิลลิลิตร สารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพมความเข้มข้น 1.00 มิลลิกรัมต่อลิตร และสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพมความเข้มข้น 1.000 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ถูกโปรโตเนตด้วยกรดเปอร์คลอริกความเข้มข้น 2.000 โมลาร์ ในตัวทำละลายเอทานอล



รูปที่ 46 แสดงสเปกตราการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์ของเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ประเภทมีสี 1.00 มิลลิลิตร และสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพมความเข้มข้น 1.000 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่โปรโตเนตด้วยกรดเปอร์คลอริกเข้มข้น 2.000 โมลาร์ ในตัวทำละลายเอทานอล

การดูดกลืนแสงขององค์ประกอบที่ทำให้เกิดสีในเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ สามารถบดบังแถบการดูดกลืนแสง และแถบการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์ของสารฟลูไนตราซีแพมที่ต้องการศึกษา ผู้วิจัยจึงได้ทำการแก้ปัญหาดังกล่าวโดยการใช้ผงคาร์บอน (activated charcoal) ซึ่งมีคุณสมบัติในการดูดซับ เพื่อนำมาใช้ในการกำจัดหรือดูดซับสีของเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ในเบื้องต้น แต่พบว่า ผงคาร์บอนมีการดูดซับทั้งสีของเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ และสารฟลูไนตรา-ซีแพมบางส่วนในสารละลายตัวอย่างด้วย (รูปที่ 47) ทำให้ปริมาณของฟลูไนตราซีแพมในสารละลายตัวอย่างลดลง เป็นผลให้ความสามารถในการตรวจวิเคราะห์สารฟลูไนตราซีแพมที่มีในสารละลายตัวอย่างลดลงและเกิดความผิดพลาดของการทดลองขึ้นได้ ดังนั้น แนวความคิดในการดูดซับสีของเครื่องดื่มแอลกอฮอล์โดยการใช้ผงคาร์บอน จึงไม่เหมาะต่อการนำมาใช้เพื่อการตรวจพิสูจน์สารฟลูไนตราซีแพม



รูปที่ 47 แสดงสเปกตราการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพม ความเข้มข้น 1.000 มิลลิกรัมต่อลิตร ผงคาร์บอน 0.0100 กรัมต่อมิลลิลิตร และสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพมที่เติมผงคาร์บอน ในตัวทำละลายเอทานอล

จากเอกสารอ้างอิง พบว่า การรายงานไว้ในงานวิจัยของ Yuranova และคณะ (2007) ถึงความสามารถของปฏิกิริยาโฟโตคะตะไลซิสต่อการสลายสีของคราบไวน์แดง และคราบกาแฟบนผ้า ที่ได้มีการเคลือบผ้าไว้ด้วยไทเทเนียมไดออกไซด์ ทำให้เกิดแนวคิดเกี่ยวกับการประยุกต์ใช้ปฏิกิริยาโฟโตคะตะไลซิสนี้ในการสลายสีของเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ นอกจากนี้ในงานวิจัยของ Givens และคณะ (1986) ได้แสดงถึงการเปลี่ยนแปลงของสารฟลูไนตราซีแพมไปเป็นอนุพันธ์ของฟลูไนตราซีแพม นั่นคือ อะมิโนฟลูไนตราซีแพม (7-aminoflunitrazepam) หลังจากทำการฉายแสงอัลตราไวโอเลต ที่ความยาวคลื่น 300 นาโนเมตร โดยไม่ได้มีการใช้ตัวเร่งปฏิกิริยา (catalyst) จากผลของปฏิกิริยาโฟโตคะตะไลซิส ทั้งการสลายคราบและการทำให้เกิดเป็นอนุพันธ์ของฟลูไนตราซีแพม จึงเป็นที่มาของแนวความคิดในการตรวจพิสูจน์สารฟลูไนตราซีแพมในเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ประเภทที่มีสีด้วยปฏิกิริยาโฟโตคะตะไลซิส ซึ่งเป็นวิธีการที่ง่ายและไม่ซับซ้อน เหมาะต่อการนำมาใช้เพื่อการตรวจพิสูจน์สารเบื้องต้นและผลจากการทำปฏิกิริยาโฟโตคะตะไลซิส พบว่า ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงความยาวคลื่นของการดูดกลืนแสงของสารฟลูไนตราซีแพมหลังการฉายแสงอัลตราไวโอเลต อันเป็นประโยชน์ต่อการตรวจพิสูจน์สารฟลูไนตราซีแพม

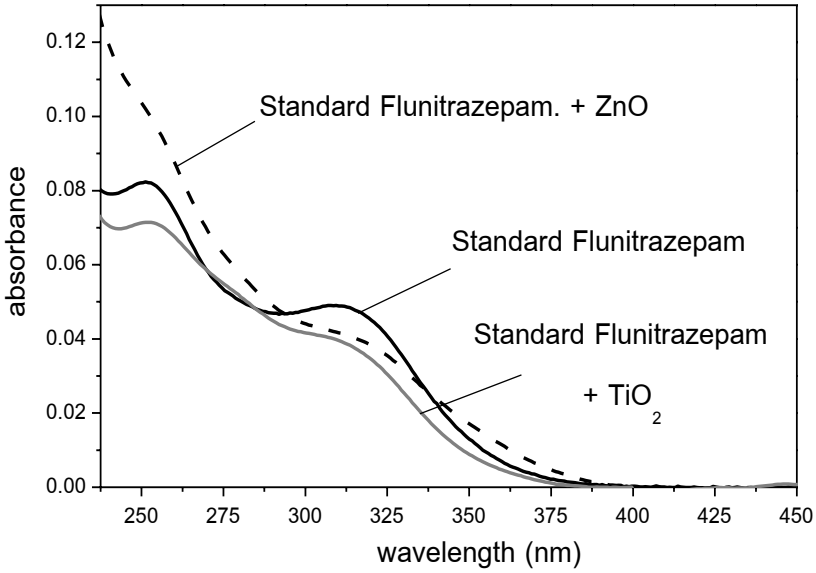
การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการตรวจพิสูจน์ฟลูไนตราซีแพมในเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ ประเภทไม่มีสี ได้แบ่งออกเป็นหัวข้อของการศึกษาดังต่อไปนี้

(1) ศึกษาชนิดของโลหะออกไซด์ที่เหมาะต่อการตรวจพิสูจน์ฟลูไนตราซีแพม
(2) ศึกษาผลของการฉายแสงต่อการตรวจพิสูจน์ฟลูไนตราซีแพม
(3) ศึกษาปริมาณของโลหะออกไซด์ อุณหภูมิขณะฉายแสงอัลตราไวโอเลต และเวลาที่เหมาะสมของการฉายแสงอัลตราไวโอเลต เพื่อการตรวจพิสูจน์ฟลูไนตราซีแพม
(4) การตรวจพิสูจน์ฟลูไนตราซีแพม ที่ถูกโปรโตเนตด้วยเทคนิคแมสสเปก-โทรเมทรี
(5) ศึกษาความเข้มข้นต่ำสุดของฟลูไนตราซีแพม ที่สามารถตรวจพิสูจน์ได้
(6) การตรวจพิสูจน์ฟลูไนตราซีแพมในเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ประเภทมีสี

3.5.1 ศึกษาชนิดของโลหะออกไซด์ที่เหมาะต่อการตรวจพิสูจน์ฟลูไนตราซีแพม

การเลือกชนิดของโลหะออกไซด์เพื่อเป็นตัวเร่งในปฏิกิริยาโฟโตคะตะไลซิส เป็นปัจจัยหนึ่งที่สำคัญต่อประสิทธิภาพของปฏิกิริยาโฟโตคะตะไลซิส เพราะตัวเร่งปฏิกิริยาเชิงแสงชนิดที่เป็นโลหะออกไซด์นั้น จะมีช่วงของค่าพลังงานที่ใช้ในการกระตุ้นที่แตกต่างกันในแต่ละชนิด การเลือกใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาเชิงแสง จำเป็นต้องเลือกตัวเร่งปฏิกิริยาเชิงแสงที่มีช่วงพลังงานในการกระตุ้น อยู่ในช่วงเดียวกับพลังงานที่ได้รับจากแหล่งกำเนิดพลังงานที่ใช้ในการวิเคราะห์

ในงานวิจัยนี้ แหล่งกำเนิดพลังงานที่ใช้ คือ หลอดอัลตราไวโอเลต ชนิด black light ที่ให้แสงที่ความยาวคลื่น 360 นาโนเมตร ซึ่งเป็นความยาวคลื่นไกลในช่วงแสงอัลตราไวโอเลตที่เรียกว่า long wave หรือ black light ซึ่งมีช่วงความยาวคลื่นตั้งแต่ 320 จนถึง 400 นาโนเมตร และให้ค่าพลังงาน band gap ในอยู่ช่วง 3.10 - 3.94 eV จากข้อมูลดังกล่าวข้างต้น พบว่า โลหะออกไซด์ที่สามารถใช้ช่วงพลังงานดังกล่าวในการกระตุ้นเพื่อให้เกิดปฏิกิริยาโฟโตคะตะไลซิส ได้แก่ ซิงค์ออกไซด์ (ZnO) และไทเทเนียมไดออกไซด์ (TiO_2) ซึ่งมีค่าพลังงาน band gap ประมาณ 3.2 eV (*Rehman et al*., 2009)



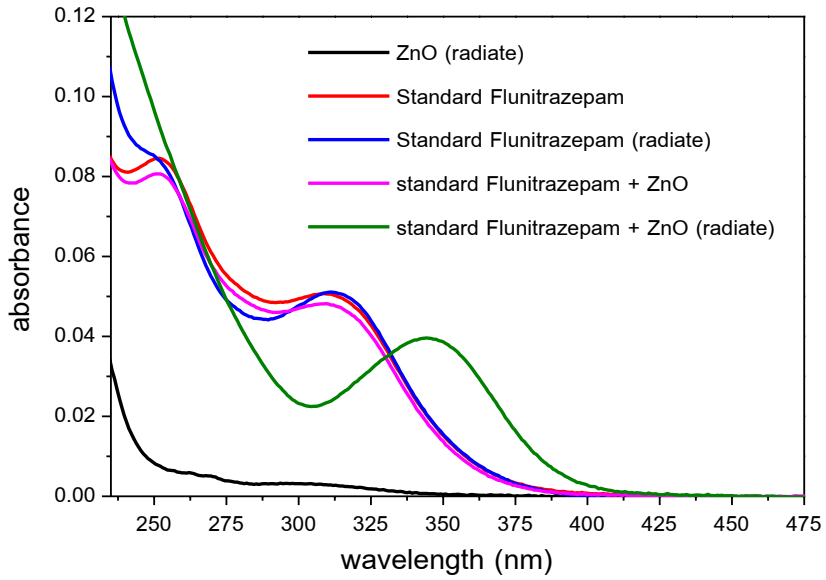
รูปที่ 48 แสดงสเปกตราการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพม ความเข้มข้น 1.500 มิลลิกรัมต่อลิตร สารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพมที่มีซิงค์ออกไซด์ 0.0080 กรัมต่อมิลลิลิตร และสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพมที่มีไทเทเนียมไดออกไซด์ 0.0080 กรัมต่อมิลลิลิตร ในโซดาปริมาตร 10.00 มิลลิลิตร หลังฉายแสงอัลตราไวโอเลต ที่อุณหภูมิ 45.0 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

จากสเปกตราการดูดกลืนแสง (รูปที่ 48) แสดงให้เห็นว่า หลังการฉายแสงอัลตราไวโอเลตแก่สารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพม ที่ได้มีการเติมโลหะออกไซด์ นั่นคือ ซิงค์ออกไซด์หรือไทเทเนียมไดออกไซด์ พบว่า ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 253 และ 309 นาโนเมตร มีค่าลดลง และเกิดแถบการดูดกลืนแสงใหม่ที่ความยาวคลื่น 345 นาโนเมตร โดยสารละลายตัวอย่างที่เติมซิงค์ออกไซด์ จึงมีความเป็นไปได้ ที่จะเกิดสารใหม่ขึ้นหลังผ่านปฏิกิริยาโฟโตคะตะไลซิส

ผลการเปลี่ยนแปลงความยาวคลื่นที่เกิดการดูดกลืนแสงสูงสุดของสารฟลูไน-ตราซีแพมหลังผ่านปฏิกิริยาโฟโตคะตะไลซิส ในสารละลายตัวอย่างที่มีการเติมซิงค์ออกไซด์ ให้ผลการเปลี่ยนแปลงของความยาวคลื่นที่เกิดการดูดกลืนแสงชัดเจนกว่าสารละลายตัวอย่างที่มีการเติมไทเทเนียมออกไซด์ ดังนั้น โลหะออกไซด์ที่มีความเหมาะสมสำหรับการนำมาใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาเชิงแสง ในการตรวจพิสูจน์ฟลูไนตราซีแพมด้วยปฏิกิริยาโฟโตคะตะไลซิสตามสภาวะที่ทำการวิจัย คือ ซิงค์ออกไซด์

