

ปริมาณสารแคนนาบินอยด์ในระยะการเจริญเติบโต ที่แตกต่างกันของใบกัญชาพันธุ์ไทย

สรเพชร มาสุต¹ ธนวัฒน์ ทองจีน¹ กรวิชัย สมคิด¹ ภาณุวิชญ์ พูลทรัพย์¹ ปภาวดี สุนันทบุตร¹
กชพร โชติมนธธรรม¹ ทิพวรรณ ปรีกมานนท์¹ ราตรี พระนคร² วรรณวิภา พันธะ² พิเชฐ บัญญัติ¹
และศิริวรรณ ชัยสมบูรณ์พันธ์¹

¹กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ อำเภอเมือง นนทบุรี 11000

²มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี วิทยาเขตสกลนคร อำเภอพังโคน สกลนคร 47160

บทคัดย่อ กัญชามีสารหลักเป็นกลุ่มแคนนาบินอยด์ โดยสารที่มีฤทธิ์ต่อจิตประสาท คือ THC และสารที่ไม่ออกฤทธิ์ต่อจิตประสาท ได้แก่ CBN และ CBD ซึ่งกลุ่มสารแคนนาบินอยด์มักพบในช่อดอกของกัญชาและยังสามารถพบได้ในส่วนของใบอีกด้วย การนำใบกัญชาไปใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ยังไม่มีข้อมูลสัดส่วนของสารสำคัญที่ชัดเจนโดยเฉพาะกัญชาพันธุ์ไทย ดังนั้นในการศึกษานี้ได้ทำการตรวจปริมาณสารแคนนาบินอยด์ด้วยวิธี Ultra High Performance Liquid Chromatography (UHPLC) ในระยะการเจริญเติบโตของใบที่ต่างกัน ได้แก่ ในระยะใบอ่อน ใบเพสลาด และใบแก่ของกัญชาไทย 4 พันธุ์ ได้แก่ ทางกระรอกภูพานเอสที1 (ST1) ทางเสือสกลนครทีที1 (TT1) ตะนาวศรีก้านขาวดับเบิลยูเอ1 (WA1) และตะนาวศรีก้านแดงอาร์ดี1 (RD1) พบว่าใบเพสลาดของกัญชาอายุ 2 เดือน พันธุ์ ST1 และ RD1 มีน้ำหนักต่อใบทั้งใบสดและใบแห้งสูงกว่าพันธุ์อื่น และพบว่าพันธุ์ RD1 มีความยาวก้านใบในช่วงใบเพสลาดและใบแก่มากกว่าพันธุ์อื่น ส่วนความยาวและความกว้างของใบมีค่าไม่แตกต่างกัน นอกจากนี้พบสาร THC มีปริมาณสูงสุดในระยะใบอ่อนของใบกัญชาอายุ 2 เดือน ส่วนปริมาณสาร CBD พบสูงสุดในใบอ่อนของพันธุ์ RD1 ถึงร้อยละ 3.83 โดยน้ำหนัก ที่อายุ 1 เดือน ส่วนปริมาณสาร CBN พบในใบค่อนข้างน้อย ข้อมูลนี้ช่วยในการนำใบกัญชาพันธุ์ไทยไปใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ได้อย่างเหมาะสม รวมทั้งการพัฒนาพันธุ์กัญชาเพื่อเพิ่มมูลค่าของใบกัญชาทางเศรษฐกิจ

คำสำคัญ: กัญชา, พันธุ์, สารแคนนาบินอยด์

Corresponding author E-mail: Sorrapetch.m@dmsc.mail.go.th

Received: 15 July 2021

Revised: 3 September 2021

Accepted: 7 September 2021

บทนำ

กัญชา เป็นพืชล้มลุกชนิดหนึ่ง อยู่ในวงศ์ Cannabidaceae มีส่วนประกอบของสารเคมีมากกว่า 450 ชนิด โดยมากกว่า 60 ชนิด เป็นสารกลุ่มแคนนาบินอยด์ (cannabinoids) มีองค์ประกอบหลักคือ Tetrahydrocannabinol (THC) และสารชนิดอื่น ๆ เช่น Cannabinol (CBN), Cannabidiol (CBD), Cannabichromene (CBC), Cannabigerol (CBG) เป็นต้น^(1, 2) ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 424) พ.ศ. 2564 เรื่อง กำหนดอาหารที่ห้ามผลิต นำเข้า หรือจำหน่าย ลงวันที่ 25 กุมภาพันธ์ 2564 ได้ปลดล็อกกัญชา-กัญชง จากบัญชียาเสพติดให้โทษ รวมถึงการอนุญาตให้นำใบซึ่งไม่มียอดหรือช่อดอกติดมาด้วย กิ่ง ก้าน ราก เปลือก ลำต้น เส้นใย ที่ไม่จัดเป็นยาเสพติดประเภทที่ 5 มาใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ การศึกษาวิจัย ผลิตภัณฑ์สุขภาพ รวมทั้งให้ประชาชนสามารถใช้ส่วนต่างๆ ของกัญชา-กัญชงไปประกอบอาหาร ทำยารักษาโรคได้⁽³⁾ ซึ่งปัจจุบันสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาได้ออกใบอนุญาตปลูกกัญชาสำหรับองค์กรต่าง ๆ ไปแล้วจำนวน 2,210 ราย มีผู้ปลูกกัญชาทั้งพันธุ์ต่างประเทศและพันธุ์ไทย อย่างไรก็ตามกัญชาพันธุ์ไทยยังไม่มีข้อมูลชัดเจนในเรื่องของสายพันธุ์โดยทางสถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ร่วมกับมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี วิทยาเขตสกลนคร ได้ทำการศึกษากัญชาพันธุ์ไทยจำนวน 4 พันธุ์ ได้แก่ ทางกระรอกภูพานเอสที1 ทางเสือสกลนครทีที1 ตะนาวศรีก้านขาวดับเบิลยูเอ1 และตะนาวศรีก้านแดงอาร์ดี1 โดยทำการศึกษาทั้งลักษณะฟีโนไทป์ จีโนไทป์ และเคมีไทป์ในส่วนของช่อดอก ซึ่งได้ขึ้นทะเบียนพันธุ์กับกรมวิชาการเกษตร พบว่ากัญชาพันธุ์ไทย 4 พันธุ์ มีลักษณะเด่นถึง 3 แบบ แบบที่ 1 เป็นกัญชาที่ให้สาร THC สูง ได้แก่ พันธุ์ WA1 และ TT1 แบบที่ 2 เป็นกัญชาที่ให้สาร THC และ CBD ในอัตราส่วนที่เท่ากัน (THC : CBD = 1 : 1) ได้แก่ พันธุ์ ST1 และกัญชาแบบที่ 3 ที่ให้สาร CBD สูง ได้แก่ พันธุ์ RD1 เมื่อได้พันธุ์ที่ถูกต้องแล้วจะสามารถนำไปส่งเสริมให้กับเกษตรกร วิสาหกิจชุมชนต่างๆ นำไปปลูกได้และนำส่วนต่างๆ ของกัญชา (ยกเว้นช่อดอกและเมล็ด) ไปใช้ประโยชน์ได้ โดยเฉพาะ “ใบ”

ใบกัญชาเป็นส่วนประกอบหนึ่งของกัญชาที่มีสารสำคัญในกลุ่ม Cannabinoids อยู่ โดยสารที่เป็นที่รู้จักกันดีคือ THC, CBD และ CBN ซึ่งเป็นสารออกฤทธิ์ กระตุ้นระบบประสาท ฮอโมน และภูมิคุ้มกันต่างๆ มีการใช้ประโยชน์ของใบกัญชาในการประกอบอาหาร เพื่อให้ได้รสชาติที่ดีขึ้นและใช้เป็นส่วนประกอบในการผลิตยาแผนโบราณหลายตำรับ เช่น ยาอัคคินิวคณะ ยาสุไสยาสน์ ยาแก้สัณห์ฆาตกล่อนแห้ง ยาแก้โรคจิต ยาอัมฤตโอสถ ยาไพสาลี ยาโกลยาสาลี ยาทำลายพระสุเมรุ และยาทัพยาคูณ เป็นต้น⁽⁴⁾ ซึ่งการนำใบกัญชามาใช้ประกอบอาหารและเป็นส่วนประกอบการผลิตยาแผนโบราณหลายตำรับยังไม่มีข้อมูลสำคัญและยังไม่ทราบชนิดของพันธุ์กัญชาที่นำมาใช้ งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาระยะการเจริญเติบโตของใบต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณสาร cannabinoid ของกัญชาไทย 4 พันธุ์ เพื่อหาปริมาณสารสำคัญที่อยู่ในใบและสามารถนำใบกัญชาพันธุ์ไทยของแต่ละพันธุ์ไปใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ได้อย่างเหมาะสม รวมถึงเป็นข้อมูลในการพัฒนาพันธุ์กัญชาเพื่อเพิ่มมูลค่าของใบกัญชาทางเศรษฐกิจต่อไป

วัสดุและวิธีการ

วัสดุ

ตัวอย่างเมล็ดพันธุ์กัญชาไทยที่ใช้ในการศึกษา 4 พันธุ์ ได้แก่ ทางกระรอกภูพานเอสที1 (ST1) ทางเสือสกลนครทีที1 (TT1) ตะนาวศรีก้านขาวดับเบิลยูเอ1 (WA1) และตะนาวศรีก้านแดงอาร์ดี1 (RD1) ซึ่งทั้ง 4 พันธุ์มีการศึกษาวิจัยทางด้านลักษณะทางพฤกษศาสตร์ เคมี และพันธุกรรมแล้ว เป็นจำนวน 3 รุ่น ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2562 โดยได้รับใบอนุญาตปลูกตามแบบ ย.ส. 4/5-2 หนังสือสำคัญที่ 4/2562 ปลูกโดยมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี วิทยาเขตสกลนคร ทำการวิจัยร่วมกับกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ปัจจุบันทำการปลูกเป็นรุ่นที่ 4 ณ สถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ โดยได้รับใบอนุญาตปลูกตามแบบ ย.ส. 4/5-2 หนังสือสำคัญที่ 90/2564 จำนวน 130 ต้น

วัสดุปลูก ได้แก่ พืชมอส (คลาสแมน®), โคโคพีท (บริษัทโคโค อะกรีคัลเจอร์ จำกัด), เวอร์มิคูไลท์ (บริษัท Speedy access) ขนาด 2-4 มิลลิเมตร, เพอร์ไลท์ (บริษัท Speedy access) 4-8 มิลลิเมตร, กาบมะพร้าวสับ, ปุ๋ยไฮโดรโปนิกส์ (สูตรที่ 1 สำหรับเร่งการเจริญเติบโตทางด้านลำต้น และสูตรที่ 2 สำหรับเร่งการออกดอก), กระจก ขนาด 24 นิ้ว

สารมาตรฐาน ได้แก่ Cannabidiol (CBD) ความบริสุทธิ์ $\geq 99.9\%$ (THC Pharm GmbH, Batch : S19-014) มีลักษณะเป็นผงสีขาว, Cannabinol (CBN) ความบริสุทธิ์ $\geq 99.6\%$ (THC Pharm GmbH, Batch : DWO180.707-1) มีลักษณะเป็นผงสีขาว, Tetrahydrocannabinol (THC) ความบริสุทธิ์ $\geq 98.6\%$ (THC Pharm GmbH, Batch : DWO181.121-1) มีลักษณะเป็นของเหลวใส

