

การพัฒนาและทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์สาร กลุ่มแคนนาบินอยด์ในน้ำมะพร้าว โดยเทคนิค LC-MS/MS

สกุรัตน์ สมสันติสุข อัจฉรี อินแก้ว เสาวณีย์ วาจาสิทธิ์ สุวิมล หมวดหิมะ กัญญารัตน์ เชื้อกุลชาติ วิทวัส วังแก้วหิรัญ และทองสุข ปายะนันท์

สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000

บทคัดย่อ กัญชาและกัญชงจัดเป็นยาเสพติดให้โทษประเภทที่ 5 แต่ปัจจุบันได้อนุญาตให้นำบางส่วนไปใช้ได้อย่างถูกกฎหมายตามเงื่อนไขที่กำหนด ส่งผลให้ผลิตภัณฑ์อาหารและเครื่องดื่มที่มีกัญชาหรือกัญชงเป็นส่วนประกอบกลายเป็นที่สนใจของทั้งผู้ผลิตและผู้บริโภค เนื่องจากมีสารสำคัญกลุ่มแคนนาบินอยด์ ซึ่งมีฤทธิ์ทั้ง psychotropic และ non-psychotropic มีอนุพันธ์หลัก ได้แก่ CBD และ Δ^9 -THC สามารถช่วยให้ผ่อนคลาย คลายความกังวล และช่วยในการนอนหลับ อย่างไรก็ตามการบริโภคในปริมาณที่มากเกินไปอาจก่อให้เกิดอาการไม่พึงประสงค์ เช่น เชื่องซึม ปวดศีรษะ หัวใจเต้นแรง และอาจรุนแรงจนถึงขั้นประสาทหลอน และควบคุมตัวเองไม่ได้ ดังนั้นการควบคุมปริมาณแคนนาบินอยด์ในผลิตภัณฑ์อาหารและเครื่องดื่มจึงมีความสำคัญในการคุ้มครองความปลอดภัยของผู้บริโภค สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหารได้พัฒนาและตรวจสอบความถูกต้องของวิธีการวิเคราะห์สารกลุ่มแคนนาบินอยด์ทั้งหมด 6 ชนิด ได้แก่ Δ^8 -THC, Δ^9 -THC, THCA, THCV, CBD และ CBN ในน้ำมะพร้าว โดยการสกัดอาศัยเทคนิค liquid-liquid extraction แล้ว clean-up ด้วย SPE HLB cartridge ทำการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณโดยเทคนิค LC-MS/MS พบว่าวิธีนี้มีขีดจำกัดของการตรวจพบเท่ากับ 2 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม และค่าขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณเท่ากับ 3 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ช่วงการวิเคราะห์ที่ให้ความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงเท่ากับ 3 – 50 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม และมีค่า correlation coefficient ในช่วง 0.9921 – 0.9985 มีความแม่นยำแสดงด้วยค่าเฉลี่ย %recovery อยู่ในช่วง 91.16 – 113.37% และความเที่ยงแสดงด้วย %RSD อยู่ในช่วง 2.65 – 15.00% วิธีการที่พัฒนาขึ้นนี้มีความน่าเชื่อถือและเหมาะสมในการนำไปใช้ตรวจวิเคราะห์สารแคนนาบินอยด์ในเครื่องดื่มแต่งกลิ่นรส