3.5.2 ศึกษาผลของการฉายแสงต่อการตรวจพิสูจน์ฟลูไนตราซีแพม

เพื่อศึกษาความสัมพันธ์และความสำคัญของการฉายแสงอัลตราไวโอเลต และการใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาเชิงแสง (ซิงค์ออกไซด์) ต่อการตรวจพิสูจน์ฟลูไนตราซีแพมด้วยปฏิกิริยาโฟโตคะตะไลซิส โดยเปรียบเทียบสเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพมที่มีการเติมซิงค์ออกไซด์ และสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพมที่ไม่มีการเติมซิงค์ออกไซด์ หลังผ่านการฉายแสงอัลตราไวโอเลตเป็นระยะเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิขณะฉายแสง 80.0 องศาเซลเซียส และสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพมที่มีการเติมซิงค์ออกไซด์ โดยให้ความร้อน 80.0 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 30 นาที แต่ไม่ฉายแสงอัลตราไวโอเลต



รูปที่ 49 แสดงสเปกตราการดูดกลืนแสงของซิงค์ออกไซด์ 0.0080 กรัมต่อมิลลิลิตร ที่ฉายแสงอัลตราไวโอเลต สารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพมความเข้มข้น 1.500 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ฉายแสงอัลตราไวโอเลตและที่ไม่ฉายแสงอัลตราไวโอเลต และสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพมความเข้มข้น 1.500 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่มีซิงค์ออกไซด์ 0.0080 กรัมต่อมิลลิลิตร ในโซดา 10.00 มิลลิลิตร ที่มีการฉายแสงอัลตราไวโอเลตและไม่ฉายแสงอัลตราไวโอเลต โดยใช้อุณหภูมิขณะฉายแสง 80.0 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

สเปกตรัมการดูดกลืนแสงระหว่างสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพม ที่มีการเติมซิงค์ออกไซด์และที่ไม่มีการเติมซิงค์ออกไซด์ หลังฉายแสงอัลตราไวโอเลตนาน 30 นาที ที่อุณหภูมิขณะฉายแสง 80.0 องศาเซลเซียส และสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพมที่มีการเติมซิงค์ออกไซด์ โดยมีการให้ความร้อน 80.0 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที แต่ไม่ฉายแสงอัลตราไวโอเลต (รูปที่ 49) พบว่าสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพมที่มีการฉายแสงอัลตรา-ไวโอเลต แต่ไม่มีซิงค์ออกไซด์ และสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพมที่มีซิงค์ออกไซด์ แต่ไม่ได้ฉายแสงอัลตราไวโอเลต มีการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่นเดิม คือ 254 และ 309 นาโนเมตร ในขณะที่สารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพมที่มีการเติมซิงค์ออกไซด์ และผ่านการฉายแสงอัลตราไวโอเลต พบว่าเกิดการเปลี่ยนแปลงของสเปกตรัมการดูดกลืนแสง โดยสารละลายตัวอย่างเกิดการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่นใหม่ คือ 345 นาโนเมตร

ดังนั้น ปัจจัยที่สำคัญต่อการเปลี่ยนแปลงของความยาวคลื่นที่เกิดการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพมหลังผ่านปฏิกิริยาโฟโตคะตะไลซิส คือ การฉายแสงอัลตราไวโอเลตร่วมกับการใช้โลหะออกไซด์ เพราะแสงอัลตราไวโอเลตทำหน้าที่เป็นแหล่งพลังงานที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยา ในขณะที่โลหะออกไซด์ทำหน้าที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาเชิงแสง ซึ่งปัจจัยทั้งสองจึงมีความสำคัญเป็นอย่างมาก หากขาดปัจจัยใดปัจจัยหนึ่งไปจะส่งผลอย่างยิ่งต่อปฏิกิริยาโฟโตคะตะไลซิส จะเห็นได้ว่าการไม่เปลี่ยนแปลงของฟลูไนตราซีแพมหลังผ่านปฏิกิริยาโฟโตคะตะไลซิส หรืออาจเกิดขึ้นน้อยมากจนไม่สามารถวัดการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นได้ และจากการเปลี่ยนแปลงที่ชัดเจนของฟลูไนตราซีแพมหลังผ่านการฉายแสงอัลตราไวโอเลต โดยมีซิงค์ออกไซด์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา มีแนวโน้มที่จะเกิดผ่านกลไกดังต่อไปนี้

$$ZnO + h\upsilon\,(<360\ nm) \longrightarrow h^{+} + e^{4}$$

$$e^{4} + O_2 \longrightarrow O_2^{\bullet -}$$

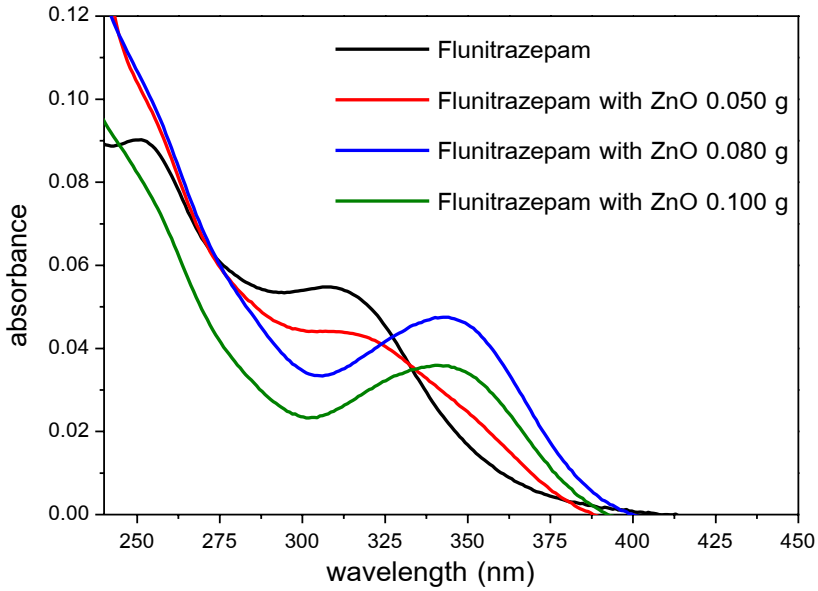
$$O_2^{\bullet -} + RH \longrightarrow R^{\bullet} + HO_2^{\bullet -}$$

$$R^{\bullet} + h_{vb}^{+} \longrightarrow R^{\bullet +} \longrightarrow \text{degradation products}$$

เมื่อซิงค์ออกไซด์ได้รับพลังงาน ที่ความยาวคลื่นน้อยกว่า 360 นาโนเมตร เป็นผลให้เกิดการเคลื่อนที่ของอิเล็กตรอนผิวหน้าและเกิดโฮลขึ้น เมื่ออิเล็กตอนถูกออกซิเจนรับจะทำให้เกิดเป็นซุปเปอร์ออกซิเจนขึ้น ซึ่งซุปเปอร์ออกไซด์นี้จะเข้าทำปฏิกิริยากับสารประกอบอินทรีย์ (RH) ได้เป็นสารอินทรีย์ในรูปของออกไซด์ เมื่อได้รับพลังงานกระตุ้น สารอินทรีย์นจะเกิดการเปลี่ยนไป ทำให้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายแตกต่างจากสารตั้งต้น หรืออาจทำให้สารเดิมเกิดการสลายไป

3.5.3 ศึกษาปริมาณของโลหะออกไซด์ อุณหภูมิขณะฉายแสงอัลตราไวโอเลต และเวลาที่เหมาะสมของการฉายแสงอัลตราไวโอเลต เพื่อตรวจพิสูจน์ฟลู-ไนตราซีแพม

ปริมาณของซิงค์ออกไซด์ที่ใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาเชิงแสงของปฏิกิริยาโฟโตคะ-ตะไลซิสเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญ เพราะการใช้ปริมาณของซิงค์ออกไซด์ที่น้อยเกินไปอาจส่งผลต่อประสิทธิภาพในการวิเคราะห์ฟลูไนตราซีแพม ในขณะที่ปริมาณของซิงค์ออกไซด์ที่มากเกินไปอาจทำให้เกิดการดูดซับสารที่ต้องการวิเคราะห์ได้เช่นเดียวกัน ดังนั้นจำเป็นต้องศึกษาปริมาณที่เหมาะสมของซิงค์ออกไซด์เพื่อใช้ในปฏิกิริยาโฟโตคะตะไลซิส โดยปริมาณของซิงค์ออกไซด์ที่เหมาะสมในสภาวะที่ทำการวิจัยนั้น ได้ศึกษาอยู่ในช่วง 0.050 ถึง 0.100 กรัม ในสารละลายตัวอย่าง 10.00 มิลลิลิตร



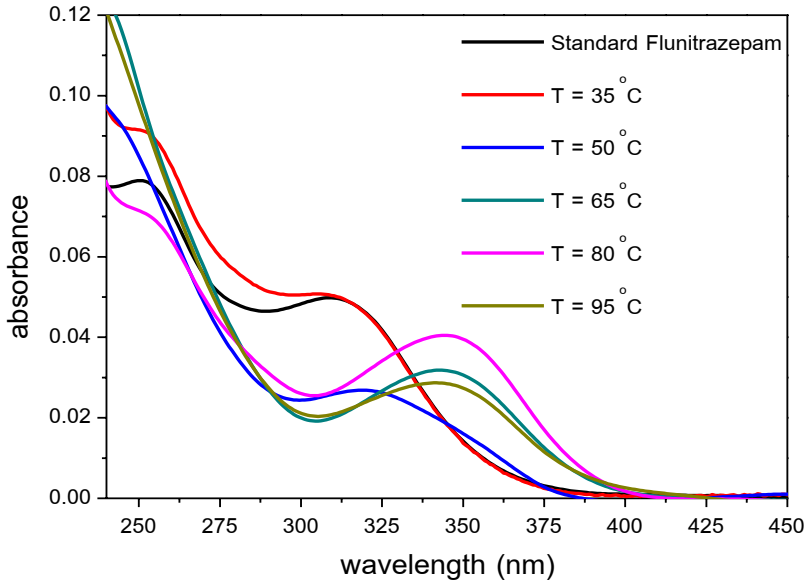
รูปที่ 50 แสดงสเปกตราการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพม ความเข้มข้น 1.500 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่มีซิงค์ออกไซด์ปริมาณต่างๆ ในโซดาปริมาตร 10.00 มิลลิลิตร หลังฉายแสงอัลตราไวโอเลตนาน 30 นาที ที่อุณหภูมิ 80.0 องศา-เซลเซียส

การดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพม หลังผ่านปฏิกิริยาโฟโตคะตะไลซิส เกิดการเปลี่ยนแปลงของสเปกตรัมการดูดกลืนแสงอย่างชัดเจนเมื่อสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพมมีซิงค์ออกไซด์ 0.080 และ 0.100 กรัม (รูปที่ 50) โดยสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพมที่มีซิงค์ออกไซด์ปริมาณ 0.080 กรัม ให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่

ความยาวคลื่น 345 นาโนเมตร สูงกว่าสารละลายตัวอย่างที่มีซิงค์ออกไซด์ 0.100 กรัม ทั้งนี้มีอาจเกิดจากการดูดซับฟลูไนตราซีแพมจากซิงค์ออกไซด์ที่มีมากเกินพอ หลังจากเกิดปฏิกิริยาโฟโตคะตะไลซิส และอีกประการหนึ่ง คือ เมื่อความเข้มข้นของซิงค์ออกไซด์เพิ่มขึ้น ทำให้สารละลายมีความขุ่นเพิ่มขึ้นและเกิดการกระเจิงของแสงที่ผ่านเข้าสู่สารละลายตัวอย่าง เป็นผลให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ตรวจวัดได้มีค่าที่ลดลง สำหรับสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพมที่มีการเติมซิงค์ออกไซด์ 0.050 กรัม พบว่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 345 นาโนเมตร เกิดขึ้นเพียงเล็กน้อย เนื่องจากปริมาณของตัวเร่งปฏิกิริยาเชิงแสงไม่เพียงพอสำหรับการเกิดปฏิกิริยาโฟโตคะตะไลซิสของฟลูไนตราซีแพมที่สมบูรณ์ จากผลการศึกษาดังกล่าวเป็นการยืนยันความสำคัญของปริมาณซิงค์ออกไซด์ที่จะใช้ในการทำปฏิกิริยาดังที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้น และปริมาณที่เหมาะสมของซิงค์ออกไซด์สำหรับปฏิกิริยาโฟโตคะตะไลซิส เพื่อการตรวจพิสูจน์ฟลูไนตราซีแพมในสภาวะที่ทำการวิจัย คือ 0.080 กรัม ในสารละลาย 10.00 มิลลิลิตร หรือคิดเป็นความเข้มข้นเท่ากับ 0.0080 กรัมต่อมิลลิลิตร

การฉายแสงอัลตราไวโอเลต เพื่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของฟลูไนตราซีแพมอย่างต่อเนื่อง 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิประมาณ 45.0 องศาเซลเซียส สเปกตรัมการดูดกลืนแสงมีการเปลี่ยนแปลงไม่ชัดเจน (รูปที่ 48) ทั้งนี้เพราะพลังงานกระตุ้นที่ได้รับจากหลอดไฟ อาจไม่เพียงพอต่อการเกิดปฏิกิริยาโฟโตคะตะไลซิส การลดพลังงานกระตุ้นของปฏิกิริยาโดยอาศัยความร้อนจากการเพิ่มอุณหภูมิ ส่งผลให้เกิดปฏิกิริยาได้เร็วขึ้น แต่หากอุณหภูมิที่ใช้ขณะทำปฏิกิริยาสูงเกินไป อาจทำให้การกำหนดทิศทางของการเกิดปฏิกิริยาได้ยากขึ้น ดังนั้น จำเป็นต้องทำการศึกษาเพื่อให้ทราบถึงอุณหภูมิที่เหมาะสมที่นำมาใช้ในกระบวนการฉายแสงแก่สารฟลูไนตราซีแพม เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาที่มีความรวดเร็ว และมีประสิทธิภาพของผลการวิเคราะห์ดียิ่งขึ้น

ผลจากการศึกษาสเปกตราการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานฟลูไนตรา-ซีแพมที่มีซิงค์ออกไซด์ หลังผ่านการฉายแสงอัลตราไวโอเลตที่อุณหภูมิต่างๆ (รูปที่ 51) พบว่า การเปลี่ยนแปลงของสเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพมภายใต้สภาวะที่ทำการวิจัย เกิดขึ้นเมื่อใช้อุณหภูมิขณะฉายแสงมากกว่า 65 องศาเซลเซียส และการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 345 นาโนเมตร ของสารละลายฟลูไนตราซีแพมหลังทำปฏิกิริยาโฟโตคะตะไลซิสตามสภาวะที่ทำการวิจัย เกิดขึ้นได้ดีที่สุดเมื่อใช้อุณหภูมิขณะฉายแสงอัลตรา-ไวโอเลตประมาณ 80.0 องศาเซลเซียส และเมื่อใช้อุณหภูมิขณะฉายแสงสูงกว่า 80.0 องศาเซลเซียส ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 345 นาโนเมตร มีแนวโน้มลดลงสอดคล้องกับค่าพื้นที่ใต้กราฟของสเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานฟลูไนตรา-ซีแพม ช่วงความยาวคลื่น 300 – 400 นาโนเมตร ดังแสดงในตารางที่ 25



รูปที่ 51 แสดงสเปกตราการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพม ความเข้มข้น 1.500 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่มีซิงค์ออกไซด์ 0.0080 กรัมต่อมิลลิลิตร ในโซดาปริมาตร 10.00 มิลลิลิตร หลังการฉายแสงอัลตราไวโอเลต เป็นระยะเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิต่างๆ

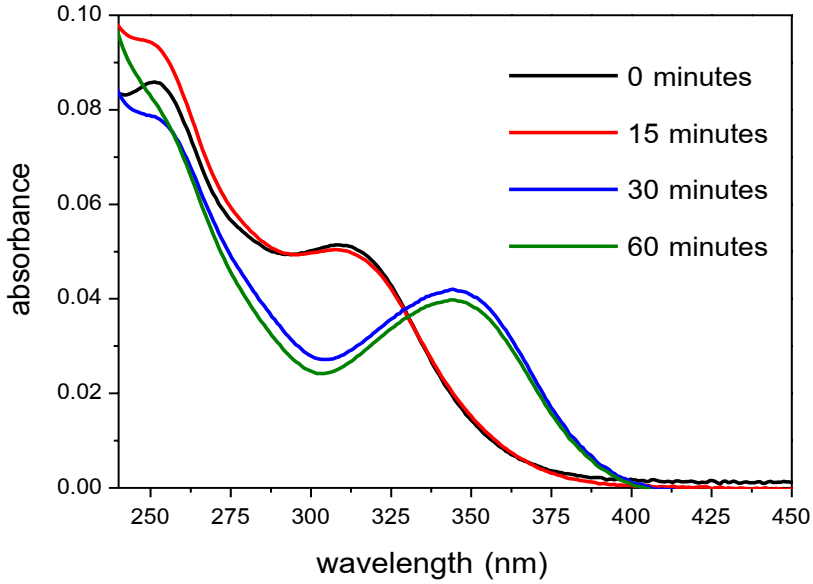
ตารางที่ 25 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 345 นาโนเมตร และพื้นที่ใต้กราฟของสเปกตรัมการดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่น 300 – 400 นาโนเมตร ของสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพมความเข้มข้น 1.500 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่มีซิงค์ออกไซด์ 0.0080 กรัมต่อมิลลิลิตร หลังผ่านการฉายแสงอัลตราไวโอเลต นาน 30 นาที ที่อุณหภูมิต่างๆ

อุณหภูมิขณะฉายแสง (องศาเซลเซียส)	ค่าการดูดกลืนแสง	พื้นที่ใต้กราฟของสเปกตรัมการดูดกลืนแสง
35.0	0.0189 ± 0.0007	0.00
50.0	0.0196 ± 0.0012	0.2766 ± 0.0236
65.0	0.0348 ± 0.0026	1.128 ± 0.1559
80.0	0.0419 ± 0.0016	1.256 ± 0.0094
95.0	0.0288 ± 0.0011	0.7413 ± 0.0566

ผลของอุณหภูมิระหว่างการฉายแสงอัลตราไวโอเลต ต่อประสิทธิภาพของการเกิดปฏิกิริยาโฟโตคะตะไลซิส เพราะความร้อนเป็นรูปแบบหนึ่งของพลังงานที่ทำให้สารเกิดการเปลี่ยนแปลงทางเคมีได้ การฉายแสงในสภาวะที่ทำการวิจัยโดยให้ความร้อนขณะฉายแสงน้อยเกินไป (ที่อุณหภูมิ 35.0 และ 50.0 องศาเซลเซียส) สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพมมีการเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้นเพียงเล็กน้อย เพราะโมเลกุลที่อุณหภูมิต่ำจะมีพลังงานจลน์น้อย โอกาสในการส่งผ่านอิเล็กตรอนจากแถบการนำของซิงค์ออกไซด์ไปยังโมเลกุลของฟลูไนตราซีแพมเกิดขึ้นได้น้อยกว่าปฏิกิริยาที่ใช้อุณหภูมิสูง อย่างไรก็ตาม เมื่อใช้อุณหภูมิขณะฉายแสงอัลตราไวโอเลตสูงเกินไป พบว่า ผลการเปลี่ยนแปลงของสเปกตรัมการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 345 นาโนเมตร มีแนวโน้มลดลง ซึ่งอาจเกิดจากการสลายตัวของอนุพันธ์ของฟลูไนตราซีแพมที่ผ่านปฏิกิริยาโฟโตคะตะไลซิส

จากการศึกษาเรื่องของอุณหภูมิ สรุปได้ว่า อุณหภูมิที่เหมาะที่สุดสำหรับการทำปฏิกิริยาโฟโตคะตะไลซิส เพื่อการตรวจพิสูจน์ฟลูไนตราซีแพมในสภาวะที่ทำการวิจัย โดยมีซิงค์ออกไซด์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาเชิงแสง คือ 80.0 องศาเซลเซียส เพราะเกิดการดูดกลืนที่ความยาวคลื่น 345 นาโนเมตร ชัดเจนมากที่สุด และมีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 345 นาโนเมตร และพื้นที่ใต้กราฟของสเปกตรัมการดูดกลืนแสง ในช่วงความยาวคลื่น 300 – 400 นาโนเมตร สูงกว่าอุณหภูมิอื่นๆ ที่ทำการศึกษา

สำหรับระยะเวลาการฉายแสงอัลตราไวโอเลตแก่ฟลูไนตราซีแพม ที่มีการเติมซิงค์ออกไซด์ 0.0080 กรัมต่อมิลลิลิตร ที่อุณหภูมิขณะฉายแสงประมาณ 80.0 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 15 30 และ 60 นาที พบว่า สเปกตรัมของการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพมที่ผ่านการฉายแสง 15 นาที ไม่แตกต่างจากสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพมเริ่มต้น การเปลี่ยนแปลงของสเปกตรัมการดูดกลืนแสงจะเกิดขึ้นชัดเจน หลังผ่านกระบวนกระตุ้นเชิงแสงนาน 30 และ 60 นาที โดยมีค่าของการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 345 นาโนเมตรใกล้เคียงกัน (รูปที่ 52) แสดงให้เห็นว่าปฏิกิริยาโฟโตคะตะไลซิสภายใต้สภาวะที่ทำการวิจัย สามารถเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ เมื่อมีการฉายแสงอัลตราไวโอเลตแก่สารละลายตัวอย่างต่อเนื่องนาน 30 นาที และแม้จะมีการฉายแสงอัลตราไวโอเลตให้แก่สารละลายนานขึ้นจนถึง 60 นาที ก็ไม่พบว่าเกิดความเปลี่ยนแปลงของสเปกตรัมการดูดกลืนแสงที่สำคัญต่อการตรวจพิสูจน์สารฟลูไนตราซีแพม ดังนั้น ระยะเวลาในการฉายแสงอัลตราไวโอเลตที่เหมาะสมต่อการตรวจพิสูจน์สารฟลูไนตราซีแพม คือ 30 นาที



รูปที่ 52 แสดงสเปกตราการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพม ความเข้มข้น 1.500 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่มีซิงค์ออกไซด์ 0.0080 กรัมต่อมิลลิลิตร ในโซดาปริมาตร 10.00 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิประมาณ 80.0 องศาเซลเซียส หลังฉายแสงอัลตราไวโอเลต ในระยะเวลาที่ต่างกัน

การที่สารฟลูไนตราซีแพมมีระยะเวลาในการฉายแสงอัลตราไวโอเลต เพื่อที่จะเปลี่ยนเป็นสารอนุพันธ์ได้นานเป็นช่วงระยะเวลาหนึ่ง หลังจากเกิดปฏิกิริยาที่สมบูรณ์แล้วนั้น (ประมาณ 30 นาที) โดยที่สารอนุพันธ์ที่ได้ไม่มีการเปลี่ยนแปลง หรือสลายไปอย่างมีนัยสำคัญต่อการตรวจวิเคราะห์ ถือว่าเป็นข้อดีของเทคนิคนี้ เพราะในการนำไปประยุกต์ใช้สามารถยืดหยุ่นช่วงเวลาในการตรวจพิสูจน์ได้ โดยที่ไม่ทำให้เกิดความผิดพลาดของผลการตรวจพิสูจน์

สรุปได้ว่า สภาวะที่เหมาะสมในการตรวจพิสูจน์ฟลูไนตราซีแพม ด้วยปฏิกิริยาโฟโตคะตะไลซิส คือ การใช้ซิงค์ออกไซด์ 0.0080 กรัมต่อมิลลิลิตร เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาเชิงแสง โดยจะฉายแสงอัลตราไวโอเลตที่มีความยาวคลื่น 360 นาโนเมตร (ขนาด 18 วัตต์ จำนวน 2 หลอด) ซึ่งถูกติดตั้งอยู่ภายในกล่องสำหรับการฉายแสงอัลตราไวโอเลต (รูปที่ 9) แก่สารละลายตัวอย่าง เป็นระยะเวลานาน 30 นาที ที่อุณหภูมิขณะฉายแสง 80.0 องศาเซลเซียส

3.5.4 การพิสูจน์ฟลูไนตราซีแพมที่ผ่านปฏิกิริยาโฟโตคะตะไลซิสด้วยเทคนิคแมสสเปกโทรเมทรี