สารเคมีและตัวทำละลาย ได้แก่ ethanol และ hexane (AR grade, RCI Labscan, Ireland), methanol (HPLC grade, Honeywell, United States of America), acetonitrile (HPLC grade, Fisher Chemical, England), น้ำปราศจากอิออน (deionized water)

เครื่องมือ ได้แก่ ตู้อบแห้ง (Hot air oven) Memmert® รุ่น ULM 600, เครื่องวัดความเป็นกรด - ด่าง (pH meter) Gendo® รุ่น PL-700 PCS, เครื่องบดปั่น รุ่น RT 34 (ChyunTseh Industrial), เครื่องระเหยสุญญากาศ ประกอบด้วย อ่างน้ำแบบควบคุมอุณหภูมิรุ่น SB-1000 (Eyela), เครื่อง rotavapor รุ่น N-1000 (Eyela), เครื่อง Aspirator รุ่น A-3S (Eyela) และเครื่องทำน้ำเย็นหมุนเวียน รุ่น CA-101 (Eyela), เครื่อง Ultra High Performance Liquid Chromatography-DAD detector (Agilent 1290 Infinity II, Germany), เครื่องชั่งไฟฟ้าความละเอียด 4 ตำแหน่ง (Precisa Analytical Balance, Switzerland), เครื่องวัดความยาว (vernier calipers)

วัสดุวิทยาศาสตร์ ได้แก่ คอลัมน์ชนิด ARC-18 ขนาด 4.6×150 มิลลิเมตร ขนาดอนุภาค 2.7 ไมโครเมตร (Restek, United States of America), PVDF membrane filter 0.2 ไมโครเมตร และ 0.45 ไมโครเมตร, Nylon filter syringe 0.2 ไมโครเมตร, กระจกทรงเบอร์ 4 และเครื่องแก้ว

วิธีการปลูก

ดำเนินการปลูกกัญชาในโรงเรือนแบบ Green House ขนาดกว้าง 6 เมตร ยาว 36 เมตร และสูง 2.8 เมตร ตามมาตรฐานการปลูกและการเก็บเกี่ยวที่ดีของพืชสมุนไพร Good Agricultural Practices (GAP) ใช้วัสดุปลูกประกอบด้วย กาบมะพร้าวสับ พืชมอส เพอร์ไลท์ เวอร์มิคูไลท์ โคโคพีท ในอัตราส่วน 2 : 1 : 1 : 1 : 1 ตามลำดับ นำมาผสมให้เข้ากัน ตรวจวิเคราะห์โลหะหนักในดินก่อนปลูกพบว่าอยู่ในเกณฑ์มาตรฐาน การปลูกมีการจัดการให้น้ำและธาตุอาหาร โดยใช้ปุ๋ยไฮโดรโปนิกส์ จำนวน 2 สูตร คือ

สูตรที่ 1 สำหรับเร่งการเจริญเติบโตทางด้านลำต้น เริ่มให้ปุ๋ยตั้งแต่เริ่มปลูกจนกระทั่งต้นกัญชาอายุครบ 1 เดือน

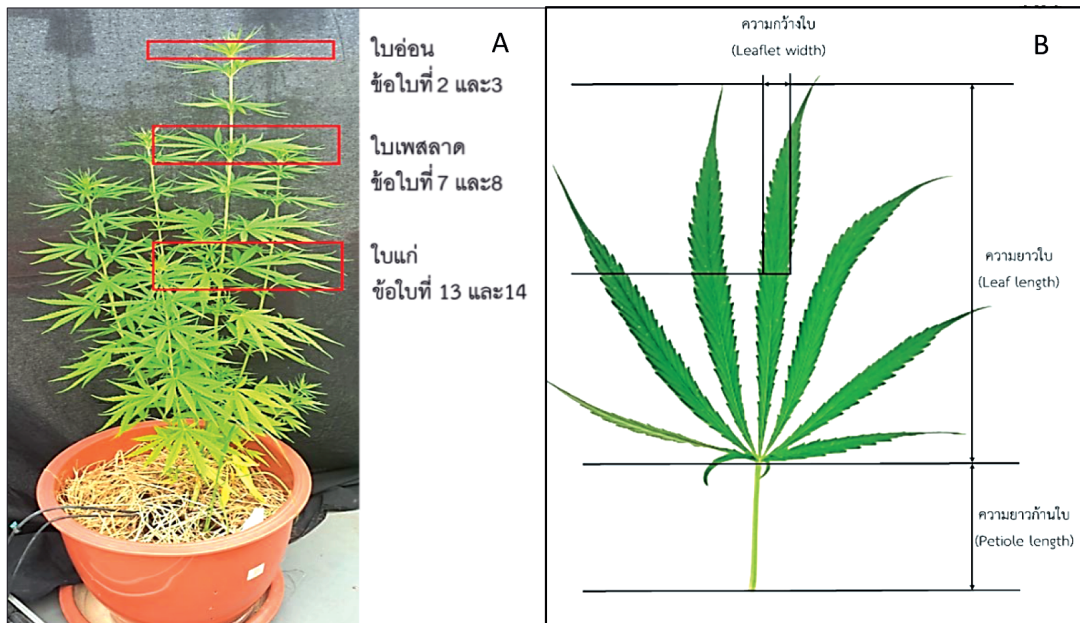
สูตรที่ 2 สำหรับเร่งการออกดอก เริ่มให้ปุ๋ยเมื่อต้นกัญชาอายุได้ 1 เดือน จนถึงระยะออกดอก

วิธีให้ปุ๋ยโดยระบบน้ำหยด (Drip irrigation) มีการปรับสภาพค่า pH และการนำไฟฟ้าของธาตุอาหาร เพื่อให้ได้ค่าที่เหมาะสมต่อการเจริญของต้นกัญชาในแต่ละช่วงของการเจริญเติบโต วางแผนการทดลองการปลูกกัญชาแต่ละพันธุ์แบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design; CRD)⁽⁵⁾ ประกอบด้วยกัญชา 4 พันธุ์ 1 ต้น ต่อ 1 กระจก ดังนี้

กัญชาพันธุ์ที่ 1	หางกระรอกภูพานเอสที 1 (ST1)	จำนวน 22 ต้น
กัญชาพันธุ์ที่ 2	หางเสือสกลนครที 1 (TT1)	จำนวน 22 ต้น
กัญชาพันธุ์ที่ 3	ตะนาวศรีก้านขาวดับเบิลยูเอ 1 (WA1)	จำนวน 22 ต้น
กัญชาพันธุ์ที่ 4	ตะนาวศรีก้านแดงอาร์ดี 1 (RD1)	จำนวน 22 ต้น

การศึกษาการเจริญเติบโตของใบอ่อน (young leaves) ใบเพสลาด (Immature leaves) และใบแก่ (mature leaves) ของกัญชา 4 พันธุ์

โดยสุ่มเก็บตัวอย่างใบกัญชาไทย 4 พันธุ์ เมื่อต้นกัญชาอายุได้ 1 และ 2 เดือน หลังปลูก โดยแต่ละพันธุ์เก็บ ใบอ่อนจำนวน 20 ใบ (ตำแหน่งข้อใบที่ 2 และข้อที่ 3 จากปลายยอด) ใบเพสลาด 20 ใบ (ตำแหน่งข้อใบที่ 7 และข้อที่ 8 จากปลายยอด) และใบแก่ 20 ใบ (ตำแหน่งข้อใบที่ 13 และข้อที่ 14 จากปลายยอด) ดังแสดงในภาพภาพที่ 1 ทำการวัดน้ำหนักใบสด น้ำหนักใบแห้งโดยอบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง ความกว้างใบ ความยาวใบ และความยาวของก้านใบ ใช้ไม้บรรทัด และ vernier calipers ในการวัด ดังแสดงในภาพที่ 1



ภาพที่ 1 ตำแหน่งของใบอ่อน ใบแก่ และใบเพสลาด (A) ความกว้างใบ ความยาวใบ และความยาวของก้านใบ (B) ของกัญชาพันธุ์ไทยที่ใช้ในการเก็บตัวอย่าง

การศึกษาปริมาณสารแคนนาบินอยด์ของใบกัญชาไทย 4 พันธุ์

ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างใบกัญชาทั้งใบอ่อน ใบเพสลาด และใบแก่ ของแต่ละพันธุ์ที่ปลูกจำนวน 20 ต้น จากต้นกัญชาที่มีอายุได้ 1 และ 2 เดือน หลังปลูก ให้ได้ประมาณ 20 กรัมต่อน้ำหนักสด นำใบที่เก็บได้มาอบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อแห้งแล้วนำมาบดให้ละเอียด ทำการชั่งตัวอย่างใบกัญชาจำนวน 1,000 มิลลิกรัม นำมาสกัดตัวอย่างด้วย ethanol 95% ปริมาตร 40 มิลลิลิตร ด้วยวิธี reflux เป็นเวลา 60 นาที จากนั้นนำมากรอง และนำสารสกัดที่ได้มาระเหยแห้ง จากนั้นละลายกลับและปรับปริมาตรด้วย methanol จนครบ 50 มิลลิลิตร โดยใช้ volumetric flask นำสารละลายตัวอย่าง 5 ไมโครลิตร มาวิเคราะห์ด้วยเครื่อง UHPLC ตรวจวิเคราะห์หาปริมาณของสารกลุ่มแคนนาบินอยด์ ได้แก่สาร THC CBD และ CBN มีขั้นตอนดังนี้

การเตรียมสารละลายมาตรฐาน CBD CBN และ THC โดยนำสารมาตรฐาน CBD CBN และ THC มาชั่งน้ำหนักให้ได้ 10, 25 และ 100 มิลลิกรัม ละลายและปรับปริมาตรด้วย methanol ให้ได้ 10, 25 และ 50 มิลลิลิตร ด้วย volumetric flask ตามลำดับ จะได้ stock สารละลายมาตรฐาน CBD CBN และ THC ที่ความเข้มข้น 1,000 1,000 และ 2,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ จากนั้นปิเปตสารละลายมาตรฐาน ปริมาตร 1,000, 1,000 และ 500 ไมโครลิตร ตามลำดับ ใส่ใน volumetric flask ขนาด 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย methanol ได้ความเข้มข้น 1, 10, 20, 50 และ 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร นำไปสร้างกราฟมาตรฐานต่อไป

สภาวะของระบบโครมาโทกราฟี : วัฏภาคคงที่ (stationary phase) ใช้ UHPLC column ชนิด ARC-18 ขนาด 4.6×150 มิลลิเมตร ขนาดอนุภาค 2.7 ไมโครเมตร อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส, วัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase) A: 0.1% ortho-phosphoric acid ในน้ำ B: 0.1% ortho-phosphoric acid ใน acetonitrile

การเตรียม 0.1% ortho-phosphoric acid ในน้ำกลั่น (deionized water) : ปิเปต 0.1% ortho-phosphoric acid ปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร ลงในน้ำกลั่น และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น ให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร

การเตรียม 0.1% ortho-phosphoric acid ใน acetonitrile : ปิเปต 0.1% ortho-phosphoric acid ปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร ลงใน acetonitrile และปรับปริมาตรด้วย acetonitrile จนครบ 1,000 มิลลิลิตร