คำสำคัญ: กัญชา, กัญชง, แคนนาบินอยด์, LC-MS/MS, น้ำมะพร้าว

Corresponding author E-mail sakulrat.so@dmsc.mail.go.th

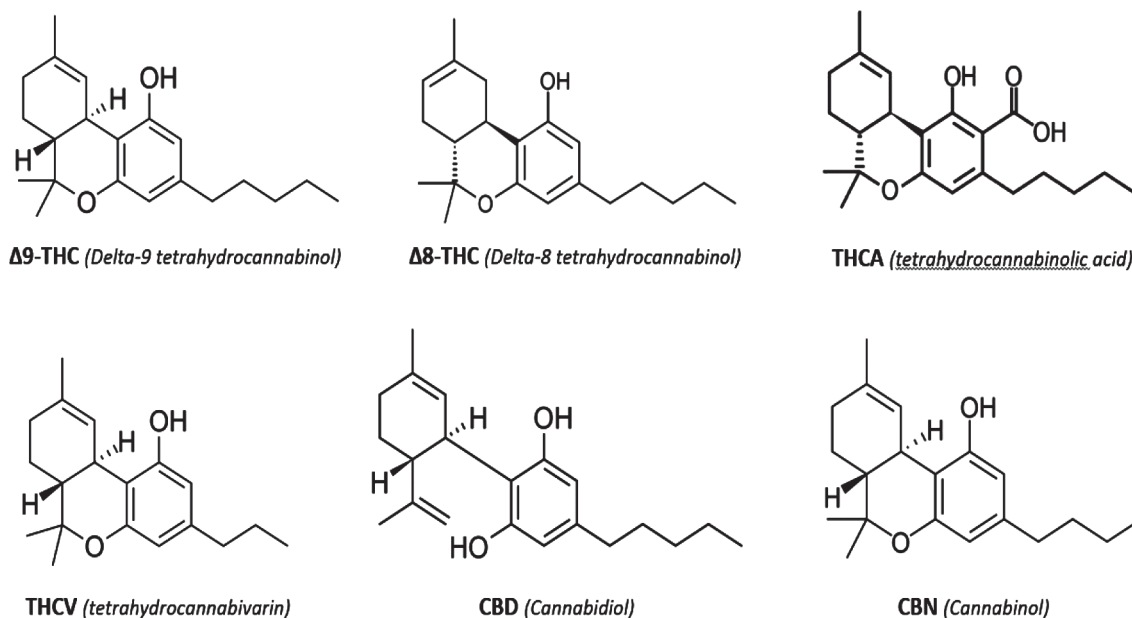
Received: 15 July 2021

Revised: 8 September 2021

Accepted: 10 September 2021

บทนำ

กัญชา (Cannabis) และ กัญชง (Hemp) มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Cannabis sativa* L. เป็นพืชล้มลุกชนิดหนึ่งในวงศ์ Cannabidaceae ซึ่งกำลังได้รับความสนใจจากหลายประเทศทั่วโลก รวมถึงประเทศไทย เนื่องจากมีฤทธิ์ช่วยให้ผ่อนคลาย สดชื่น คลายความตึงเครียดและกังวล บรรเทาความรู้สึกเจ็บปวด และช่วยให้นอนหลับ ซึ่งฤทธิ์นี้มาจากสารเคมีที่เป็นเอกลักษณ์เฉพาะของพืชกัญชาและกัญชง ได้แก่ สารกลุ่มแคนนาบินอยด์ ซึ่งมีมากกว่า 60 ชนิด⁽¹⁾ แบ่งตามลักษณะการออกฤทธิ์ได้เป็น 2 กลุ่ม คือ สารที่ไม่ออกฤทธิ์ต่อจิตและประสาท (non-psychoactive compound) เช่น Tetrahydrocannabinolic acid (THCA), Cannabidiol (CBD) และ Cannabinol (CBN) และสารที่ออกฤทธิ์ต่อจิตและประสาท (psychoactive compound) โดยสารที่สามารถออกฤทธิ์ได้มากที่สุด คือ Δ^9 -Tetrahydrocannabinol (THC) โดยสาร THC นี้จะออกฤทธิ์คล้าย Endocannabinoid ที่พบในร่างกายของสัตว์และมนุษย์ เมื่อจับกับตัวรับจำเพาะ ซึ่งได้แก่ Cannabinoid receptors ชนิด CB1 ที่พบมากในสมอง จะส่งผลให้รู้สึกมีความสุข และยังมีผลต่อสมองส่วนที่รับรู้ความกังวล ความเจ็บปวด การรับรู้ความรู้สึก การควบคุมระบบการเคลื่อนไหวของร่างกาย และระบบต่อมไร้ท่ออีกด้วย ส่วนตัวรับชนิด CB2 จะพบมากที่เซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน และเส้นประสาทส่วนปลาย⁽²⁾ ผลของการได้รับแคนนาบินอยด์จึงคล้ายกับยากระตุ้นประสาท ยากดประสาท ยาหลอนประสาท ยาแก้ปวด และยาที่ออกฤทธิ์ต่อจิตประสาท การนำมาใช้จึงอาจก่อให้เกิดประโยชน์และโทษ ขึ้นอยู่กับปริมาณที่รับเข้าไป และสภาพร่างกายของบุคคล ดังแสดงในตารางที่ 1⁽³⁾