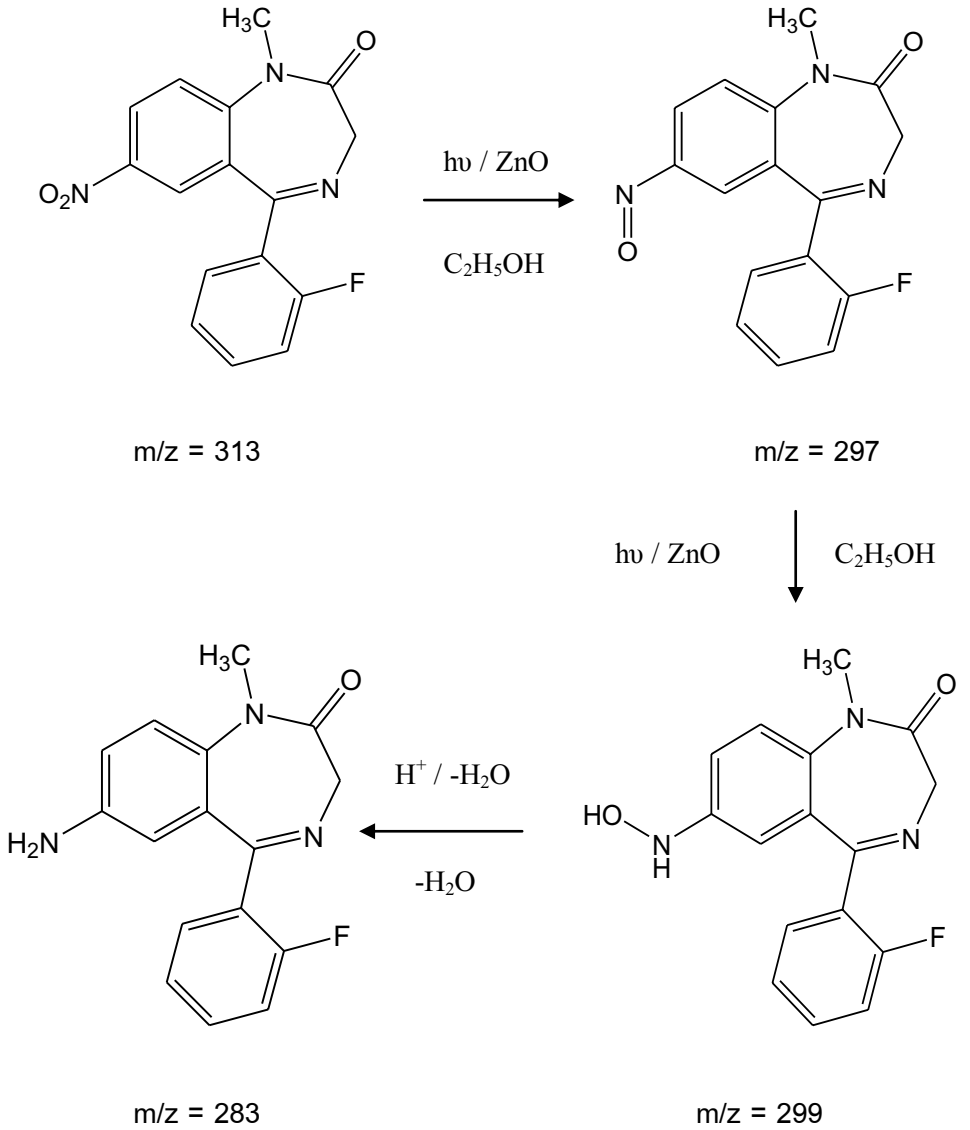
จากข้อมูลค่ามวลต่อประจุ (m/z) ซึ่งเป็นการวิเคราะห์รูปแบบการแตกของโครงสร้างโมเลกุลด้วยเทคนิคแมสสเปกโทรเมทรีของสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพม และสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพมที่ผ่านปฏิกิริยาโฟโตคะตะไลซิส ตามสภาวะที่ทำการวิจัย (ตารางที่ 26) พบว่า ค่ามวลต่อประจุของสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพมและสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพมหลังเกิดปฏิกิริยาโฟโตคะตะไลซิส มีค่ามวลต่อประจุของพีคหลักแตกต่างกันเป็นส่วนใหญ่ แสดงว่าโครงสร้างของสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพม หลังผ่านปฏิกิริยาโฟโตคะตะไลซิสได้เกิดการเปลี่ยนแปลงขึ้น อย่างไรก็ตาม ค่ามวลต่อประจุบางค่าของฟลูไนตราซีแพมหลังผ่านปฏิกิริยาโฟโตคะตะไลซิส เหมือนกับสารฟลูไนตราซีแพมตั้งต้นและมีค่ามวลต่อประจุที่สูง ได้แก่ ค่ามวลต่อประจุที่ 238 178 149 97 และ 83 ทำให้คาดคะเนได้ว่า โครงสร้างโมเลกุลของฟลูไนตราซีแพมหลังจากเกิดปฏิกิริยาโฟโตคะตะไลซิสมีรูปร่างของโมเลกุลที่ต่างจากฟลูไนตราซีแพมเฉพาะหมู่แทนที่ ทำให้รูปแบบการแตกตัวของโครงสร้างคล้ายคลึงกัน

ตารางที่ 26 แสดงค่ามวลต่อประจุของสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพม และสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพมที่มีซิงค์ออกไซด์ 0.0080 กรัมต่อมิลลิลิตร ในโซดา 10.00 มิลลิลิตร ที่ผ่านการฉายอัลตราไวโอเลต นาน 30 นาที อุณหภูมิขณะฉายแสงประมาณ 80.0 องศาเซลเซียส

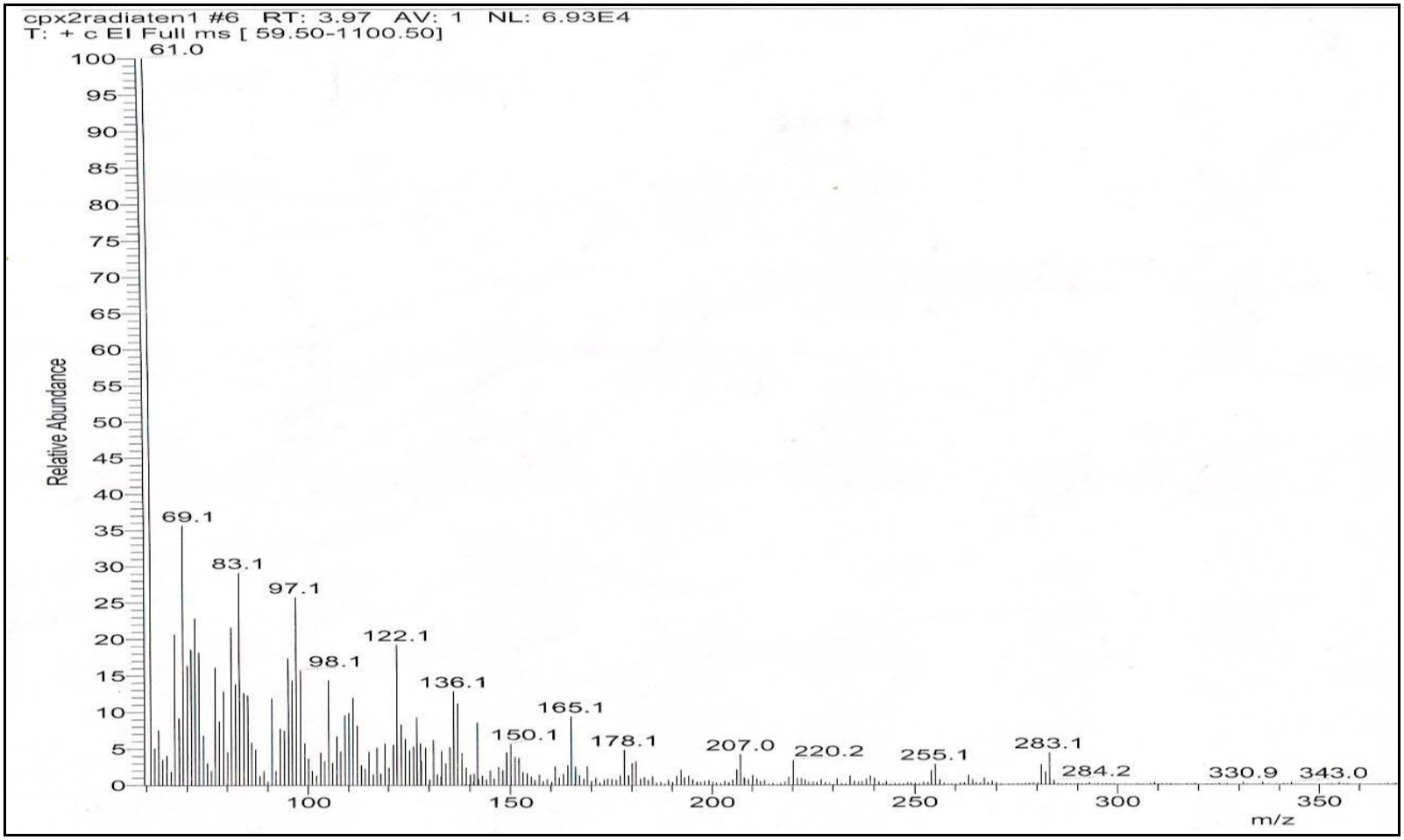
ตัวอย่าง	ค่ามวลต่อประจุ (m/z)
สารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพม	313, 312, 294, 286, 266, 248, 239, 238, 237, 210, 183, 178, 161, 149, 133, 111, 97, 85, 83 และ 71
สารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพมหลังทำปฏิกิริยาโฟโตคะตะไลซิส	283, 255, 220, 207, 178, 165, 150, 136, 122, 97, 83 และ 69

รูปแบบการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างโมเลกุลของสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพมหลังผ่านปฏิกิริยาโฟโตคะตะไลซิส โดยอ้างอิงจากงานวิจัยของ Givens และคณะ (1986) ร่วมกับการวิเคราะห์ผลของค่ามวลต่อประจุ จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคแมสสเปกโทรเมทรีทำให้ทราบว่าผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นหลังจากฉายแสงอัลตราไวโอเลตของสารฟลูไนตราซีแพม คือ

7–aminoflunitrazepam ซึ่งเกิดจากการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างโมเลกุลขึ้นที่บริเวณหมู่แทนที่ไนโตร (-NO_2) ตำแหน่งที่ 7 ของโครงสร้างโมเลกุล จากการเข้าแทนที่ของไฮดรอกซิลไอออน (hydroxyl ion, OH^-) ที่เกิดจากเอทานอล ทำให้หมู่ไนโตรเปลี่ยนเป็นไนโตรโซ (nitroso, NO) และไฮดรอกซิลอะมิโน (hydroxyl amino, NHOH) จากนั้นไฮโดรเจนไอออนจะจับกับไฮดรอก-ซิลของไฮดรอกซิลอะมิโน จนกลายเป็นหมู่อะมิโนในตำแหน่งที่ 7 ของโครงสร้างฟลูไนตราซี-แพมในที่สุด (รูปที่ 53)



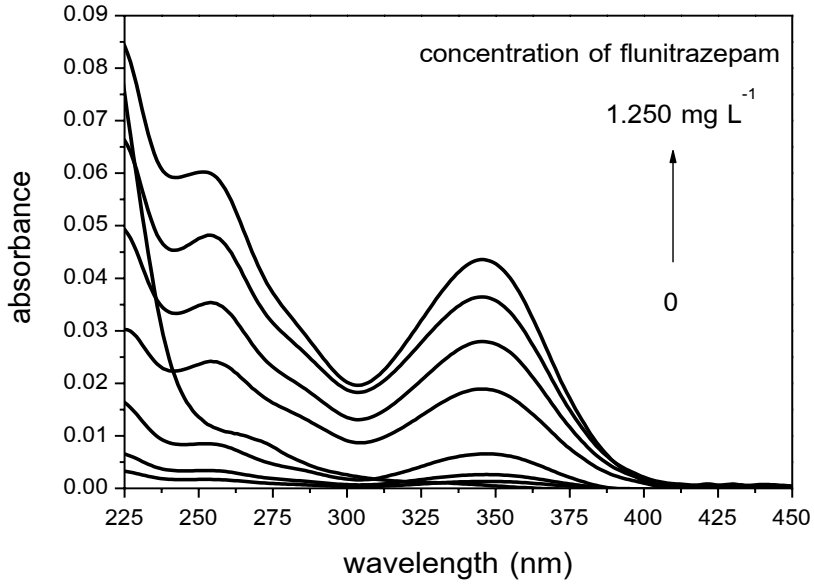
รูปที่ 53 แสดงรูปแบบการแตกตัวของโครงสร้างโมเลกุลของสารละลายมาตรฐานฟลูไน-ตราซีแพมที่ผ่านการฉายแสงอัลตราไวโอเลตนาน 30 นาที ที่อุณหภูมิ 80.0 องศาเซล-เซียส โดยมีซิงค์ออกไซด์ 0.0080 กรัมต่อมิลลิลิตร เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาเชิงแสง ในโซดา



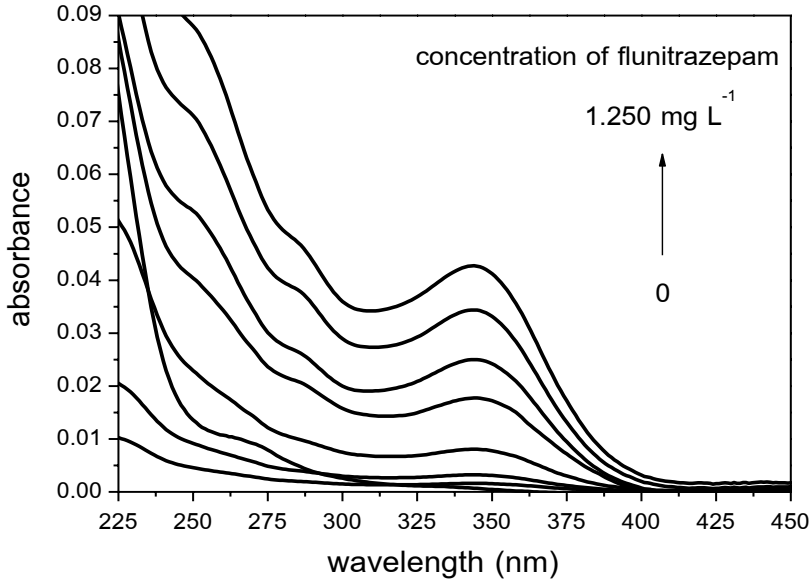
รูปที่ 54 แสดงแมสสเปกตรัมของฟลูไนตราซีแพมหลังเกิดปฏิกิริยาโฟโตคะตะไลซิส