ปริมาตรการฉีด 5 ไมโครลิตร, อัตราการไหล 1.5 มิลลิลิตร/นาที, ตรวจวัดสาร Diode array detector (DAD) ที่ความยาวคลื่น 220 นาโนเมตร

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรม SPSS version 16.0 ทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT)⁽⁶⁾ ที่ระดับนัยสำคัญ $p < 0.01$

ผล

การศึกษาระยะการเจริญของกัญชาพันธุ์ไทย 4 พันธุ์ ที่อายุ 1 เดือนหลังปลูก

ผลจากการศึกษาระยะการเจริญของกัญชาพันธุ์ไทย 4 พันธุ์ ที่อายุ 1 เดือน หลังปลูก ในระยะใบอ่อนพบว่า กัญชาพันธุ์ทางกระรอกภูพานเอสที1 (ST1) มีน้ำหนักใบสดต่อใบเท่ากับ 0.985 กรัม ซึ่งมากกว่าพันธุ์อื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) ดังแสดงในตารางที่ 1 รองลงมา คือ พันธุ์ตะนาวศรีก้านแดงอาร์ดี1 (RD1) มีน้ำหนักใบสดต่อใบเท่ากับ 0.770 กรัม ในขณะที่น้ำหนักใบแห้งพันธุ์ RD1 และ ST1 มีน้ำหนักใบแห้งต่อใบมากที่สุดเท่ากับ 0.224 และ 0.221 กรัม ตามลำดับ แตกต่างจากพันธุ์ตะนาวศรีก้านขาวดับเบิลยูเอ1 (WA1) และพันธุ์ทางเสือสกลนครที่ที1 (TT1) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$)

ความยาวใบพบว่าพันธุ์ TT1 RD1 และ ST1 มีค่าเท่ากับ 8.66, 8.58 และ 8.18 เซนติเมตร ตามลำดับ ซึ่งไม่แตกต่างกัน ส่วนพันธุ์ WA1 มีความยาวใบสั้นที่สุด มีค่าเท่ากับ 7.35 เซนติเมตร ความกว้างของใบพบว่าพันธุ์ TT1 และ WA1 มีความกว้างของใบมากที่สุดและแตกต่างจากพันธุ์อื่น ซึ่งมีค่าเท่ากับ 1.00 และ 0.87 เซนติเมตร ตามลำดับ ในส่วนความยาวก้านใบพบว่า พันธุ์ ST1 มีความยาวก้านใบมากกว่าพันธุ์อื่น ๆ มีค่าเท่ากับ 1.05 เซนติเมตร ดังแสดงในตารางที่ 1 และภาพที่ 2 ในระยะใบเพสลาด พบว่ากัญชาพันธุ์ ST1 TT1 และ RD1 มีน้ำหนักใบสดเท่ากับ 1.790, 1.781 และ 1.633 กรัม มากกว่าพันธุ์ WA1 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) ในขณะที่น้ำหนักใบแห้งพบว่าพันธุ์ RD1 และ ST1 มีน้ำหนักใบแห้งต่อใบมากที่สุดเท่ากับ 0.454 และ 0.443 กรัม ตามลำดับ แตกต่างจากพันธุ์ WA1 และพันธุ์ TT1 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) ความยาวใบพบว่าพันธุ์ TT1 WA1 และ ST1 มีค่าเท่ากับ 17.13, 16.87 และ 15.39 เซนติเมตร ตามลำดับ ไม่แตกต่างกัน ส่วนพันธุ์ RD1 มีความยาวใบสั้นที่สุด มีค่าเท่ากับ 14.35 เซนติเมตร

ความกว้างของใบพบว่าพันธุ์ WA1 มีความกว้างใบมากที่สุดเท่ากับ 2.89 เซนติเมตร ซึ่งแตกต่างจากพันธุ์อื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) และในส่วนความยาวก้านใบพบว่า พันธุ์ WA1 มีความยาวก้านใบมากกว่าพันธุ์อื่น ๆ โดยมีค่าเท่ากับ 5.36 เซนติเมตร ดังแสดงในตารางที่ 1 และภาพที่ 2 ในระยะใบแก่ พบว่ากัญชาพันธุ์ ST1 มีน้ำหนักใบสดมากที่สุดซึ่งมีค่าเท่ากับ 1.832 กรัม โดยมากกว่าพันธุ์อื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) อีกทั้ง

ยังพบว่าพันธุ์ ST1 มีน้ำหนักใบแห้งต่อใบมากที่สุดเท่ากับ 0.406 กรัม ซึ่งไม่แตกต่างจากพันธุ์ TT1 และพันธุ์ WA1 ที่มีน้ำหนักใบแห้งต่อใบเท่ากับ 0.402 และ 0.362 กรัม ตามลำดับ

ความยาวของใบพบว่าพันธุ์ WA1 และ RD1 มีความยาวใบไม่แตกต่างกัน โดยมีค่าเท่ากับ 14.02 และ 13.32 เซนติเมตร ตามลำดับ ความกว้างของใบพบว่าพันธุ์ TT1 และพันธุ์ RD1 มีความกว้างใบมากที่สุดเท่ากับ 1.89 และ 1.70 เซนติเมตร ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างจากพันธุ์อื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) และในส่วนของความยาวก้านใบพบว่า พันธุ์ WA1 และ ST1 มีความยาวก้านใบมากกว่าพันธุ์อื่นๆ มีค่าเท่ากับ 4.59 และ 4.37 เซนติเมตร ตามลำดับ แตกต่างจากพันธุ์ RD1 และ TT1 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) ดังแสดงในตารางที่ 1 และภาพที่ 2

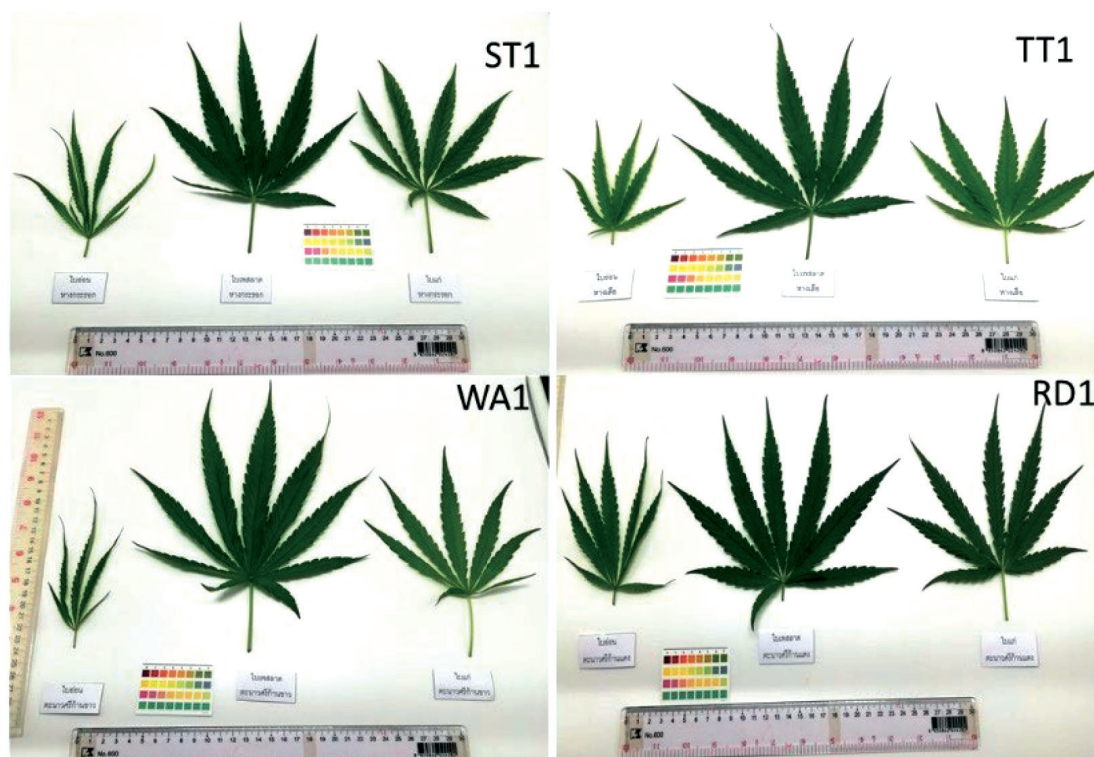
ตารางที่ 1 น้ำหนักใบสด น้ำหนักใบแห้ง ความยาวใบ ความกว้างใบ ความยาวก้านใบ ของกัญชา 4 พันธุ์ ที่ระยะใบอ่อน ใบเฟสลาด และใบแก่ ของต้นกัญชาอายุ 1 เดือน หลังปลูก

ระยะใบ	พันธุ์	น้ำหนักใบสด/ ใบ (กรัม)	น้ำหนักใบแห้ง/ ใบ (กรัม)	ความยาวใบ (เซนติเมตร)	ความกว้างใบ (เซนติเมตร)	ความยาวก้านใบ (เซนติเมตร)
ใบอ่อน	ST1	$0.985 \pm 0.12^{1/a}$	0.221 ± 0.11^a	8.18 ± 1.17^{ab}	0.78 ± 0.09^{bc}	1.05 ± 0.14^a
	TT1	0.580 ± 0.07^c	0.158 ± 0.01^b	8.66 ± 0.65^a	1.00 ± 0.11^a	0.81 ± 0.10^b
	WA1	0.630 ± 0.06^c	0.168 ± 0.01^b	7.45 ± 0.49^b	0.87 ± 0.08^a	0.91 ± 0.11^b
	RD1	0.770 ± 0.06^b	0.224 ± 0.01^a	8.58 ± 0.89^a	0.71 ± 0.06^c	0.80 ± 0.08^b
	F-test	**	**	**	**	**
	C.V.(%)	11.79	9.57	10.28	10.23	12.43
ใบเฟสลาด	ST1	1.790 ± 0.26^a	0.443 ± 0.04^a	15.39 ± 1.68^{ab}	1.82 ± 0.20^b	3.67 ± 0.19^b
	TT1	1.781 ± 0.24^a	0.379 ± 0.03^b	17.13 ± 1.29^a	1.94 ± 0.21^a	3.34 ± 0.23^b
	WA1	1.332 ± 0.13^a	0.351 ± 0.04^b	16.87 ± 1.94^a	2.89 ± 0.22^a	5.36 ± 0.52^a
	RD1	1.633 ± 0.17^a	0.454 ± 0.05^a	14.35 ± 1.62^b	1.88 ± 0.17^{cb}	1.56 ± 0.15^c
	F-test	**	**	**	**	**
	C.V.(%)	12.86	11.36	10.34	9.46	8.94
ใบแก่	ST1	1.832 ± 0.25^a	0.406 ± 0.04^a	11.55 ± 1.34^c	1.53 ± 0.18^b	4.37 ± 0.28^a
	TT1	1.310 ± 11^b	0.402 ± 0.04^{ab}	12.21 ± 1.33^{bc}	1.89 ± 0.18^a	2.38 ± 0.27^c
	WA1	1.435 ± 13^b	0.362 ± 0.02^{ab}	14.02 ± 1.57^a	1.67 ± 0.19^b	4.59 ± 0.39^a
	RD1	1.366 ± 13^b	0.353 ± 0.03^a	13.32 ± 0.73^{ab}	1.70 ± 0.12^{ab}	3.33 ± 0.21^b
	F-test	**	**	**	**	**
	C.V.(%)	11.26	10.20	10.03	10.07	7.98