ภาพที่ 1 โครงสร้างของสารกลุ่มแคนนาบินอยด์ในกัญชาและกัญชง⁽³⁾

หลายประเทศมีการปรับเปลี่ยนกฎหมายหรือออกกฎหมายใหม่ที่เกี่ยวข้องกับกัญชาและกัญชงเพื่อเปิดทางสู่การนำไปใช้เชิงพาณิชย์มากขึ้น สำหรับประเทศไทยมีการออกประกาศกระทรวงสาธารณสุขฉบับที่ 424⁽⁴⁾ ระบุให้บางส่วนของพืชกัญชาและกัญชง ได้แก่ เปลือก ลำต้น เส้นใย กิ่งก้าน ราก ใบ (ที่ไม่มีช่อดอกติดมาด้วย) สารสกัด และกากที่เหลือจากการสกัด (ที่มี THC ไม่เกิน 0.2% โดยน้ำหนักแห้ง) เฉพาะที่ได้รับอนุญาตให้ผลิตในประเทศเท่านั้น ปลดพ้นจากการเป็นยาเสพติดให้โทษประเภทที่ 5 และมีการส่งเสริมการนำกัญชาและกัญชงมาใช้ประโยชน์ในผลิตภัณฑ์สุขภาพ เครื่องสำอางและอาหาร เพื่อตอบสนองนโยบายการพัฒนา กัญชาและกัญชงเป็นพืชเศรษฐกิจ ซึ่งได้รับการตอบรับที่ดีมากและมีการนำมาใช้อย่างกว้างขวาง เนื่องจาก CBD เป็นสารจากธรรมชาติที่ให้ฤทธิ์หลากหลายและมีประโยชน์

ต่อสุขภาพ เช่น ช่วยการนอนหลับ เจริญอาหาร ลดการอักเสบ ลดปวด ลดอาการเกร็งกล้ามเนื้อ ป้องกันการเกิดอนุมูลอิสระ สามารถนำไปประยุกต์ใช้เป็นยาและอาหารได้ ส่วนฤทธิ์ในการต่อต้านการอักเสบและอนุมูลอิสระ ช่วยลดความเสียหายของผิวหนังจากแสงแดด กระตุ้นการสร้างคอลลาเจนในผิว เหมาะสมต่อการนำมาใช้ในเครื่องสำอาง สำหรับผลิตภัณฑ์อาหารและเครื่องดื่ม มีการนำส่วนต่างๆ ของกัญชาและกัญชงมาใช้อย่างหลากหลาย เช่น น้ำซุ้ที่ต้มจากลำต้นกัญชา คุกกี้ เบเกอรี่ เยลลี่ และเครื่องดื่มผสมใบกัญชา อาหารเตรียมสำเร็จผสมใบกัญชา น้ำมันผสมสารสกัดกัญชา ซึ่งความเสี่ยงอย่างหนึ่งในการบริโภค คือ อันตรายจากการบริโภคเกินขนาด เนื่องจากการระบุปริมาณการบริโภคที่เหมาะสมเป็นสิ่งที่ทำได้ยาก มีข้อควรคำนึงหลากหลาย เช่น สายพันธุ์ อายุ คุณภาพ และส่วนของกัญชาหรือกัญชงที่นำมาใช้ กระบวนการผลิตและส่วนผสมอื่นๆ ในอาหารและเครื่องดื่ม รวมถึงปัจจัยจากผู้บริโภค เช่น น้ำหนักตัว อายุ เพศ ระบบเมตาบอลิซึม เป็นต้น นอกจากนี้ การบริโภคกัญชาหรือกัญชงต้องใช้ระยะเวลาในการออกฤทธิ์ โดยใช้เวลานานถึง 30 - 90 นาที ในการลำเลียงสาร THC ไปยังสมอง และมีระยะเวลาในการออกฤทธิ์สูงสุดประมาณ 2 - 4 ชั่วโมง หลังจากบริโภค จึงทำให้ผู้บริโภคอาจไม่รู้สึกริเริ่มในขณะแรก และบริโภคจนเกินขนาด ส่งผลให้เกิดอาการคลื่นไส้อาเจียน เวียนศีรษะ วิงเวียน ปวดศีรษะ และหัวใจเต้นแรง หากได้รับในปริมาณที่มากเกินไปอาการอาจรุนแรงจนถึงขั้นประสาทหลอน เห็นภาพลวงตา หูแว่ว หวาดระแวง ความคิดสับสน และควบคุมตัวเองไม่ได้