3.5.5 ศึกษาความเข้มข้นต่ำสุดของฟลูไนตราซีแพมที่สามารถตรวจพิสูจน์ได้

ผลการวิเคราะห์การดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพม และสารละลายฟลูไนตราซีแพมจากยาเม็ดโรฮิปนอล ที่ความยาวคลื่น 345 นาโนเมตร หลังผ่านกระบวนการฉายแสง ในสภาวะเดียวกัน คือ ทำการฉายแสงโดยมีซิงค์ออกไซด์ 0.080 กรัม ในสารละลาย 10.00 มิลลิลิตร นาน 30 นาที ที่อุณหภูมิ 80.0 องศาเซลเซียส พบว่า ความเข้มข้นต่ำสุดของสารฟลูไนตราซีแพม ที่สามารถตรวจวัดได้ คือ 0.0500 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพม และสารละลายฟลูไนตราซีแพมจากยาเม็ดโรฮิปนอล มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 345 นาโนเมตร ใกล้เคียงกันมาก และพื้นที่ใต้กราฟของสเปกตรัมการดูดกลืนแสงช่วงความยาวคลื่น 300 – 400 นาโนเมตร มีค่าเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของฟลูไนตราซีแพมในตัวอย่าง อย่างเป็นลำดับ (รูปที่ 55 และ 56 และตารางที่ 27 และ 28) โดยพื้นที่ใต้กราฟของสเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารละลายฟลูไนตราซีแพมจากยาเม็ดโรฮิปนอล มีค่าน้อยกว่าสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพม ซึ่งเป็นผลจากการรูปแบบของสเปกตรัมการดูดกลืนแสงที่แตกต่างกัน



รูปที่ 55 แสดงสเปกตราการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพม ในโซดา หลังการฉายแสงอัลตราไวโอเลต นาน 30 นาที ที่อุณหภูมิ 80.0 องศาเซลเซียส โดยมีซิงค์ออกไซด์ 0.008 กรัมต่อมิลลิลิตร



รูปที่ 56 แสดงสเปกตราการดูดกลืนแสงของสารละลายฟลูไนตราซีแพมจากยาเม็ดโรฮิปนอลในโซดา หลังการฉายแสงอัลตราไวโอเลต นาน 30 นาที ที่อุณหภูมิ 80.0 องศาเซลเซียส โดยมีซิงค์ออกไซด์ 0.008 กรัมต่อมิลลิลิตร

ตารางที่ 27 แสดงค่าการดูดกลืนแสงและพื้นที่ใต้กราฟของสเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพม ที่มีซิงค์ออกไซด์ 0.008 กรัมต่อมิลลิลิตร หลังฉายแสงอัลตราไวโอเลตนาน 30 นาที ที่อุณหภูมิ 80.0 องศาเซลเซียส

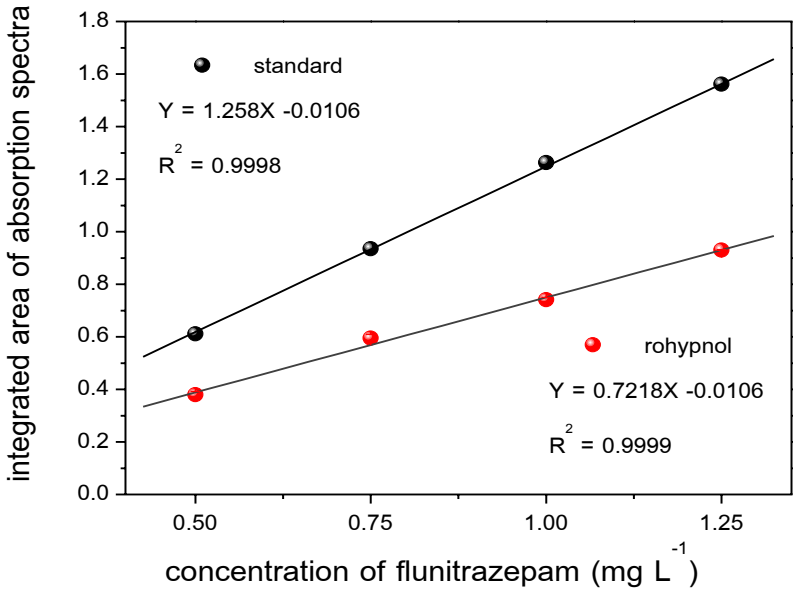
ความเข้มข้นของฟลูไนตราซีแพม (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสง (350 นาโนเมตร)	พื้นที่ใต้กราฟสเปกตรัมการดูดกลืนแสง (300 – 400 นาโนเมตร)
0.0500	0.00132	0.0538 ± 0.002
0.1000	0.00265 ± 0.0001	0.1111 ± 0.0056
0.2500	0.00656 ± 0.0003	0.2777 ± 0.0141
0.5000	0.01748 ± 0.0011	0.6108 ± 0.0638
0.7500	0.02702 ± 0.0003	0.9350 ± 0.0893
1.0000	0.03767 ± 0.0005	1.2629 ± 0.1096
1.2500	0.04456 ± 0.0011	1.5617 ± 0.1342
สมการเส้นตรง	y = 0.0369x R^2 = 0.9992	y = 1.258x – 0.011 R^2 -= 0.9998

ตารางที่ 28 แสดงค่าการดูดกลืนแสงและพื้นที่ใต้กราฟของสเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารละลายฟลูไนตราซีแพมจากยาเม็ดโรฮิปนอล ที่มีซิงค์ออกไซด์ 0.008 กรัมต่อ มิลลิลิตร หลังฉายแสงอัลตราไวโอเลต นาน 30 นาที ที่อุณหภูมิ 80.0 องศาเซลเซียส

ความเข้มข้นของฟลูไนตราซีแพม (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสง (350 นาโนเมตร)	พื้นที่ใต้กราฟสเปกตรัมการดูดกลืนแสง (300 – 400 นาโนเมตร)
สารละลายยาเม็ดโรฮิปนอล		
0.0500	0.00161 ± 0.0005	0.0277 ± 0.0062
0.1000	0.00322	0.0578 ± 0.0145
0.2500	0.00805 ± 0.0004	0.1446 ± 0.0367
0.5000	0.01776 ± 0.0003	0.3801 ± 0.0118
0.7500	0.02505 ± 0.0001	0.5951 ± 0.0135
1.0000	0.03436 ± 0.0002	0.7413 ± 0.0088
1.2500	0.04273 ± .0.0032	0.9177 ± 0.0174
สมการเส้นตรง	$y = 0.0341x$ $R^2 = 0.9992$	$y = 0.722x – 0.011$ $R^2 -= 0.9999$

เมื่อคำนวณหาขีดความสามารถในการตรวจวัดฟลูไนตราซีแพมด้วยปฏิกิริยาโฟโตคะตะไลซิส ตามสภาวะที่ใช้ในงานวิจัย ที่ความยาวคลื่น 345 นาโนเมตร พบว่าแบลงค์ (ซิงค์ออกไซด์ที่ผ่านการฉายแสง) ให้ขีดความสามารถในการตรวจวัดที่ 0.0062 เมื่อนำมาคำนวณหาขีดความสามารถในการตรวจวิเคราะห์ฟลูไนตราซีแพมจากสารละลายมาตรฐานและสารละลายยาเม็ดโรฮิปนอลในเชิงคุณภาพ อยู่ที่ 0.17 และ 0.18 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ สำหรับขีดความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ในเชิงปริมาณอยู่ที่ 0.5200 และ 0.5700 มิลลิกรัมต่อลิตร ดังนั้น ความเข้มข้นต่ำสุดของฟลูไนตราซีแพมที่ให้ความถูกต้องของการวิเคราะห์ด้วยวิธีการทำปฏิกิริยาโฟโตคะตะไลซิสตามสภาวะที่ใช้ในงานวิจัย คือ 0.18 มิลลิกรัมต่อลิตร ในเชิงคุณภาพวิเคราะห์ และ 0.57 มิลลิกรัมต่อลิตร ในเชิงปริมาณวิเคราะห์

จากข้อมูลพื้นที่ใต้กราฟสเปกตรัมดูดกลืนแสงช่วงความยาวคลื่น 300 – 400 นาโนเมตร ของสารละลายมาตรฐานและสารละลายยาเม็ดโรฮิปนอล (ตารางที่ 27 และ 28) เมื่อนำมาหาความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ใต้กราฟของสเปกตรัมการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของฟลูไนตราซีแพมในสารละลายตัวอย่าง พบว่า มีช่วงความเป็นเส้นตรงของกราฟในช่วงความเข้มข้นของฟลูไนตราซีแพม 0.5000 – 1.250 มิลลิกรัมต่อลิตร (รูปที่ 58)

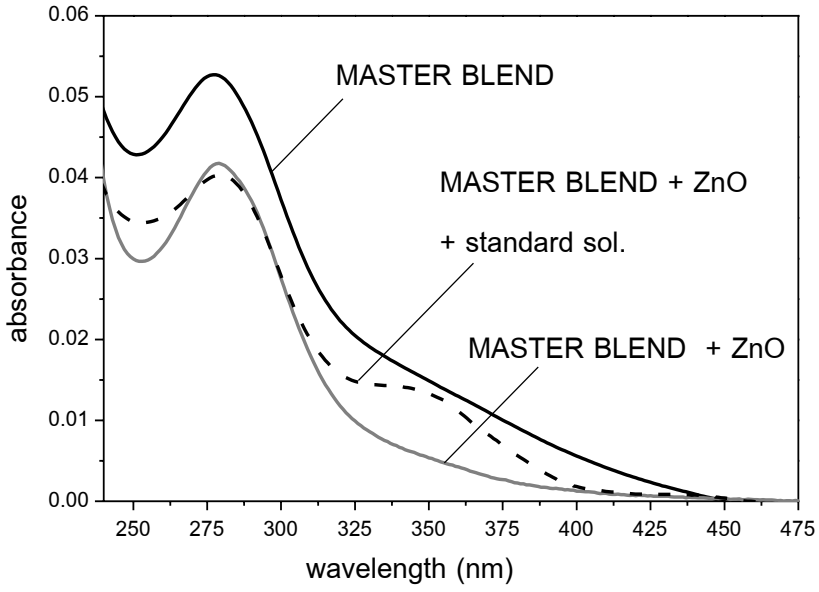


รูปที่ 57 แสดงกราฟมาตรฐานของระหว่างพื้นที่ใต้กราฟสเปกตรัมการดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่น 300 – 400 นาโนเมตร กับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพมและสารละลายฟลูไนตราซีแพมจากยาเม็ดโรฮิปนอล ในโซดา หลังฉายแสงอัลตราไวโอเลต นาน 30 นาที ที่อุณหภูมิ 80.0 องศาเซลเซียส โดยมีซิงค์ออกไซด์ 0.008 กรัมต่อมิลลิลิตร

จากผลการศึกษาพื้นที่ใต้กราฟของสเปกตรัมการดูดกลืนแสงของฟลูไนตราซีแพมหลังผ่านกระบวนการโฟโตคะตะไลซิส ที่ให้ความแตกต่างของพื้นที่ใต้กราฟระหว่างสารละลายมาตรฐานและสารละลายยาเม็ดโรฮิปนอล ทั้งที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 345 นาโนเมตร ของตัวอย่างทั้งสองมีค่าใกล้เคียงกันมาก เมื่อพิจารณาสเปกตรัมการดูดกลืนแสงรูปที่ 55 และ 56 จะพบว่าในช่วงความยาวคลื่น 300 – 400 นาโนเมตร สารละลายตัวอย่างให้ลักษณะของสเปกตรัมที่แตกต่างกัน โดยสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพมให้ลักษณะของสเปกตรัมที่ชัดเจนมากกว่า ซึ่งอาจเป็นผลจากการที่ซิงค์ออกไซด์บางส่วนได้เข้าไปทำหน้าที่ในการสลายสีที่มีอยู่ในเม็ดยา ไปพร้อมๆกับการทำปฏิกิริยาต่อสารฟลูไนตราซีแพม ทำให้ประสิทธิภาพการเกิดปฏิกิริยาในการที่จะเปลี่ยนสารฟลูไนตราซีแพมให้กลายเป็นสารอนุพันธ์ลดลงเล็กน้อย อย่างไรก็ตามผลดังกล่าวไม่ได้ส่งผลอย่างมีนัยสำคัญต่อการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 345 นาโนเมตร ระหว่างสารมาตรฐานและยาเม็ดโรฮิปนอลที่ความเข้มข้นเท่ากัน ในช่วงความเข้มข้นที่ทำการศึกษา

3.5.6 ศึกษาฟลูไนตราซีแพมในเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ประเภทมีสี

จากสเปกตราการดูดกลืนแสงรูปที่ 58 แสดงให้เห็นว่า เกิดการเปลี่ยนแปลงของสเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารละลายฟลูไนตราซีแพมในเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ ที่ความยาวคลื่น 345 นาโนเมตร เช่นเดียวกับสารละลายตัวอย่างที่ไม่มีเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ ในขณะเดียวกัน พบว่าสีของเครื่องดื่มแอลกอฮอล์เมื่อผ่านปฏิกิริยาโฟโตคะตะไลซิสมีความเข้มที่ลดลง แสดงว่าซิงค์ออกไซด์ที่ใช้ในปฏิกิริยาโฟโตคะตะไลซิส ทำหน้าที่ 2 ส่วนไปพร้อมๆกัน คือ (1) การทำหน้าที่เป็นตัวดูดซับสีของเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ แต่ไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของความยาวคลื่นที่เกิดการดูดกลืนแสงเหมือนกับสารฟลูไนตราซีแพม และ (2) ทำหน้าที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาเชิงแสง ที่สามารถเร่งปฏิกิริยาในการส่งผ่านอิเล็กตรอนไปยังฟลูไนตราซีแพม แล้วทำให้เกิดเป็น 7-aminoflunitrazepam จากผลความแตกต่างของการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 345 นาโนเมตร ทำให้สามารถแยกความแตกต่างระหว่างเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ที่มีสารฟลูไนตราซีแพม และเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ที่ไม่มีสารฟลูไนตราซีแพมได้