^{1/a} ค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน โดยค่าเฉลี่ยที่ตามหลังด้วยตัวอักษรที่ต่างกันในแต่ละตัว (a, ab, b, bc และ c) มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$)

การศึกษาระยะการเจริญของกัญชาพันธุ์ไทย 4 พันธุ์ ที่อายุ 2 เดือน หลังปลูก

จากการศึกษาระยะการเจริญของกัญชาพันธุ์ไทย 4 พันธุ์ ที่อายุ 2 เดือน หลังปลูก ในระยะใบอ่อนพบว่า กัญชาพันธุ์ RD1 มีน้ำหนักใบสดและใบแห้งต่อใบมากกว่าพันธุ์อื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) ดังแสดงในตารางที่ 2 โดยมีค่าเท่ากับ 0.428 กรัม และ 0.128 กรัม ตามลำดับ ความยาวใบพบว่าพันธุ์ WA1 มีความยาวใบมากที่สุดมีค่าเท่ากับ 12.40 เซนติเมตร แตกต่างกันทางสถิติกับพันธุ์อื่นๆ ความกว้างใบพบว่าพันธุ์ TT1 มีความกว้าง



ภาพที่ 2 ระยะใบอ่อน ใบเพสลาด และใบแก่ (เรียงจากซ้ายไปขวา) ของกัญชาพันธุ์ ST1 TT1 WA1 และ RD1 ในช่วง 1 เดือน หลังปลูก

ใบสูงสุดมีค่าเท่ากับ 1.32 เซนติเมตร แตกต่างจากพันธุ์อื่นๆ และในส่วนของความยาวก้านใบพบว่าพันธุ์ RD1 และ TT1 มีความยาวก้านใบมากกว่าพันธุ์อื่นๆ มีค่าเท่ากับ 1.36 และ 1.32 เซนติเมตร ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างจากพันธุ์อื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) ดังแสดงในตารางที่ 2 และภาพที่ 3

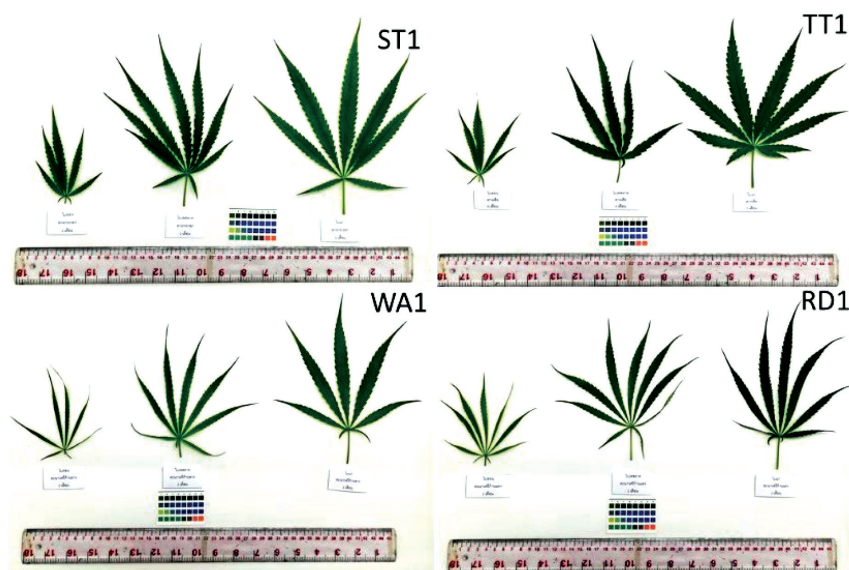
ในระยะใบเพสลาด พบว่ากัญชาพันธุ์ ST1 และ RD1 มีน้ำหนักใบสดมากที่สุดเท่ากับ 0.867 และ 0.821 กรัม ตามลำดับ และมีน้ำหนักใบแห้งเท่ากับ 0.219 และ 0.217 กรัม ตามลำดับ ซึ่งมากกว่าพันธุ์อื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) ความยาวใบและความกว้างใบ ทั้ง 4 พันธุ์ ไม่มีความแตกต่างกัน ซึ่งมีค่าอยู่ระหว่าง 14.04–15.52 เซนติเมตร และ 1.35–1.54 เซนติเมตร ตามลำดับ และในส่วนของความยาวก้านใบพบว่าพันธุ์ RD1 มีความยาวก้านใบมากกว่าพันธุ์อื่นๆ มีค่าเท่ากับ 3.08 เซนติเมตร แตกต่างจากพันธุ์อื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) ดังแสดงในตารางที่ 2 และภาพที่ 3

ในระยะใบแก่ พบว่ากัญชาพันธุ์ RD1 มีน้ำหนักใบสดมากที่สุดเท่ากับ 1.487 กรัม มากกว่าพันธุ์อื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) รองลงมา คือ พันธุ์ ST1 มีน้ำหนักใบสดเท่ากับ 1.248 กรัม น้ำหนักใบแห้งพบว่าพันธุ์ RD1 ST1 และ TT1 มีน้ำหนักใบแห้งต่อใบมากที่สุด มีค่าเท่ากับ 0.372, 0.358 และ 0.340 กรัม ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างจากพันธุ์ WA1 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) ความยาวใบพบว่าพันธุ์ TT1 WA1 และ ST1 มีความยาวใบมากที่สุด มีค่าเท่ากับ 17.92, 17.33 และ 16.11 เซนติเมตร ตามลำดับ แตกต่างจากพันธุ์ RD1 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) ความกว้างใบพบว่าพันธุ์ TT1 WA1 และ ST1 มีความกว้างของใบมากที่สุด มีค่าเท่ากับ 2.05 1.95 และ 1.89 เซนติเมตร ตามลำดับ แตกต่างจากพันธุ์ RD1 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) และในส่วนของความยาวก้านใบพบว่า พันธุ์ RD1 มีความยาวก้านใบมากกว่าพันธุ์อื่นๆ มีค่าเท่ากับ 4.19 เซนติเมตร ซึ่งแตกต่างจากพันธุ์อื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) ดังแสดงในตารางที่ 2 และภาพที่ 3

ตารางที่ 2 น้ำหนักใบสด น้ำหนักใบแห้ง ความยาวใบ ความกว้างใบ ความยาวก้านใบ ของกัญชา 4 พันธุ์ ที่ระยะ ใบอ่อน ใบเฟสลาด และใบแก่ ของต้นกัญชาอายุ 2 เดือน หลังปลูก

ระยะใบ	พันธุ์	น้ำหนักใบสด/ ใบ (กรัม)	น้ำหนักใบแห้ง/ ใบ (กรัม)	ความยาวใบ (เซนติเมตร)	ความกว้างใบ (เซนติเมตร)	ความยาวก้านใบ (เซนติเมตร)
ใบอ่อน	ST1	$0.206 \pm 0.03^{1/c}$	0.063 ± 0.01^c	9.44 ± 1.01^b	0.93 ± 0.11^c	0.56 ± 0.08^c
	TT1	0.279 ± 0.05^b	0.091 ± 0.01^b	10.73 ± 0.09^b	1.31 ± 0.11^a	0.32 ± 0.12^{ab}
	WA1	0.302 ± 0.05^b	0.082 ± 0.01^b	12.40 ± 1.60^a	1.14 ± 0.16^b	1.21 ± 0.13^b
	RD1	0.428 ± 0.05^0	0.128 ± 0.01^a	10.29 ± 1.18^a	0.86 ± 0.01^c	0.36 ± 0.12^a
	F-test	**	**	**	**	**
	C.V.(%)	16.42	12.45	11.58	11.32	10.30
ใบเฟสลาด	ST1	0.867 ± 0.11^a	0.219 ± 0.10^a	14.95 ± 1.73	1.38 ± 0.15	2.48 ± 0.32^b
	TT1	0.610 ± 0.06^b	0.189 ± 0.04^b	14.20 ± 1.13	1.54 ± 0.150	2.40 ± 0.31^b
	WA1	0.558 ± 0.06^b	0.151 ± 0.06^c	15.52 ± 1.59	1.40 ± 0.19	2.66 ± 0.27^b
	RD1	0.821 ± 0.10^a	0.217 ± 0.05^a	14.04 ± 1.48	1.35 ± 0.17	3.08 ± 0.34^a
	F-test	**	**	ns	ns	**
	C.V.(%)	12.46	10.17	10.23	11.79	11.80
ใบแก่	ST1	1.248 ± 0.18^b	0.358 ± 0.03^a	16.10 ± 1.73^{ab}	1.89 ± 0.15^a	3.57 ± 0.43^b
	TT1	0.971 ± 0.17^c	0.340 ± 0.05^a	17.92 ± 1.13^a	2.05 ± 0.25^a	3.55 ± 0.38^b
	WA1	0.999 ± 0.15^c	0.295 ± 0.03^b	17.33 ± 1.59^a	1.95 ± 0.25^a	3.46 ± 0.32^b
	RD1	1.487 ± 0.23^a	0.372 ± 0.04^a	14.76 ± 1.48^b	1.61 ± 0.19^b	4.19 ± 0.53^a
	F-test	**	**	**	**	**
	C.V.(%)	15.57	11.66	9.01	11.55	11.37

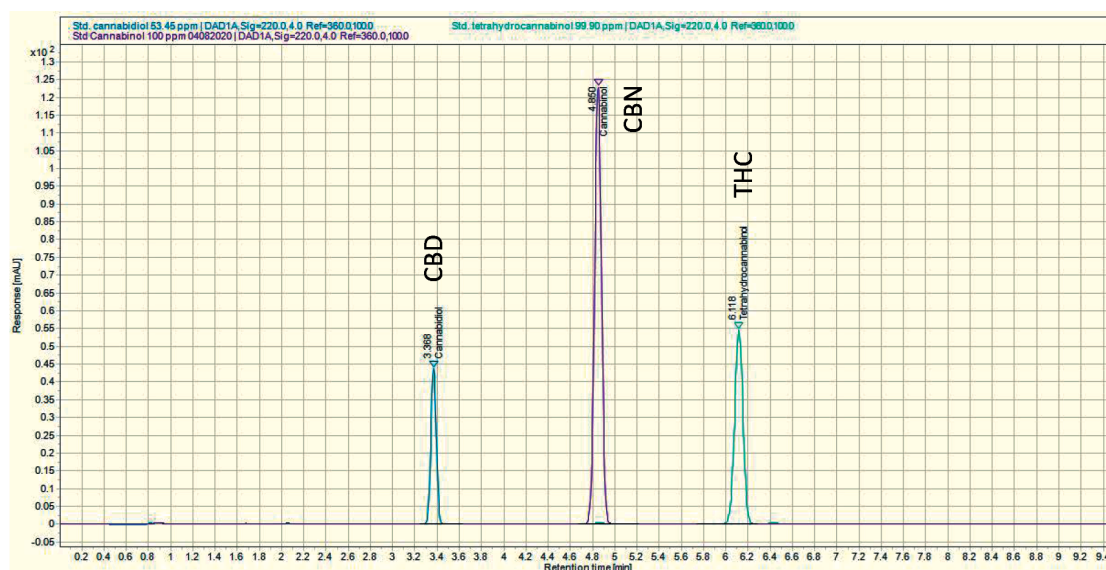
^{1/c} ค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน โดยค่าเฉลี่ยที่ตามหลังด้วยตัวอักษรที่ต่างกันในแต่ละแถว (a, ab, b, b และ c) มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$), ns = ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ



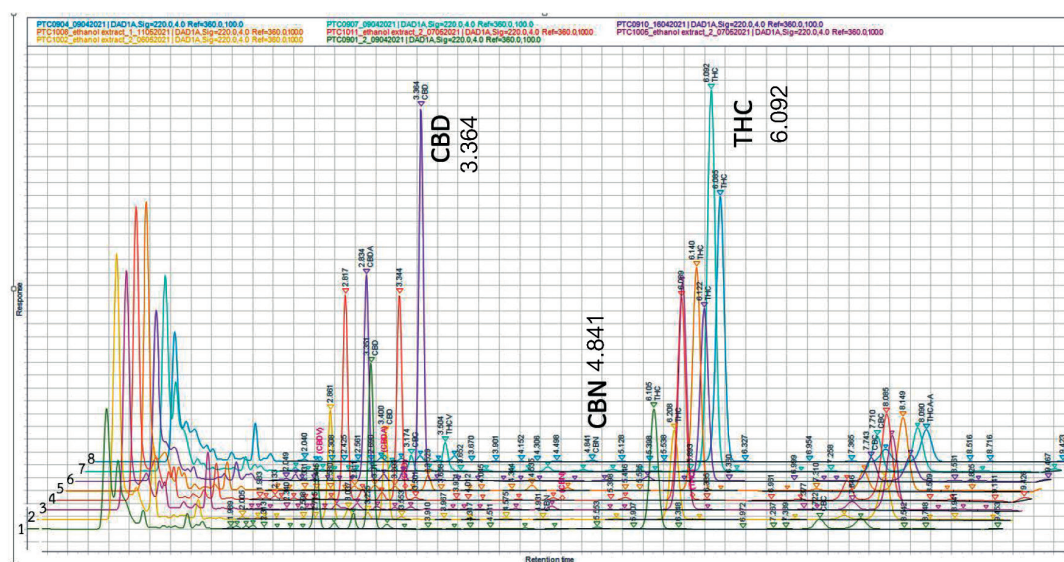
ภาพที่ 3 ระยะใบอ่อน ใบเฟสลาด และใบแก่ (เรียงจากซ้ายไปขวา) ของกัญชาพันธุ์ ST1 TT1 WA1 และ RD1 ที่อายุ 2 เดือน หลังปลูก

การศึกษาวิธีการตรวจปริมาณสารแคนนาบินอยด์ของใบกัญชาพันธุ์ไทยด้วยวิธี UHPLC

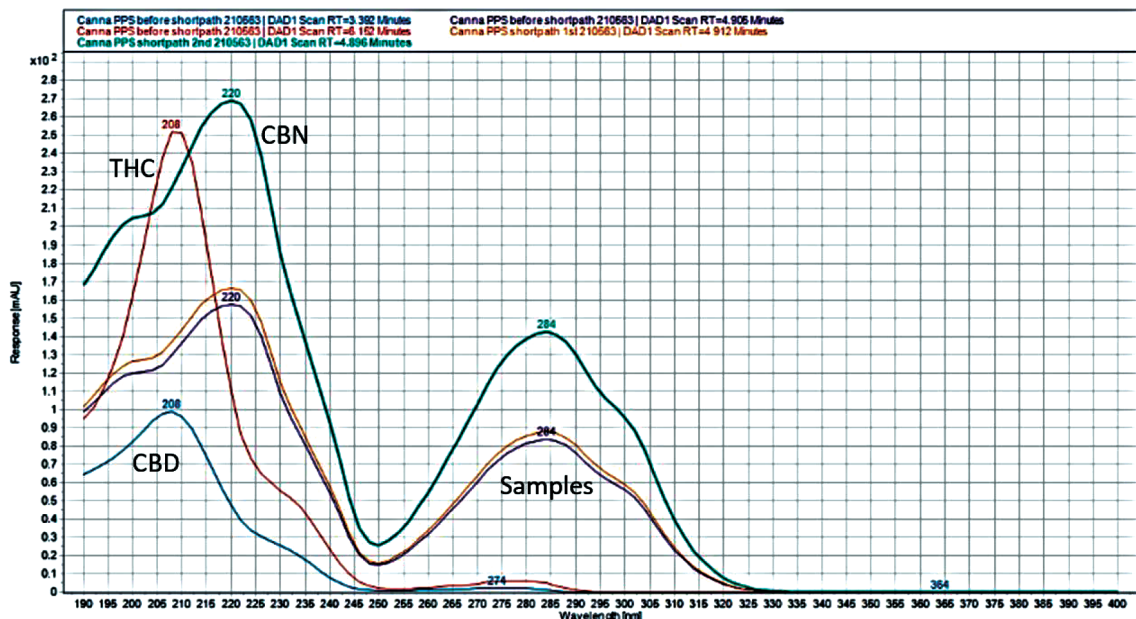
จากการฉีดสารมาตรฐานของสาร CBD CBN THC พบว่า retention time ของสาร CBD CBN และ THC เท่ากับ 3.36, 4.85 และ 6.12 นาที ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 4 เมื่อตรวจวิเคราะห์สารสำคัญในใบกัญชาแต่ละพันธุ์ที่อายุ 1 และ 2 เดือน พบว่า retention time ของสาร CBD CBN และ THC แสดงที่เวลาใกล้เคียงกันกับสารมาตรฐานเท่ากับ 3.36, 4.84 และ 6.09 นาที ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 5 และเมื่อเปรียบเทียบ UV spectrum ของสาร CBD CBN และ THC พบว่า $\lambda_{\max}$ ของสาร CBD และ THC มีค่าเท่ากับ 208 นาโนเมตร ส่วน $\lambda_{\max}$ ของ CBN มีค่าเท่ากับ 220 และ 284 นาโนเมตร เมื่อวิเคราะห์สารละลายตัวอย่างกัญชาด้วยเครื่อง UHPLC โดยใช้ DAD เป็นดีเทคเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 220 นาโนเมตร ไม่พบการเกิด co-elute ของสารอื่นที่ความยาวคลื่น 220 นาโนเมตร ดังแสดงในภาพที่ 6



ภาพที่ 4 โครมาโทแกรมของสารมาตรฐาน CBD CBN และ THC ด้วยวิธี UHPLC



ภาพที่ 5 โครมาโทแกรมสาร CBD CBN และ THC ด้วยวิธีตรวจวิเคราะห์ UHPLC ของตัวอย่างใบกัญชา 4 พันธุ์ที่อายุ 1 เดือน (เลข 1, 8, 7, 6) และ 2 เดือน (เลข 2, 3, 4, 5) (1 = ใบอ่อน ST1, 2 = ใบเพศลาด ST1, 3 = ใบเพศลาด TT1, 4 = ใบเพศลาด WA1, 5 = ใบเพศลาด RD1, 6 = ใบอ่อน RD1, 7 = ใบอ่อน WA1 และ 8 = ใบอ่อน TT1)



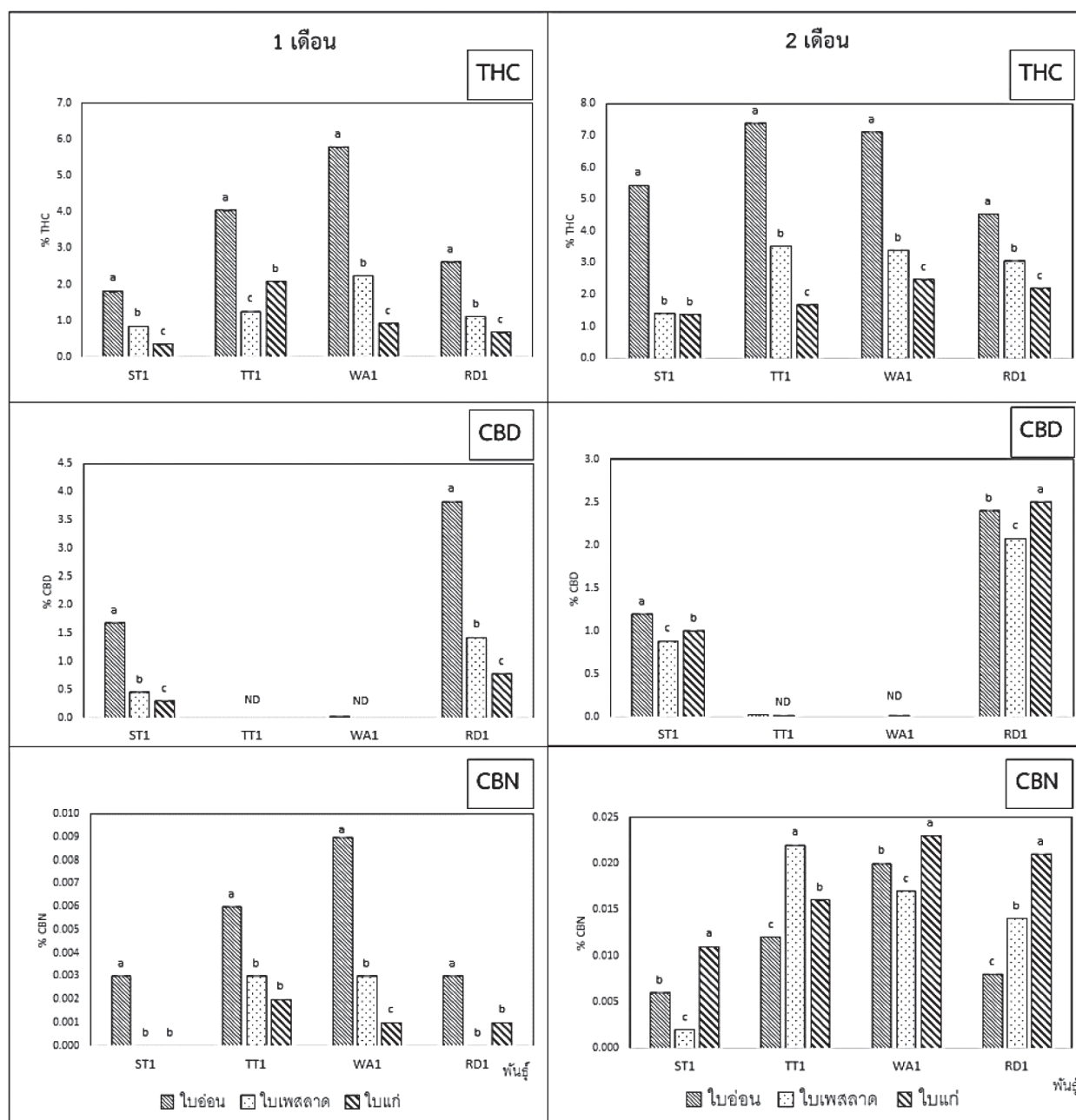
ภาพที่ 6 UV spectrum ของสารมาตรฐาน CBD CBN THC และตัวอย่าง ด้วยวิธีตรวจวิเคราะห์ UHPLC