ประเทศไทยมีการกำหนดปริมาณสูงสุดของสารสำคัญกัญชาและกัญชงในอาหารแต่ละประเภท โดยอ้างอิงจากข้อแนะนำด้านสุขภาพและความปลอดภัยของ Federal Institute for Risk Assessment (Bundesinstitut für Risikobewertung, BfR)⁽⁵⁾ ประเทศเยอรมนีที่ใช้หลักการ ALARA (As Low As Reasonably Achievable) และมีค่าต่ำที่สุดเมื่อเทียบกับประเทศอื่นๆ พบว่า เมื่อเทียบกับค่า Acute Reference Dose (ARfD) ของ total THC ซึ่งเท่ากับ 0.001 mg/kg bw/day⁽⁶⁾ ณ ระดับที่เกณฑ์กำหนดสามารถทำให้เกิดความปลอดภัยสำหรับผู้บริโภคได้ โดยประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 425) พ.ศ. 2564⁽⁷⁾ ได้กำหนดเกณฑ์ให้ผลิตภัณฑ์อาหารที่มีส่วนผสมของเมล็ด น้ำมัน หรือโปรตีนจากเมล็ดกัญชง เช่น ผลิตภัณฑ์ธัญชาติสำหรับอาหารเข้า ผลิตภัณฑ์ขนมอบ ขนมขบเคี้ยว ที่มีมันฝรั่ง ธัญชาติ แป้งหรือสตาร์ช (starch) เป็นส่วนผสม มีค่าการปนเปื้อนสูงสุดของ total THC เท่ากับ 0.15 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และ CBD เท่ากับ 3.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม รวมทั้งมีเกณฑ์สำหรับผลิตภัณฑ์อาหารที่มีส่วนผสมของกัญชาหรือกัญชง ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 427) พ.ศ. 2564⁽⁸⁾ ที่กำหนดให้ตรวจพบสาร THC ได้ไม่เกิน 1.6 มิลลิกรัมต่อหน่วยบรรจุ และ CBD ไม่เกิน 1.41 มิลลิกรัมต่อหน่วยบรรจุ ยกเว้นอาหาร นม อาหารเสริมสำหรับทารกและเด็กเล็ก และเครื่องดื่มที่ผสมกาแฟอื่น

การตรวจวิเคราะห์สารกลุ่มแคนนาบินอยด์ ในผลิตภัณฑ์อาหารและเครื่องดื่มที่มีกัญชาหรือกัญชง จึงเป็นส่วนสำคัญในการคุ้มครองความปลอดภัยของผู้บริโภค ซึ่งเทคนิคในการตรวจวิเคราะห์ นั้นมีหลากหลาย เช่น Gas Chromatography (GC), Liquid Chromatography (LC), Thin Layer Chromatography (TLC), Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) และ Nuclear Magnetic Resonance Spectrometry (NMR) โดยเทคนิคหลักที่นิยมใช้ได้แก่ HPLC และ GC เนื่องจากสามารถวิเคราะห์สารหลายชนิดได้พร้อมกัน มีความจำเพาะและความไวสูง สามารถตรวจสอบสารที่มีปริมาณน้อยได้อย่างแม่นยำ แต่มีข้อดีและข้อจำกัดบางประการ โดย GC มักใช้ร่วมกับ detector แบบ Mass Spectrometry (MS) หรือ Flame Ionization Detection (FID) ข้อดีของการใช้ GC คือสามารถวิเคราะห์สารระเหย (volatile compounds) อื่นๆ ในกัญชาและกัญชงได้ เช่น Terpenes อย่างไรก็ตาม การวิเคราะห์ด้วย GC มีข้อจำกัดคือ ไม่สามารถแยกอนุพันธ์แคนนาบินอยด์ ในรูปกรดและกลาง เช่น THCA และ THC ออกจากกันได้ เนื่องจากในการวิเคราะห์ต้องใช้ความร้อนสูงถึง 300 องศาเซลเซียส จึงทำให้ THCA เกิด decarboxylation กลายเป็น THC และผลการวิเคราะห์ที่ได้จะเป็นผลรวมในรูปของ total THC ดังนั้น หากต้องการวิเคราะห์โดยแยกชนิดสารกัน สาร THCA จะต้องผ่านกระบวนการ derivatisation ก่อน⁽⁹⁾ สำหรับเทคนิค HPLC หรือ LC มี detector ที่สามารถใช้ร่วมกัน ได้แก่ Mass Spectrometry (MS), UV/VIS Spectrophotometer