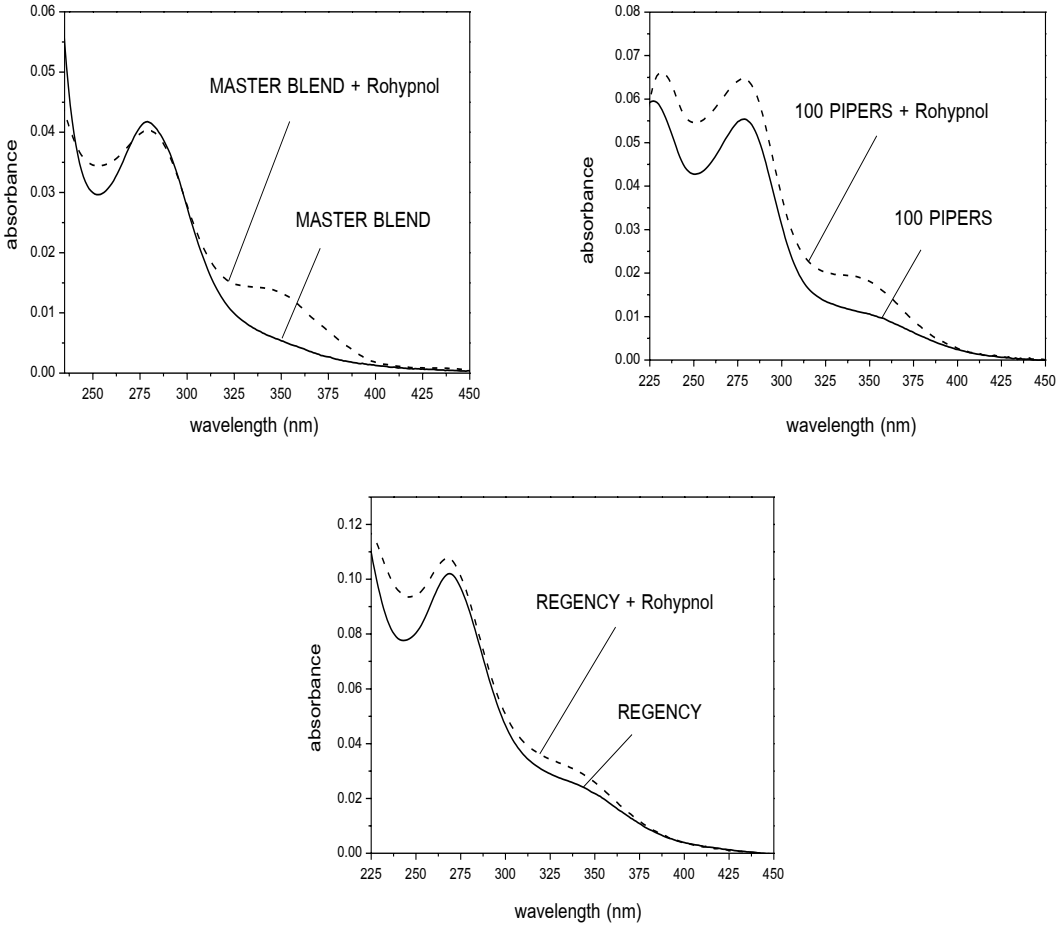


รูปที่ 58 แสดงสเปกตราการดูดกลืนแสงของ MASTER BLEND 0.25 มิลลิลิตร, MASTER BLEND ที่มีซิงค์ออกไซด์ 0.0080 กรัมต่อมิลลิลิตร และ MASTER BLEND ที่มีสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพมความเข้มข้น 0.2500 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยมีการเติมซิงค์ออกไซด์ และหลังผ่านการฉายแสงนาน 30 นาที ที่อุณหภูมิขณะฉายแสง 80.0 องศาเซลเซียส

การเปลี่ยนแปลงของความยาวคลื่นที่เกิดการดูดกลืนแสงของฟลูไนตราซีแพม อธิบายตามหลักการกระตุ้นเชิงแสง ได้ดังนี้ เมื่อซิงค์ออกไซด์ถูกฉายด้วยแสงอัลตราไวโอเลต ทำให้อิเล็กตรอนถูกกระตุ้นจากแถบพลังงานวาเลนซ์ (valence band) ไปยังแถบการนำไฟฟ้า (conduction band) เกิดเป็นคู่อิเล็กตรอน (e^-_{cb}) และโฮล (h^+_{vb}) ในแถบวาเลนซ์และแถบการนำไฟฟ้า ตามลำดับ จากนั้นโฮลจะเคลื่อนไปอยู่บนพื้นผิวของซิงค์ออกไซด์ และทำปฏิกิริยากับน้ำที่มีในโซดา ทำให้เกิดเป็นไฮดรอกไซด์อิสระ (hydroxide radical, $^{\cdot}OH$) ที่สามารถทำปฏิกิริยาและกำจัดสีของเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ เป็นผลให้ค่าการดูดกลืนแสงของเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ลดลง ในขณะเดียวกัน อิเล็กตรอนในแถบการนำไฟฟ้าจะเกิดปฏิกิริยากับออกซิเจน ได้เป็นซุปเปอร์ออกไซด์อิสระที่มีประจุลบ (superoxide anionic radical, O_2^-) และทำปฏิกิริยากับฟลูไนตราซีแพม ได้เป็นอนุพันธ์ คือ อะมิโนฟลูไนตราซีแพม (7-aminoflunitrazepam) ซึ่งให้เกิดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 350 นาโนเมตร การเปลี่ยนแปลงของความยาวคลื่นจะเกิดขึ้นเฉพาะเมื่อสารละลายตัวอย่างมีสารฟลูไนตราซีแพม

ปฏิกิริยาโฟโตคะตะไลซิสตามสภาวะที่ทำการวิจัย สามารถนำมาประยุกต์ใช้เพื่อการตรวจพิสูจน์ฟลูไนตราซีแพมในเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ประเภทมีสีได้ และเพื่อให้ใกล้เคียงกับตัวอย่างในสถานการณ์จริง จึงทำการตรวจพิสูจน์ฟลูไนตราซีแพมจากยาเม็ดโรฮิปนอล ในเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ประเภทมีสี โดยความเข้มข้นต่ำสุดของฟลูไนตราซีแพมที่ใช้ในการทดลอง คือ 0.2500 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นช่วงที่สามารถตรวจวัดในเชิงคุณภาพวิเคราะห์จากวิธีการที่ใช้ในงานวิจัยนี้ได้ สำหรับเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ประเภทมีสีที่ใช้ในการทดลอง ได้แก่ MASTER BLEND, 100 PIPERS และ REGENCY ซึ่งเป็นเครื่องดื่มที่รู้จักกันทั่วไป และมีราคาขายอยู่ในระดับกลางของเครื่องดื่มแอลกอฮอล์

จากการทดลอง พบว่า ปฏิกิริยาโฟโตคะตะไลซิส ตามสภาวะที่ทำการวิจัย สามารถตรวจพิสูจน์ฟลูไนตราซีแพมที่มีอยู่ในเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ประเภทมีสี โดยวิเคราะห์ตำแหน่งการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นประมาณ 345 นาโนเมตร (จากรูปที่ 59) ตัวอย่างเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ทุกชนิดที่ใช้ในการทดลอง (ซึ่งมีค่า % alc. อยู่ในช่วง 35 – 40) ที่มีสารละลายฟลูไนตราซีแพมความเข้มข้น 0.2500 มิลลิกรัมต่อลิตร จะมีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 345 นาโนเมตร หลังผ่านปฏิกิริยาโฟโตคะตะไลซิสสูงกว่าตัวอย่างเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ที่ไม่มีฟลูไนตราซีแพม



รูปที่ 59 แสดงสเปกตราการดูดกลืนแสงของเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ 0.25 มิลลิลิตร และเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ที่มีสารละลายยาเม็ดโรฮิปนอลความเข้มข้น 0.2500 มิลลิกรัมต่อลิตร ในโซดาปริมาตร 10.00 มิลลิลิตร โดยเติมซิงค์ออกไซด์ 0.080 กรัม ในสารละลายปริมาตร 10.00 มิลลิลิตร ฉายแสงอัลตราไวโอเลตนาน 30 นาที ที่อุณหภูมิ 80.0 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 29 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ 0.250 มิลลิลิตร และเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ที่มีฟลูไนตราซีแพม ความเข้มข้น 0.2500 มิลลิกรัมต่อลิตร ในโซดา หลังฉายแสงอัลตราไวโอเลต ที่อุณหภูมิ 80.0 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที

ชื่อทางการค้า	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 345 นาโนเมตร		ความแตกต่างของค่าการดูดกลืนแสง
	ไม่มีฟลูไนตราซีแพม	มีฟลูไนตราซีแพม	
MASTER BLEND	0.0080 ± 0.0005	0.0139 ± 0.0014	0.0059
100 PIPERS	0.0089 ± 0.0012	0.0189 ± 0.0007	0.0100
REGENCY	0.0262 ± 0.0009	0.0339 ± 0.0016	0.0077

เมื่อเปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 345 นาโนเมตร ระหว่างสารละลายเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ที่มีสารฟลูไนตราซีแพม กับสารละลายเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ที่ไม่มีสารฟลูไนตราซีแพม (ตารางที่ 29) พบว่า MASTER BLEND ให้ค่าความแตกต่างของค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 345 นาโนเมตร มากกว่า 100 PIPERS และ REGENCY ตามลำดับ ซึ่งในการวิจัยนี้ ได้มีการควบคุมปริมาตรของเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ ความเข้มข้นของฟลูไนตราซีแพม และสภาวะอื่นๆ ให้เหมือนกันทุกสารละลายตัวอย่างเครื่องดื่มแอลกอฮอล์แต่ละชนิด ความแตกต่างของค่าการดูดกลืนแสงระหว่างสารละลายเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ที่มีสารฟลูไนตราซีแพมกับสารละลายเครื่องดื่มแอกอฮอล์ที่ไม่มีฟลูไนตราซีแพม ที่เกิดขึ้นเป็นผลมาจากความเข้มของสีเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ และส่วนผสมต่างๆในเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ ดังนั้นความสามารถในการตรวจพิสูจน์ฟลูไนตราซีแพมในเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ประเภทที่มีสี ขึ้นอยู่กับชนิดของเครื่องดื่มแอลกอฮอล์และปริมาณของเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ ที่ทำการตรวจวิเคราะห์

บทที่ 4

บทสรุปและการประยุกต์ใช้

4.1 บทสรุป

ในงานวิจัยนี้ ได้นำเสนอเทคนิคในการตรวจพิสูจน์ฟลูไนตราซีแพมเบื้องต้น เพื่อประยุกต์ใช้ในการตรวจพิสูจน์ฟลูไนตราซีแพม ในเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ โดยการใช้เทคนิคลูมิเนสเซนซ์สเปกโทรสโกปีและกระบวนการกระตุ้นเชิงแสง โดยสภาวะปกติ ฟลูไนตราซีแพมเป็นสารที่ไม่เกิดการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์ แต่จากการศึกษา พบว่า หลังมีการโปรโตเนตด้วยกรดเปอร์คลอริกความเข้มข้น 2.000 โมลาร์ ในตัวทำละลายเอทานอล ฟลูไนตราซีแพม (จากสารละลายมาตรฐานฟลูไนตราซีแพมและสารละลายฟลูไนตราซีแพมจากยาเม็ดโรฮิปนอล) เกิดการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่นใหม่ คือ 280 นาโนเมตร และสามารถเกิดการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์ขึ้นในช่วงความยาวคลื่น 400 – 530 นาโนเมตร โดยค่าความเข้มของการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์สูงสุด เกิดที่ความยาวคลื่น 477 นาโนเมตร เมื่อมีการกระตุ้นด้วยความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร (ที่อุณหภูมิห้อง) จากการวิเคราะห์สารละลายฟลูไนตราซีแพมและสารละลายฟลูไนตราซีแพมที่มีการโปรโตเนตด้วยเทคนิคแมสสเปกโทรสโกปี พบว่า มีความแตกต่างของค่ามวลต่อประจุ แสดงว่าลักษณะของโครงสร้างโมเลกุลของฟลูไนตราซีแพมหลังการโปรโตเนตเกิดการเปลี่ยนไปจากโครงสร้างโมเลกุลเดิม โดยพบว่าสารฟลูไนตราซีแพมเปลี่ยนแปลงโครงสร้างโมเลกุลกลายเป็น 2-nitro-*N*-methylacridone สอดคล้องกับผลการคำนวณด้วยโปรแกรม Guassian 09 หาโครงสร้างที่เหมาะสม (optimized structure) ด้วย b3lyb ใช้ basis set เป็น 6-31+G(d,P) หาพลังงานของ electronic state ด้วยเทคนิค Time dependent density functional theory (TDDFT) CAM-B3LYP basis set เป็น 6-311++G (2d,2P) เพื่อจำลองสเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่าง ความเข้มข้นต่ำสุดของฟลูไนตราซีแพมที่สามารถวิเคราะห์ได้ด้วยวิธีการโปรโตเนชัน ตามสภาวะที่ใช้ในงานวิจัยนี้ คือ 0.300 มิลลิกรัมต่อลิตร และสามารถประยุกต์ใช้กับเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ประเภทไม่มีสี ได้แก่ Vodka และ Tequila ได้เช่นกัน โดยความสามารถในการตรวจพิสูจน์ฟลูไนตราซีแพมขึ้นอยู่กับชนิดของเครื่องดื่ม