การเปรียบเทียบระยะเวลาการเจริญของใบ ต่อการเปลี่ยนแปลงสารแคนนาบินอยด์

ผลจากการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณสารแคนนาบินอยด์ ได้แก่ สาร THC CBD และ CBN ของใบกัญชา ในระยะใบอ่อน ใบเพสลาด และใบแก่ พบว่าในช่วง 1 เดือน หลังปลูก สาร THC ในระยะใบอ่อนทุกสายพันธุ์ มีปริมาณสาร THC สูงกว่าใบเพสลาดและใบแก่อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) ซึ่งมีค่าอยู่ในช่วง 1.825–5.79 % โดยน้ำหนัก (w/w) โดยพันธุ์ WA1 และ TT1 มีสาร THC ในใบอ่อนค่อนข้างสูงโดยมีปริมาณ 5.79 และ 4.04% w/w ส่วนใบเพสลาดมีสาร THC รองลงมาจากใบอ่อน โดยแต่ละพันธุ์มีค่า THC อยู่ระหว่าง 0.857–2.244% w/w ซึ่งพันธุ์ ST1 มีสาร THC ต่ำกว่า 1% w/w ส่วนใบแก่ของแต่ละพันธุ์มีปริมาณสาร THC ลดลง มีค่าอยู่ในช่วง 0.367–2.084% w/w โดยพบว่าพันธุ์ TT1 มีสาร THC ในใบแก่สูงที่สุดเท่ากับ 2.084% w/w ในขณะที่ช่วง 2 เดือน หลังปลูก สาร THC ในระยะใบอ่อนทุกพันธุ์ มีปริมาณสาร THC มากกว่าใบเพสลาดและใบแก่อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) โดยมีค่าอยู่ในช่วง 4.53–7.39% w/w รองลงมา คือ ใบเพสลาด มีปริมาณสาร THC ของแต่ละพันธุ์อยู่ในช่วง 1.397–3.514% w/w และในใบแก่ทุกพันธุ์มีสาร THC ต่ำที่สุดมีค่าอยู่ในช่วง 1.363–2.472% w/w ดังแสดงในภาพที่ 7

สำหรับการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณสาร CBD พบว่า ในช่วง 1 เดือน หลังปลูก ใบอ่อนมีสาร CBD สูงที่สุดมีค่าอยู่ในช่วง 0.010–3.828% w/w โดยพบสาร CBD มากในพันธุ์ ST1 และ RD1 รองลงมา คือ ใบเพสลาด และใบแก่ มีค่าอยู่ในช่วง 0.001–1.427% w/w และ 0.000–0.787% w/w ตามลำดับ และยังพบสารอยู่เพียง 2 พันธุ์ ในขณะที่ปริมาณสาร CBD ในช่วง 2 เดือน หลังปลูก พบเพียงพันธุ์ ST1 และ RD1 โดยใบอ่อนมีสาร CBD สูงที่สุดในพันธุ์ ST1 แตกต่างจากใบแก่และใบเพสลาด อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ มีค่าเท่ากับ 1.198, 1.000 และ 0.882% w/w ตามลำดับ ส่วนพันธุ์ RD1 พบสาร CBD สูงในใบ แตกต่างจากใบอ่อนและใบเพสลาดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ มีค่าเท่ากับ 2.500, 2.398 และ 2.077% w/w ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 7

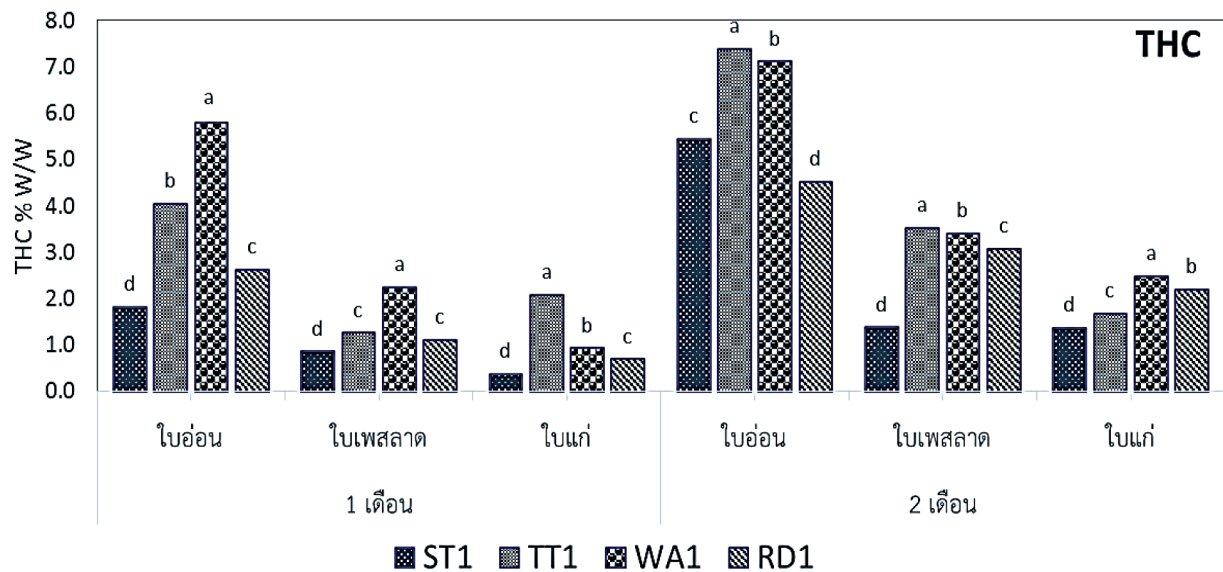
เมื่อตรวจวิเคราะห์หาปริมาณสาร CBN พบว่า ในช่วง 1 เดือน หลังปลูก ใบอ่อนมีสาร CBN สูงที่สุดพบทุกพันธุ์โดยมีค่าอยู่ในช่วง 0.003–0.009% w/w รองลงมาคือใบแก่และใบเพสลาดตามลำดับ ในขณะที่ช่วง 2 เดือน หลังปลูก ใบแก่พันธุ์ ST1 WA1 และ RD1 มีสาร CBN สูงกว่าใบเพสลาดและใบอ่อน มีค่าอยู่ในช่วง 0.011–0.023% w/w ดังแสดงในภาพที่ 7



ภาพที่ 7 ปริมาณสาร cannabinoid ของใบกัญชาในระยะใบอ่อน ใบเพสลาด และใบแก่ ช่วง 1 และ 2 เดือน หลังปลูก

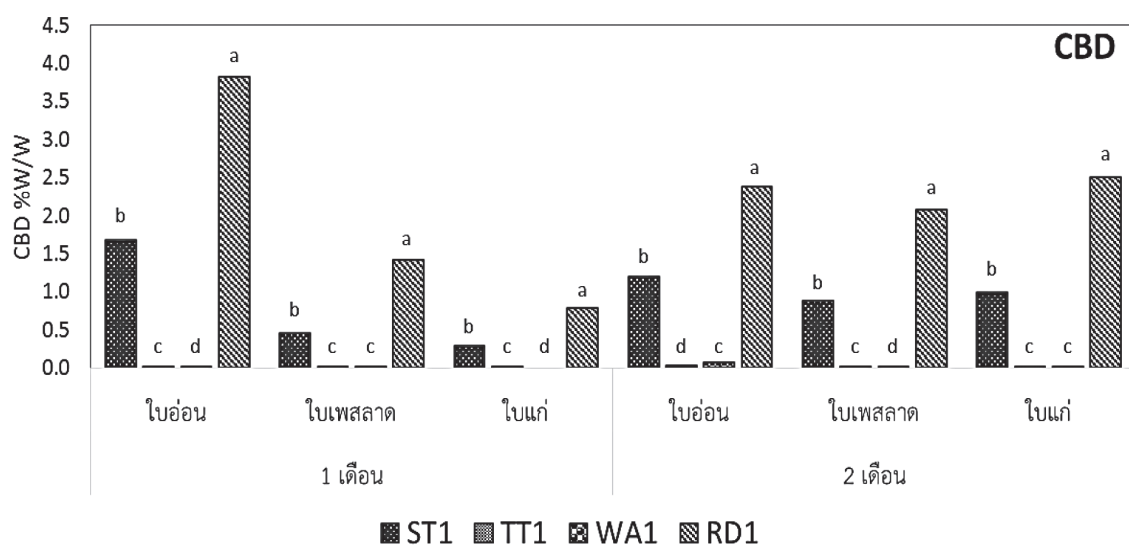
การเปรียบเทียบปริมาณสารแคนนาบินอยด์ของกัญชาพันธุ์ไทย ในระยะใบอ่อน ใบเพสลาด และใบแก่

จากการวิเคราะห์ปริมาณสาร THC ในใบกัญชาที่อายุ 1 เดือน พบว่าในใบอ่อนและใบเพสลาดพันธุ์ WA1 จะมี THC สูงที่สุดโดยมีค่าอยู่ที่ 5.798 ± 0.005 และ $2.244 \pm 0.004\%$ w/w ในใบแก่พันธุ์ TT1 มีปริมาณสาร THC สูงที่สุดโดยมีค่าอยู่ที่ $2.084 \pm 0.001\%$ w/w จากภาพจะเห็นได้ว่าปริมาณสาร THC ในกัญชาทั้ง 4 พันธุ์ จะมีปริมาณสารที่สูงในใบอ่อน และมีแนวโน้มที่ลดลงในใบเพสลาดและใบแก่ ยกเว้นพันธุ์ TT1 ที่มีแนวโน้มในใบแก่ที่เพิ่มขึ้น เมื่อเทียบกับใบเพสลาด ส่วนใบกัญชาที่อายุ 2 เดือน พบว่าในใบอ่อนและใบเพสลาด พันธุ์ TT1 จะมี THC สูงที่สุดโดยมีค่าอยู่ที่ $7.392 \pm 0.007\%$ w/w และ $3.514 \pm 0.004\%$ w/w ในใบแก่พันธุ์ WA1 มีปริมาณสาร THC สูงที่สุดโดยมีค่าอยู่ที่ $2.472 \pm 0.001\%$ w/w จากภาพจะเห็นได้ว่าปริมาณสาร THC ในกัญชาทั้ง 4 พันธุ์ จะมีปริมาณสารที่สูงในใบอ่อนและมีแนวโน้มที่ลดลงในใบเพสลาดและใบแก่ ดังแสดงในภาพที่ 8