เนื่องจากสีของเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ ได้แก่ MASTER BLEND, 100 PIPERS และ REGENCY เกิดการดูดกลืนแสงและการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์ ในช่วงความยาวคลื่นเดียวกับฟลูไนตราซีแพมที่ถูกโปรโตเนต ทำให้ไม่สามารถแยกเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ที่มีฟลูไนตราซีแพมกับเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ที่ไม่มีฟลูไนตราซีแพมได้ ในขณะที่การตรวจวิเคราะห์ด้วยกระบวนการกระตุ้นเชิงแสง ซึ่งมีซิงค์ออกไซด์ทำหน้าที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาเชิงแสงและทำหน้าที่ในการดูดซับสีของเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ ทำให้สามารถแยกความแตกต่างของสมบัติเชิงแสงระหว่างตัวอย่างที่มีฟลูไนตราซีแพมและตัวอย่างที่ไม่มีฟลูไนตราซีแพมได้ โดยวัดการดูดกลืนแสงที่เปลี่ยนไปของสารละลายตัวอย่าง ในการตรวจพิสูจน์ฟลูไนตราซีแพมโดยการใช้ปฏิกิริยาโฟโตคะตะไลซิส ภายใต้การกระตุ้นด้วยแสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 360 นาโนเมตร และซิงค์ออกไซด์ 0.0080 กรัมต่อมิลลิลิตร เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาเชิงแสง ทำการฉายแสงอัลตราไวโอเลตแก่สารละลายตัวอย่างนาน 30 นาที โดยให้อุณหภูมิในขณะที่ฉายแสงอัลตราไวโอเลตประมาณ 80.0 องศาเซลเซียส ผลจากการเกิดปฏิกิริยาโฟโตคะตะไลซิส ทำให้สารฟลูไนตราซีแพมเปลี่ยนเป็น 7-aminoflunitrazepam ซึ่งเป็นอนุพันธ์หลักของฟลูไนตราซีแพม และเกิดการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 345 นาโนเมตร ซึ่งปฏิกิริยาโฟโตคะตะ-ไลซิสที่ใช้ในงานวิจัยนี้ สามารถตรวจวิเคราะห์ฟลูไนตราซีแพมที่ความเข้มข้นต่ำสุด 0.570 มิลลิกรัมต่อลิตร และจากสภาวะที่ใช้ในการตรวจพิสูจน์ฟลูไนตราซีแพมด้วยปฏิกิริยาโฟโตคะตะไลซิสในข้างต้น สามารถตรวจวิเคราะห์ฟลูไนตราซีแพมในเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ประเภทที่มีสีได้ ซึ่งผลของการตรวจวิเคราะห์ขึ้นอยู่กับชนิดและปริมาตรของเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ที่ทำการวิเคราะห์

จากงานวิจัยนี้สรุปได้ว่า เทคนิคทางโฟโตเคมี สามารถประยุกต์ใช้ในการตรวจพิสูจน์ฟลูไนตราซีแพมในเบื้องต้นได้ อีกทั้งมีวิธีการในการตรวจพิสูจน์ที่ไม่ยุ่งยาก ซับซ้อน เนื่องจากสามารถตรวจวิเคราะห์จากตัวอย่างได้ทันที ไม่ต้องผ่านกระบวนการสกัดสารก่อนทำการวิเคราะห์ สามารถใช้ได้ในห้องปฏิบัติการโดยทั่วไป เนื่องจากสารเคมีและเครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์ มีใช้โดยทั่วไปในห้องปฏิบัติการทางเคมีและสามารถจัดซื้อได้ง่าย นอกจากนี้วิธีการที่ใช้ในงานวิจัยนี้ ยังมีความรวดเร็วในการตรวจวิเคราะห์ โดยระยะเวลาที่ใช้ในการตรวจพิสูจน์ฟลูไนตราซีแพมในเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ ด้วยการโปรโตเนตชันและปฏิกิริยาโฟโตคะตะ-ไลซิส ใช้เวลาน้อยกว่า 1 ชั่วโมง และมีค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์ที่ต่ำกว่าบางเทคนิค เช่น ก๊าซโครมาโทรกราฟี แมสสเปกโทรสโกปีและการแยกของเหลวสมรรถนะสูง เป็นต้น ซึ่งค่าใช้จ่ายของสารเคมีต่อการวิเคราะห์ 1 ตัวอย่างน้อยมาก และงานวิจัยนี้เป็นผลการวิเคราะห์ที่เน้นการตรวจพิสูจน์ฟลูไนตราซีแพมโดยตรง อีกทั้งสามารถที่ตรวจพิสูจน์ฟลูไนตราซีแพมที่มีอยู่ในเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ได้โดยตรง ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่องานทางด้านการตรวจวิเคราะห์ในเบื้องต้น และอาจเป็นจุดเริ่มต้นสำหรับการพัฒนาชุดการตรวจพิสูจน์เบื้องต้น ที่สามารถตรวจพิสูจน์ยานอนหลับในเครื่องดื่มได้ต่อไป

4.2 การประยุกต์ใช้ในงานทางด้านนิติวิทยาศาสตร์

การตรวจพิสูจน์ยานอนหลับในงานทางด้านนิติวิทยาศาสตร์ โดยส่วนใหญ่เป็นการตรวจพิสูจน์จากวัตถุพยานที่เป็นชีววัตถุ เช่น เลือดและปัสสาวะ เป็นต้น ซึ่งมีขั้นตอนในการเก็บตัวอย่างค่อนข้างมาก และต้องใช้เทคนิคขั้นสูงในการตรวจพิสูจน์ เช่น เทคนิคแก๊สโครมาโทรกราฟี เทคนิคการแยกของเหลวสมรรถนะสูง เทคนิคแมสสเปกโทรสโกปี เป็นต้น ซึ่งเป็นเทคนิคที่ต้องใช้ผู้เชี่ยวชาญในการตรวจพิสูจน์ และยังไม่พบว่ามีนำเสนอการตรวจพิสูจน์สารฟลูไนตราซีแพมหรือยานอนหลับชนิดอื่นๆ ในเครื่องดื่ม ด้วยเทคนิคทางด้านโฟโตเคมี ซึ่งเป็นเทคนิคที่ง่ายและมีความรวดเร็วในการตรวจวิเคราะห์ การประยุกต์ใช้เทคนิคทางโฟโตเคมีเพื่อการตรวจพิสูจน์ฟลูไนตราซีแพมในงานทางด้านนิติวิทยาศาสตร์นั้น สามารถใช้ในการตรวจพิสูจน์เพื่อแยกวัตถุพยานในเบื้องต้นว่ามีสารฟลูไนตราซีแพมหรือไม่ ซึ่งเครื่องดื่มในที่เกิดเหตุสามารถนำมาใช้เป็นวัตถุพยานแวดล้อมประกอบคดีได้ และผลจากการวิจัยพบว่าสารมาตรฐานฟลูไนตราซีแพมและสารฟลูไนตราซีแพมจากยาเม็ดโรฮิปนอล ให้ผลการวิเคราะห์ที่ใกล้เคียงกันมาก แสดงว่าวิธีการตรวจพิสูจน์นี้ สามารถใช้ได้กับทั้งสารมาตรฐานฟลูไนตราซีแพมและยาเม็ดที่มีส่วนประกอบของฟลูไนตราซีแพม ช่วยให้เกิดความสะดวกและลดความซับซ้อนของการวิเคราะห์ผลในการตรวจพิสูจน์ตัวอย่างจริง

อย่างไรก็ตาม งานวิจัยนี้เป็นเพียงการนำเสนอวิธีการตรวจพิสูจน์ฟลูไนตราซีแพมในสารละลายตัวอย่างเครื่องดื่มแอลกอฮอล์เบื้องต้นเท่านั้น อีกทั้งมีความเป็นไปได้ที่อาจให้ผลเชิงบวกในการตรวจพิสูจน์ต่อยาชนิดอื่นได้เช่นกัน ดังนั้น เพื่อให้ผลของการตรวจพิสูจน์มีความแม่นยำยิ่งขึ้น ควรทำการตรวจพิสูจน์ตัวอย่างร่วมกับการใช้เทคนิคขั้นสูงอื่นๆ สำหรับขอบเขตการตรวจพิสูจน์ที่ได้มีการนำเสนอในงานวิจัยนี้ เป็นการตรวจพิสูจน์ฟลูไนตราซีแพมจากยาเม็ด Rohypnol® เฉพาะในเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ประเภทไม่มีสีและเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ประเภทมีสีที่ไม่ผสมเครื่องดื่มอื่นๆ (mixer) อย่างไรก็ตามจากงานวิจัยนี้ ทำให้มองเห็นประโยชน์จากเครื่องดื่มที่มีอยู่ในที่เกิดเหตุนั้น ที่จะสามารถนำมาใช้เพื่อการตรวจพิสูจน์หาสารที่ต้องสงสัยเพื่อใช้เป็นพยานแวดล้อมได้ และยังอาจเป็นแนวทางที่ก่อให้เกิดการพัฒนาเป็นชุดทดสอบเบื้องต้น (Test kid) ที่สามารถทดสอบสารในเครื่องดื่ม เพื่อความสะดวกในการใช้งานอันจะช่วยลดปัญหาอาชญากรรมที่เกิดจากการวางยาได้

4.3 ข้อเสนอแนะ

ในงานวิจัยชิ้นนี้ ยังมีบางประเด็นที่ยังไม่ได้ทำการวิเคราะห์ การนำวิธีการในงานวิจัยนี้ไปประยุกต์ใช้ อาจต้องคำนึงถึงปัจจัยอื่นๆที่ได้นำเสนอไว้ในข้อเสนอแนะ ดังต่อไปนี้

4.3.1 การทดสอบถึงการใช้ได้ของวิธีการที่ได้นำเสนอ กับตัวอย่างยาชนิดอื่นๆ ในกลุ่มเบนโซไดอะซีพีน ซึ่งมีโครงสร้างโมเลกุลหลักที่เหมือนกันกับฟลูไนตราซีแพม จึงมีความเป็นไปได้ที่ยาชนิดอื่นๆ นั้น จะให้ผลเชิงบวกต่อการวิเคราะห์ได้เช่นเดียวกันกัน

4.3.2 ในงานวิจัยนี้ สารฟลูไนตราซีแพมจากเม็ดยา เป็นการวิเคราะห์เฉพาะยาเม็ดในชื่อทางการค้าว่า โรฮิปนอล (Rohypnol®) เท่านั้น ซึ่งผลจากปัจจัยอื่นๆ ในเม็ดยาของบริษัทอื่นๆ ที่แตกต่างกัน อาจส่งผลต่อค่าการวิเคราะห์ได้

4.3.3 ความเสถียรของสารฟลูไนตราซีแพมที่ได้นำเสนอในงานวิจัยนั้น เป็นการเตรียมสารในตัวทำละลายเอทานอล 99.8% ซึ่งในตัวอย่างจริงที่ทำการทดสอบ องค์ประกอบอื่นๆ ที่ในเครื่องดื่ม หรือที่ได้มีการผสมไว้ในเครื่องดื่ม เช่น น้ำอัดลม น้ำมะนาว เป็นต้น รวมถึงสภาพแวดล้อมอื่นๆ เช่น อุณหภูมิ ความเสถียรของฟลูไนตราซีแพมอาจลดลงได้

4.3.4 ตัวอย่างเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ประเภทที่มีสี ที่ใช้ในงานวิจัยชิ้นนี้ เป็นตัวอย่างเหล้า ซึ่งในเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ที่มีสีนั้น ยังมีเครื่องดื่มชนิดอื่นๆ อีกหลากหลายชนิด เช่น ไวน์ น้ำผลไม้ที่มีการผสมแอลกอฮอล์ เป็นต้น อาจส่งผลต่อขีดความสามารถในการวิเคราะห์ของวิธีการที่ใช้ในงานวิจัยนี้

4.3.5 จากผลการวิจัย ที่มีความแตกต่างของผลการวิเคราะห์ขึ้นกับชนิดของเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ประเภทที่มีสี แสดงให้เห็นว่าองค์ประกอบที่มีในเครื่องดื่มส่งผลที่สำคัญต่อการวิเคราะห์ ดังนั้นปริมาตรของเครื่องดื่มที่มีในตัวอย่างย่อมส่งผลต่อการวิเคราะห์ด้วยเช่นกัน รวมถึงผลกระทบอื่นๆ ที่อาจมีการเติมเพิ่มในตัวอย่าง เช่น น้ำอัดลม การวิเคราะห์ในงานวิจัยนี้ จึงจำกัดปริมาตรของสารละลายตัวอย่างเครื่องดื่มแอลกอ-ฮอล์ประเภทไม่มีสีและประเภทที่มีสี ในการวิเคราะห์ที่ 1.00 และ 0.25 มิลลิลิตร ตามลำดับ หากในตัวอย่างมีปริมาตรของเครื่องดื่มแอลกอ-ฮอล์ที่สูงกว่านี้ อาจต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อปรับเปลี่ยนสภาวะในการวิเคราะห์ให้เหมาะสมยิ่งขึ้น

บรรณานุกรม

[1] กระบวนการ Photocatalytic. http://sichon.wu.ac.th/file/envi-shh-20090110-112240-pwrqR.pdf . (สืบค้นเมื่อ 12 กุมภาพันธ์ 2554)

[2] ข่าวเกษตร. 2553. 2 สาวพัทยาแสบ มอมรัสเซีย รูดทรัพย์กว่าล้าน. http://www.kasetnews.com/2%E0%B8%AA%E0%B8%B2%E0%B8%A7%E0%B8%9E%E0%B8%B1%E0%B8%97%E0%B8%A2%E0%B8%B2%E0%B9%81%E0%B8%AA%E0%B8%9A%E0%B8%A1%E0%B8%AD%E0%B8%A1%E0%B8%A3%E0%B8%B1%E0%B8%AA%E0%B9%80%E0%B8%8B%E0%B8%B5%E0%B8%A2.html (สืบค้นเมื่อ 3 เมษายน 2554)

[3] ข่าวสด. 2552. จับแขกขาวมอมยารูดทรัพย์. http://www.khaosod.co.th/view_news.php?newsid=TUROd01EVXdPREkyTVRFMU1nPT0=&sectionid=TURNek5RPT0=&day=TWpBd09TMHhNUzB5Tmc9PQ (สืบค้นเมื่อ 3 เมษายน 2554)

[4] คณะแพทย-ศาสตร์ศิริราชพยาบาล. 2554. *คู่มือการส่งตรวจทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์*. ศูนย์พิษวิทยา คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล http://www.si.mahidol.ac.th/th/manual/a07.htm?IdPdTmp=a07#07 (สืบค้นเมื่อ 30 เมษายน 2554)

[5] ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์สมุทรสงคราม. 2554. *คู่มือให้บริการศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์สมุทรสงคราม*. ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 4 สมุทรสงคราม. http://www.dmsc.moph.go.th/webroot/SamutSongkhram/service/rate%20analyze/พิษวิทยา.pdf (สืบค้นเมื่อ 30 เมษายน 2554)

[6] ทีมข่าวอาชญากรรม. 2550. ข่าวเด่น!! ปิดฉากคดี “หมอวิสุทธิ์”. http://www.manager.co.th/Crime/ViewNews.aspx?NewsID=9500000155156 (สืบค้นเมื่อ 3 เมษายน 2554)

[7] ธีรศักดิ์ โรจนธารา. 2551. *พื้นฐานการคำนวณในงานวิเคราะห์เชิงปริมาณ.* นครปฐม: เพชรเกษมการพิมพ์

[8] นภดล ไชยคำ. 2544. *เคมี เล่ม 2.* กรุงเทพฯ: แมคกรอ-ฮิล อินเตอร์เนชั่นแนล เอ็น-เตอร์ไพรส์

[9] นิพนธ์ และ คณิตา ตังคณานุรักษ์. 2547. สเปกโทรสโกปีด้านการวิเคราะห์. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

[10] ปิติ ทฤษฎีคุณ. 2527. ยาสงบประสาทและยานอนหลับ. สงขลา: ภาควิชาเภสัชวิทยา. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

[11] แม้น อมรสิทธิ์ และ อมร เพชรสม. 2539. *หลักการและเทคนิคการวิเคราะห์เชิงเครื่อง-มือ*. กรุงเทพฯ: ชวนพิมพ์

[12] ลาวัลย์ ศรีพงษ์. 2544. *การวิเคราะห์เชิงฟลูออโรเมตรี.* นครปฐม: มหาวิทยาลัย ศิลปากร วิทยาเขตพระราชวังสนามจันทร์

[13] สำนักงาน ป.ป.ส. 2546. การอนุญาตให้ผู้ประกอบวิชาชีพเวชกรรม ผู้ประกอบโรคศิลปะแผนปัจจุบันชั้นหนึ่งในสาขาทันตกรรม หรือผู้ประกอบการบำบัดโรคสัตว์ชั้นหนึ่ง มีวัตถุออกฤทธิ์ไว้ในครอบครอง ใน *รวมกฎหมายยาเสพติด พร้อมด้วย กฎกระทรวง ระเบียบ ข้อบังคับ ที่เกี่ยวข้อง*. เอกสารเผยแพร่ 1-10-2546 เลขมาตรฐานสากลหนังสือ (ISBN) : 974-7566-52-4. หน้า 329-331.

[14] ศิริชัย พงษ์วิชัย. 2540. *การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยคอมพิวเตอร์,* 9. กรุงเทพฯ: จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

[15] Amezon.com. IScreen-Benzodiazepines (BZO) Urine Drug Test Kit. http://www.amazon.com/iScreen-Benzodiazepines-BZO-Urine-Drug/dp/B002EDYNPY/ref=sr_1_5?ie=UTF8&qid=1304586330&sr=8-5 (Accessed 28/04/11)

[16] Barnett, J. M. and Broad, R. M. 2003. Flunitrazepam used in a case of poisoning. *Journal of Clinical Forensic Medicine.* 10: 89-91.

[17] Bishop, S. C., Lerch, M. and McCord, B. R. 2007. Detection of nitrated benzodiazepines by indirect laser-induced fluorescence detection on a microfluidic device. *Journal of chromatography* A. 1154: 481-484.

[18] Bruyne, M. M. A., Sinnema A. and Verweij, A. M. A. 1984. *Forensic Science International.* 24: 125-135.

[19] Cirimele, V., Kintz, P., Staub, C. and Mangin, P. 1997. Testing human hair for flunitrazepam and 7-amino-flunitrazepam by GC/MS-NC1. *Forensic Science International.* 84: 189-200.

[20] Cossi, M., Barone, V., Cammi, R. and Tomasi, J. 1996. *Chem.Phys.Lett.* 255: 327-335.

[21] Daderman, A. M. and Edman, G. 2001. Flunitrazepam abuse and personality characteristics in male forensic psychiatric patients. *Psychiatry Research*. 103: 27- 42.

[22] Daderman, A. M., Strindlund, H., Wiklund, N., Fredriksen, S.-O. and Lidberg, L. 2003. The importance of a urine sample in persons intoxicated with flunitrazepam-legal issues in a forensic psychiatric case study of a serial murderer. *Forensic Science International.* 137: 21-27.

[23] Drug testing world. Benzodiazepines Tests. http://www.drugtestingworld.com/benzodiazepines-tests-c-48.html (Accessed 28/04/11)

[24] Druid, H., Holmgren, P. and Ahlner, J. 2001. Flunitrazepam: an evaluation of use, abuse and toxicity. *Forensic Science International*. 122: 136-141.

[25] Elian, A. A. 1999. Detection of low levels of flunitrazepam and its metabolites in blood and bloodstains. *Forensic Science International.* 101: 107-111.

[26] Evgenidou, E., Fytianos, K. and Poulios, I. 2005. Semiconductor-sensitized photodegradation of dichlorvos in water using TiO_2 and ZnO as catalysts. *Applied Catalysis B: Environmental*. 59: 81-89.

[27] Frisch, M. J., Trucks, G. W., Schlegel, H. B., Scuseria, G. E., Robb, M. A., Cheeseman, J. R. and Scalmani G. *et al*. 2009, *Gaussian*, Inc., Wallingford CT.

[28] Givens, R. S., Gingrich, J. and Mecklenburg, S. 1986. Photochemistry of flunitrazepam : a product and model study. *International Journal of Pharmaceutics*. 29: 67-72.

[29] Hackett, J. and Elian, A. A. 2006. Extraction and analysis of flunitrazepam/7-aminoflunitrazepam in blood and urine by LC-PDA and GC-MS using butyl SPE columns. *Forensic Science International*. 157: 156-162.

[30] Housecroft, C. E. and Constable, E. C. 2006. Acid-base equilibria *In Chemistry* vol.III, pp. 495-500. England. Ashford Colour Press

[31] Kintz, P., Villain, M., Concheiro, M. and Cirimel, V. 2005. Screening and confirmatory method for benzodiazepines and hypnotics in oral fluid by LC-MS/MS. *Forensic Science International.* 150: 213–220.

[32] Kollroser, M. and Schober, C. 2002. Simultaneous analysis of flunitrazepam and its major metabolites in human plasma by high performance liqid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.* 28: 1173–1182.

[33] Lunardi, C. N., Bonilha, J. B. S. and Tedesco, A. C. 2002. Stern-Volmer quenching and binding constants of 10-alkyl-9(10H)-acridone probe in SDS and BSA. *Journal of Luminescence*. 99: 61-71.

[34] Mahjoub, A. E. and Staub, C. 2001. High-performance liquid chromate-graphy determination of flunitrazepam and its metabolites in plasma by use of column-switching technique: comparison of two extraction columns. *Journal of Chromatography* B. 754: 271–283.

[35] Malanciuc, C., Arama, C., Saramet, I., Monciu, C. - M., Nedelcu, A. and Constantinesu, C. 2009. Analytic al characterization of flunitrazapam. *Farmacia*. 57 (2): 167-183.

[36] Miertus, S., Scrocco, E. and Tomasi, J. 1996. *Chem.Phys.Lett*. 255: 327-335.

[37] Miertus, S., and Tomasi, J. 1982. *Chem.Phys.* 65: 239-252.

[38] Miller, N. S. and Gold, M. S. 1995. *Pharmacological therapies for drug & alcohol addictions*. New York. Marcel Dekker.

[39] Mintzer, M. Z. and Griffiths, R. R. 1998. Flunitrazepam and triazolam: a comparison of behavioral effects and abuse liability. *Drug and Alcohol Dependence* 53: 49-66.

[40] Mthai. 2010. แจ้งจับสาวมอมยา-ดูดปทุมถันถึงสลบ. http://news.mthai.com/general-news/65400.html (สืบค้นเมื่อ 3 เมษายน 2554)

[41] O'Boyle, N. M., Tenderholt, A. L. and Langner, K. M. 2008. *J. Comp. Chem.* 29: 839-845.

[42] Ohshima, T. 2006. A case of drug-facilitated sexual assault by the use of flunitrazepam. *Journal of Clinical Forensic Medicine*. 13: 44-45.

[43] Olsen, V., Gustavsen, I., Bramness, J. G., Hasvold, I., Karinen, R., Christophersen A. S. and Morland J. 2005. The concentrations, appearance and taste of nine sedating drugs dissolved in four different beverages. *Forensic Science International.* 151: 171–175.

[44] Procopio J. R., Hernandez, P., Sevilla, M. T. and Hernandez, L. 1986. Determinacion de flunitrazepam en preparados farmaceuticos mediante fluorescencia native. *Anales de Quimica* 82: 317-321.

[45] Rasanen, I., Neuvonen, M., Ojanpara, I. and Vuori, E. 2000. Benzodiazepine findings in blood and urine by gas chromatography and immunoassay. *Forensic Science International.* 112: 191-200.

[46] Rehman, S., Ullah, R., Butt, A.M. and Gohar, N.D. 2009. Strategies of making TiO_2 and ZnO visible light active. *Journal of Hazardous Materials.* 170: 560-569.

[47] Schechter, M. D. 1998. Rohypnol ("Roofies") control of drug discrimination: effect of coadministered ethanol or flumenazil. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 59: 19–25.

[48] Smink, B. E., Brandsma, J. E., Dijkhuizen, A., Lusthof, K. J., Gier, J. J., Egberts, A. C. G. and Uges, D. R. A. 2004. Quantitative analysis of 33 benzodiazepines, metabolites and benzodiazepine-like substances in whole blood by liquid chromatography–(tandem) mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*. 811: 13-20.

[49] Stark, M. M. and Wells, D. 1999. Drug-mediated sexual assault. *Journal of Climical forensic Medicine*. 6: 53-55.

[50] Tejedor, A.M. G., Hernando, P. F. and Alegría, J.S. D. 2007. A rapid fluorimetric screening method for the 1,4-benzodiazepine: Determination of their metabolite oxazepam in urine. *Analytica Chimica Acta*. 591: 112-115.

[51] Yanai, T., Tew, D. P. and Handy, N. C. 2004. *Chem.Phys.Lett*. 393: 51-57.

[52] Yegles, M., Mersch, F.and Wennig, R. 1997. Detection of benzodiazepine and other psychotropic drugs in human hair by GC/MS. *Forensic Science International*. 84: 211-218.

[53] Yuranova, T., Laub, D.and Kiwi, J. 2007. Synthesis, activity and characterization of textiles showing self-clening activity under daylight irradiation. *Catalysis Today.* 122: 109-117.

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล นางสาวศิรินทิพย์ ผ่องอำไพ

รหัสประจำตัวนักศึกษา 5010220135

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตรบัณฑิต (ผลิตกรรมชีวภาพ) เกียรตินิยมอันดับสอง	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2548

ทุนการศึกษา (ที่ได้รับระหว่างการศึกษา)

1 ปีการศึกษา 2550 – 2551 ได้รับทุนผู้ช่วยนักวิจัย จากคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

2 ปีการศึกษา 2550 – 2552 ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัย จากบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์