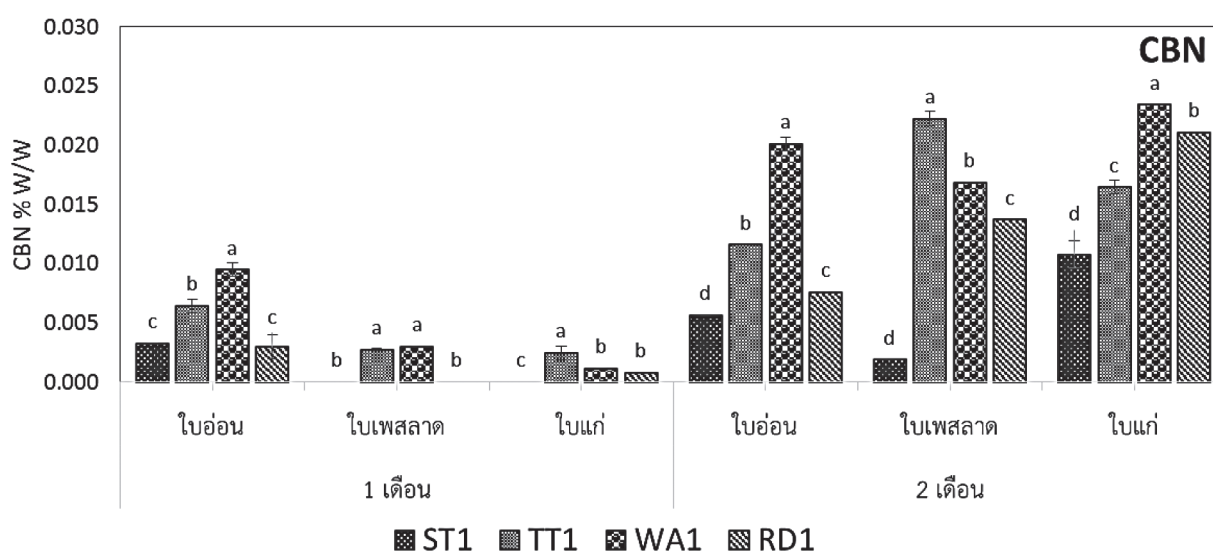
ภาพที่ 8 ปริมาณสาร THC ของใบกัญชาพันธุ์ ST1 TT1 WA1 และ RD1 ในระยะใบอ่อน ใบเพสลาด และใบแก่ ช่วง 1 เดือน และ 2 เดือน หลังปลูก

จากการวิเคราะห์ปริมาณสาร CBD ในใบกัญชาที่อายุ 1 เดือน พบว่าใบอ่อน ใบเพสลาด และใบแก่ของกัญชาพันธุ์ RD1 มีปริมาณ CBD สูงที่สุดโดยมีค่าอยู่ที่ 3.829 ± 0.003 , 1.427 ± 0.001 และ $0.787 \pm 0.000\%$ w/w ตามลำดับ จากภาพจะเห็นได้ว่าพันธุ์ ST1 และ RD1 จะพบปริมาณ CBD สูงในใบอ่อน และมีแนวโน้มลดต่ำลงในใบเพสลาดและใบแก่ ตามลำดับ ส่วนใบกัญชาที่อายุ 2 เดือน พบว่าใบอ่อน ใบเพสลาด และใบแก่ของกัญชาพันธุ์ RD1 มีปริมาณ CBD สูงที่สุดโดยมีค่าอยู่ที่ 2.389 ± 0.002 , 2.077 ± 0.00 และ $2.500 \pm 0.001\%$ w/w ตามลำดับ จากภาพจะเห็นได้ว่าพันธุ์ ST1 และ RD1 จะพบปริมาณ CBD สูงในใบอ่อน และมีเพียงพันธุ์เดียวคือ RD1 ที่มีสาร CBD ทั้งในใบอ่อน ใบเพสลาด และใบแก่ ซึ่งมีปริมาณสูงเท่า ๆ กัน และสูงกว่าพันธุ์อื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) ดังแสดงในภาพที่ 9



ภาพที่ 9 ปริมาณสาร CBD ของใบกัญชาพันธุ์ ST1 TT1 WA1 และ RD1 ในระยะใบอ่อน ใบเพสลาด และใบแก่ ช่วง 1 เดือนและ 2 เดือน หลังปลูก

จากการวิเคราะห์ปริมาณสาร CBN ในใบกัญชาที่อายุ 1 เดือน พบว่าใบอ่อน และใบเพสลาด ของกัญชาพันธุ์ WA1 มีปริมาณ CBN สูงที่สุดโดยมีค่าอยู่ที่ 0.009% และ 0.003% w/w ตามลำดับ ใบแก่พันธุ์ TT1 จะมีปริมาณ CBN สูงที่สุดโดยมีค่าอยู่ที่ 0.003% w/w จากภาพจะเห็นได้ว่าพันธุ์ ST1 พบ CBN ในใบอ่อนเท่านั้น พันธุ์ TT1 และ WD1 มีปริมาณ CBN ที่สูงในใบอ่อนและมีแนวโน้มที่ลดลงในใบเพสลาดและใบแก่ เมื่อวิเคราะห์หาสาร CBN ในใบกัญชาที่อายุ 2 เดือน พบว่าใบแก่และใบอ่อนของกัญชาพันธุ์ WA1 มีปริมาณ CBN สูงที่สุดโดยมีค่าอยู่ที่ 0.023 และ 0.020% w/w ตามลำดับ ใบเพสลาดพันธุ์ TT1 จะมีปริมาณ CBN สูงที่สุดโดยมีค่าอยู่ที่ 0.022% w/w จากภาพจะเห็นได้ว่าพันธุ์ RD1 และ WA1 จะมีปริมาณ CBN สูงที่สุดในใบแก่เมื่อเทียบในพันธุ์เดียวกัน และจะมีค่าลดลงในใบเพสลาด ดังแสดงในภาพที่ 10



ภาพที่ 10 ปริมาณสาร CBN ของใบกัญชาพันธุ์ ST1 TT1 WA1 และ RD1 ในระยะใบอ่อน ใบเพสลาด และใบแก่ ช่วง 1 เดือน และ 2 เดือน หลังปลูก

วิจารณ์

ผลจากการศึกษาปริมาณสารแคนนาบินอยด์ ในแต่ละระยะของการเจริญเติบโตของใบกัญชาต่อการเปลี่ยนแปลงของกัญชาพันธุ์ไทย 4 พันธุ์ ได้แก่ กระรอกภูพานเอสที 1 (ST1) ทางเสือกลนครที่ 1 (TT1) ตะนาวศรี ก้านขาวดั่งเบิลยูเอ 1 (WA1) และตะนาวศรีก้านแดงอาร์ดี 1 (RD1) ในระยะใบอ่อน ใบเพสลาด และใบแก่ พบว่าพันธุ์ ST1 และพันธุ์ RD1 ให้น้ำหนักใบสดต่อใบ น้ำหนักใบแห้งต่อใบ ค่อนข้างดีกว่าพันธุ์อื่น โดยในช่วง 2 เดือนหลังปลูก ระยะใบเพสลาดของพันธุ์ ST1 และ RD1 มีน้ำหนักใบสดต่อใบมากที่สุด ซึ่งเมื่อพิจารณาจากรูปทรงต้นพันธุ์ ST1 จะมีช่วงของข้อในลำต้นที่ค่อนข้างยาวกว่าพันธุ์อื่น ทำให้ใบที่แตกออกมาจากข้อมีพื้นที่ในการสังเคราะห์แสงได้มากขึ้น ส่งผลให้ใบมีความหนามากขึ้น อย่างไรก็ตามจำเป็นต้องมีการศึกษาปริมาณการสังเคราะห์แสง รวมถึงปริมาณคลอโรฟิลล์ที่อยู่ในใบเพิ่มเติม ซึ่งอาจมีผลต่อการเพิ่มน้ำหนักสด น้ำหนักแห้งภายในใบ ในขณะเดียวกันพันธุ์ RD1 มีน้ำหนักใบสดและใบแห้งมาก เนื่องจากมีขนาดของก้านใบที่ค่อนข้างยาวกว่าพันธุ์อื่น ซึ่งก้านใบมีการนำไปใช้ประโยชน์ทางด้านแพทย์แผนไทยโดยใช้เป็นส่วนประกอบยาบางตำรับ การได้ก้านใบที่ยาวและมีขนาดใหญ่จึงเป็นลักษณะที่ดีของกัญชาพันธุ์ไทย เมื่อศึกษาปริมาณสารแคนนาบินอยด์ด้วยวิธี UHPLC พบว่าสามารถตรวจวัดปริมาณสาร THC CBD และ CBN ในใบกัญชาได้ทั้งใบอ่อน ใบเพสลาด และใบแก่ วิธีดังกล่าวใช้เวลาในการวิเคราะห์ต่อตัวอย่างประมาณ 10 นาที ซึ่งใช้เวลาน้อยทำให้สามารถตรวจได้เร็วกว่าการตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC ที่ใช้เวลานานถึง 25 นาที⁽⁷⁾

จากการตรวจด้วยวิธี UHPLC และ HPLC ในรายงานยังพบว่าสามารถตรวจสอบสารแคนนาบินอยด์ที่อยู่ในวัตถุดิบกัญชาในรูปของ native form รวมถึง acidic cannabinoids เช่น THCA CBDA ได้ง่ายกว่าการตรวจวิเคราะห์ด้วย Gas Chromatography ที่ต้องใช้ความร้อนเพื่อเปลี่ยนกระบวนการ decarboxylation^(7, 8, 9) เมื่อตรวจสอบสารแคนนาบินอยด์ ในใบกัญชาพบว่าปริมาณสาร THC ในช่วง 1 เดือน และ 2 เดือน ระยะใบอ่อนทุกพันธุ์มีปริมาณสาร THC สูงกว่าใบเพสลาดและใบแก่ และยิ่งพบว่าในระยะ 2 เดือน หลังปลูก จะมีสาร THC สูงกว่าในช่วง 1 เดือน สอดคล้องกับสาร CBD และ CBN ที่มีแนวโน้มของปริมาณสารเพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตามสาร CBD ในใบอ่อนในช่วงระยะเวลาการปลูก 1 เดือน จะสูงกว่าในใบอ่อนที่ระยะ 2 เดือน ของพันธุ์ ST1 และ RD1 แสดงให้เห็นว่าการสร้างสาร CBD ในใบจะเริ่มสร้างสารสำคัญได้ที่อายุ 1 เดือน ซึ่งจากการจัดการธาตุอาหารในการทดลองนี้ ได้ทำการใส่ปุ๋ยสูตรเร่งดอกโดยเริ่มให้ปุ๋ยเมื่อต้นกัญชาอายุได้ 1 เดือน จนถึงระยะออกดอก ปุ๋ยสูตรดังกล่าวจะมีปริมาณไนโตรเจนต่ำกว่าสูตรที่ 1 ที่ใช้ในการเจริญเติบโตทางด้านลำต้น เมื่ออายุต้นถึง 2 เดือน กัญชาเริ่มมีการออกดอก แสดงว่าธาตุอาหารอาจเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีส่วนช่วยให้ต้นกัญชาออกดอกได้ ซึ่งมีผู้ศึกษาผลของไนโตรเจนต่อลักษณะทางเคมี การทำงานและสรีรวิทยาของกัญชาในระยะออกดอก โดยให้ปริมาณไนโตรเจนที่แตกต่างกัน ภายใต้สภาพแวดล้อมที่ถูกควบคุม พบว่าไนโตรเจนที่ความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตร จะมีปริมาณของแคนนาบินอยด์ และเทอร์พีนอยด์ ที่สูงและลดต่ำลงตามปริมาณของไนโตรเจนที่สูงขึ้น แสดงให้เห็นว่าระดับของไนโตรเจนอาจมีผลต่อการควบคุมปริมาณของสารแคนนาบินอยด์ และเทอร์พีนอยด์⁽¹⁰⁾ เมื่อเปรียบเทียบพันธุ์กับปริมาณสารแคนนาบินอยด์ พบว่าพันธุ์ WA1 และ TT1 มีปริมาณสาร THC และ CBN สูงกว่าพันธุ์อื่น ซึ่งปริมาณของ CBN จะแปรผันตามปริมาณสาร THC ที่สูงขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยที่พบว่าสาร CBN จะเป็นผลผลิตที่ได้จาก THCA ในช่วงของการผ่านปฏิกิริยาออกซิเดชัน (Oxidative degradation) ซึ่งถ้าหากมีปริมาณ THC สูง ปริมาณของ CBN จะสูงไปด้วย^(11, 12) ส่วนปริมาณสาร CBD พบมากเพียง 2 พันธุ์ คือ พันธุ์ RD1 และ ST1 ซึ่งจากข้อมูลปริมาณสารสำคัญที่อยู่ในใบค่อนข้างสูง เมื่อเปรียบเทียบกับผู้ศึกษาปริมาณของแคนนาบินอยด์ในใบกัญชาซึ่งพบว่ามีค่าอยู่ระหว่าง 1.10–2.10%⁽¹³⁾ จากข้อมูลแสดงให้เห็นว่า พันธุ์กัญชามีผลต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณสารแคนนาบินอยด์ โดยสามารถพบได้ตั้งแต่ระยะใบอ่อน ใบเพสลาด และใบแก่ ซึ่งจากข้อมูลที่ได้สอดคล้องกับลักษณะทางพันธุกรรมที่ศึกษาโดยสถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ร่วมกับมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี วิทยาเขตสกลนคร พบว่ากัญชาพันธุ์ไทย 4 พันธุ์ มีลักษณะเด่นถึง 3 แบบ แบบที่ 1 เป็นกัญชาที่ให้สาร THC สูง ได้แก่ พันธุ์ WA1 และ TT1 แบบที่ 2 เป็นกัญชาที่ให้สาร THC และ CBD ในอัตราส่วนที่เท่ากัน (THC : CBD เท่ากับ 1 : 1) ได้แก่ พันธุ์ ST1 และกัญชาแบบที่ 3 ที่ให้สาร CBD สูง ได้แก่ พันธุ์ RD1 จากข้อมูลแสดงให้เห็นว่าสารแคนนาบินอยด์ในใบกัญชาอาจจะมีความสัมพันธ์กับลักษณะทางพันธุกรรมของกัญชา ซึ่งจะ เป็นประโยชน์ต่อการศึกษากัญชาพันธุ์กัญชา โดยสามารถตรวจสอบสารสำคัญในใบเพื่อคัดเลือกพันธุ์กัญชาได้เร็วมากขึ้นไม่ต้องรอให้ถึงช่วงออกดอก อย่างไรก็ตามจำเป็นต้องเก็บรวบรวมตัวอย่างพันธุ์กัญชาจากแหล่งต่าง ๆ เพื่อให้ได้ข้อมูลที่ถูกต้องมากขึ้น รวมถึงควรศึกษาในเรื่องของปริมาณธาตุอาหารที่เหมาะสมของแต่ละพันธุ์เพื่อเพิ่มปริมาณและคุณภาพของผลผลิตทั้งในส่วนของใบ ราก และช่อดอก เพื่อพัฒนาปรับปรุงกัญชาพันธุ์ไทยให้มีศักยภาพในการแข่งขันกับตลาดโลกต่อไป

สรุป

การศึกษาระยะการเจริญเติบโตของใบกัญชาพบว่ามีความแตกต่างกันของแต่ละพันธุ์ โดยพันธุ์ ST1 และพันธุ์ RD1 ให้น้ำหนักใบสดและน้ำหนักใบแห้งต่อใบมากกว่าพันธุ์อื่น ส่วนความยาวและความกว้างของใบมีค่าไม่แตกต่างกัน สำหรับความยาวของก้านใบพบว่าพันธุ์ RD1 มีความยาวก้านใบในช่วงใบเพสลาดยาวมากกว่าพันธุ์อื่น เมื่อตรวจสอบปริมาณสารแคนนาบินอยด์ในใบพบว่ามีสาร THC และ CBD ในใบอ่อนสูงกว่าใบเพสลาดและใบแก่ และเมื่อต้นกัญชามีอายุมากขึ้นจะมีสารดังกล่าวเพิ่มมากขึ้น ส่วนสาร CBN พบน้อยมากในใบ แต่จะพบปริมาณสาร CBN สูงในใบแก่และใบเพสลาด ซึ่งสารจะเพิ่มขึ้นเมื่อต้นกัญชามีอายุมากขึ้นเช่นเดียวกับสาร THC และ CBD นอกจากนี้ยังพบว่าพันธุ์

ของกัญชามีผลต่อปริมาณสารแคนนาบินอยด์ในใบ โดยพันธุ์ WA1 และ TT1 มีสาร THC และ CBN สูง ส่วนพันธุ์ RD1 และ ST1 เป็นพันธุ์ที่พบสาร CBD สูงเพียงสองพันธุ์เท่านั้น และพบสารดังกล่าวในปริมาณสูงตั้งแต่อายุ 1 เดือน หลังปลูก งานวิจัยครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าการนำใบกัญชาไปใช้ประโยชน์ควรพิจารณาในเรื่องของพันธุ์และอายุของ ต้นกัญชา รวมถึงส่วนต่างๆ ที่จะนำมาใช้ประโยชน์

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณนายทรงพล ชีวะพัฒน์ อดีตผู้อำนวยการสถาบันวิจัยสมุนไพร ดร.ประไพ วงศ์สินคงมั่ง หัวหน้า สำนักวิชาการวิทยาศาสตร์การแพทย์ ที่ช่วยสนับสนุนและช่วยเหลือด้านการยื่นขออนุญาตปลูกกัญชา ขอขอบคุณ ผศ.พิเชษฐ เวชวิฐาน มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี วิทยาเขตสกลนคร นายสนอง ดวงศรีจันทร์ นายธนะชัย ชื่นสกุล และนายกัมพล รัตนแก้ว ที่ช่วยเก็บตัวอย่างและให้องค์ความรู้ในเรื่องการปลูกกัญชา ขอขอบคุณ นายชยกร ยุกวณิช นายสุเทพ ศรีสนาม และเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช และห้องปฏิบัติการจีโนมิกส์พืช ที่ช่วยเหลือการเก็บตัวอย่างพืชกัญชา

เอกสารอ้างอิง

1. Mechoulam R, Hanus LO, Pertwee R, Howlett AC. Early phytocannabinoid chemistry to endocannabinoids and beyond. *Nat Rev Neurosci* 2014; 15(11): 757–64.
2. Velasco G, Sánchez C, Guzmán M. Towards the use of cannabinoids as antitumour agents. *Nat Rev Cancer* 2012; 12(6): 436–44.
3. พระราชบัญญัติอาหาร พ.ศ. 2522 ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 424 (พ.ศ. 2564). ราชกิจจานุเบกษา เล่มที่ 138 ตอนพิเศษ 45 ง (วันที่ 25 กุมภาพันธ์ 2564). หน้า 32.
4. สำนักงานจัดการกัญชาและกระท่อมทางการแพทย์แผนไทย. Infographic 16 ตำรับยาแผนไทยที่มีกัญชาปรุงผสม อยู่. [ออนไลน์]. 2564; [สืบค้น 2 ก.ค. 2564]; [1 หน้า]. เข้าถึงได้ที่: URL : <https://ockt.dtam.moph.go.th/index.php/cannabis-formula/200-infographic-16>.
5. สุรพล อุปติสสกุล. สถิติการวางแผนการทดลองเบื้องต้น. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์; 2528.
6. Duncan DB. Multiple range and multiple F tests. *Biometrics* 1995; 11: 1–42.
7. Rudd J. UHPLC enables rapid quantitation of native cannabinoids. [online]. 2018; [cited 2021 Aug 30]; [2 screens]. Available from: URL: <https://www.analyticalcannabis.com/articles/uhplc-enables-rapid-quantitation-of-native-cannabinoids-298930>.
8. Romano LL, Hazekamp A. Cannabis oil: chemical evaluation of an upcoming cannabis-based medicine. *Cannabinoids* 2013; 1(1): 1–11.
9. Lazarjani MP, Torres S, Hooker T, Fowle C, Young O, Seyfoddin A. Methods for quantification of cannabinoids: a narrative review. *J Cannabis Res* 2020; 2: 35. (10 pages).
10. Saloner A, Bernstein N. Nitrogen supply affects cannabinoid and terpenoid profile in medical cannabis (*Cannabis sativa* L.). *Ind Crop Prod* 2021; 167: 113516. (13 pages).
11. Hazekamp A, Fishedick JT, Díez ML, Lubbe A, Ruhaak RL. Chemistry of cannabis. In: Mander L, Liu HW, editors. *Comprehensive natural products II*. Oxford, UK: Elsevier Science; 2010. p. 1033–1084.

12. Fathordoobady F, Singh A, Kitts DD, Singh AP. Hemp (*Cannabis sativa* L.) extract : anti-microbial properties, methods of extraction, and potential oral delivery. *Food Rev Int* 2019; 35(7): 664-84.
 13. Jin D, Dai K, Xie Z, Chen J. Secondary metabolites profiled in cannabis inflorescences, leaves, stem barks, and roots for medicinal purposes. *Sci Rep* 2020; 10(1): 3309. (14 pages).
-

The Cannabinoid Contents in Different Growth Stages of Thai *Cannabis sativa* L. Leaves

Sorrapetch Marsud¹ Thanawat Thongchin¹ Korravat somkid¹ Phanuwit Poolsab¹
Paparpadee Suchantaboot¹ Kotchaporn Chotmanotham¹ Tipawan Phrugmanon¹
Ratree Pranakhon² Wanwipa Pinta² Phichet Banyati¹ and Siriwan Chaisomboonpan¹

¹Department of Medical Sciences, Tiwanond Road, Nonthaburi 11000

²Rajamangala University of Technology Isan, Sakon Nakhon Campus, Sakon Nakhon 47160 Thailand

ABSTRACT Cannabinoids are the major compounds in cannabis containing tetrahydrocannabinol (THC), which is a psychoactive compound and other non-psychoactive compounds, such as cannabinol (CBN), cannabidiol (CBD). Cannabinoids are mainly found in inflorescence of cannabis, but some of them are also detected in other parts including leaves. The information of cannabinoids contents in cannabis leaves is still limited, especially in Thai cannabis. This study, therefore, aims to investigate cannabinoids contents using the Ultra High Performance Liquid Chromatography (UHPLC) technique in leaves of different growth stages. Four cultivars of Thai cannabis including Hang Kra Rog Phu Phan (ST1), Hang Suea Sakonnakhon (TT1), Tanao Si Kan Khaw (WA1) and Tanao Si Kan Dang (RD1) were grown and recorded leaf sizes as well as THC and CBD contents in different growth stages. The results showed that the immature leaves (both fresh and dried) of 2-month-grown ST1 and RD1 gave the highest weight compared to others. The immature and mature leaf stalks of RD1 were higher in length than others, but not different in width and length of their leaves. The highest THC content was detected in 2-month young leaves cannabis, while CBD content showed the highest (3.83 % w/w) in 1-month young leaves of RD1. In contrast, a small amount of CBN was detected in all cannabis leaves. The information reported here could appropriately support medical use and create value-added for Thai cannabis.

Keyword: *Cannabis sativa*, Cultivar, Cannabinoids