(UV) และ Diode-Array Detection (DAD) คอลัมน์ที่นิยมใช้ในการแยกสารเป็นประเภท C18 stationary phase เนื่องจากสารกลุ่มแคนนาบินอยด์ มีคุณสมบัติเป็น hydrophobic นอกจากนี้ ประโยชน์ของการใช้ LC คือ สามารถแยกอนุพันธ์ในรูปกรดและกลางได้ เนื่องจากไม่มีการให้ความร้อนสูง THCA จึงไม่เปลี่ยนแปลงไปอยู่ในรูปอื่น แต่มีข้อจำกัดที่ไม่สามารถวิเคราะห์สารระเหยชนิดอื่นๆ ไปพร้อมกันได้ สำหรับวิธีมาตรฐานที่ใช้ตรวจยืนยันสารกลุ่มแคนนาบินอยด์ได้มีการระบุในประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 425 และ 427 (พ.ศ. 2564) ให้ใช้เครื่องมือที่อาศัยหลักการโครมาโตกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) หรือสูงกว่า

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีการสกัดและตรวจวิเคราะห์สารกลุ่มแคนนาบินอยด์ จำนวน 6 ชนิด ได้แก่ Δ^8 -THC, Δ^9 -THC, THCA, THCV, CBD และ CBN ในเครื่องต้ม โดยเทคนิค LC-MS/MS เมื่อได้วิธีการที่เหมาะสมแล้ว จึงทำการทดสอบความถูกต้องของวิธี (method validation) ใช้น้ำมะพร้าวเป็นตัวแทน (representative matrix) ของเครื่องต้มแต่งกลิ่นรส เนื่องจากตัวอย่างของเครื่องต้มที่พบตามท้องตลาดมีลักษณะเป็นเครื่องต้มปรุงแต่งรสหวาน ซึ่งน้ำมะพร้าวพาสเจอร์ไรส์ที่นำมาใช้นี้ มีปริมาณน้ำตาลใกล้เคียงกับตัวอย่างชนิดอื่นๆ จึงนำมาใช้เป็นตัวแทนได้ และทำการวิเคราะห์ method blank, matrix blank, limit of detection (LOD), limit of quantitation (LOQ), linearity and working range, accuracy และ precision ตาม EURACHEM Guide 2014⁽¹⁰⁾ เพื่อยืนยันว่าวิธีที่ได้มีความถูกต้อง เหมาะสม สามารถนำไปใช้ตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างเพื่อประโยชน์ในการขึ้นทะเบียนอาหาร การควบคุมคุณภาพอาหารตามกฎหมาย และการเฝ้าระวังความปลอดภัยให้กับผู้บริโภค นอกจากนี้ ยังมีประโยชน์ต่อการประเมินความเสี่ยง การกำหนดมาตรฐานวิธีทดสอบสารกลุ่มแคนนาบินอยด์ในอาหาร สามารถใช้ผลการวิเคราะห์เป็นข้อมูลพื้นฐานในการวางแผนให้กับหน่วยงานที่เกี่ยวข้อง เพื่อป้องกัน และเฝ้าระวังการใช้สารเหล่านี้ให้เหมาะสมต่อไป

วัสดุและวิธีการ

สารเคมีและสารมาตรฐาน

สารมาตรฐาน: delta 8-Tetrahydrocannabinol (Δ^8 -THC), delta 9-Tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC), Tetrahydrocannabinolic acid (THCA), Tetrahydrocannabivarin (THCV), Cannabinol (CBN) (ผลิตภัณฑ์ของ Lipomed, purity > 98%) และ Cannabidiol (CBD) (ผลิตภัณฑ์ของ Bureau of Drug and Narcotic DMS, purity 99%)

สารเคมี: methanol (CH_3OH), dichloromethane (CH_2Cl_2), acetonitrile (CH_3CN) เป็น HPLC grade และ glacial acetic acid (CH_3COOH) เป็น AR grade

เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่องชั่ง 3 ตำแหน่ง และ 5 ตำแหน่ง, เครื่องบดปั่น, vortex mixer, reciprocal shaker, refrigerated centrifuge, turbo nitrogen evaporator temperature controlled, SPE vacuum manifold, micro pipette ขนาด 10-100, 20-200, 100-1000 และ 1,000-10,000 ไมโครลิตร, screw cap centrifuge tube ขนาด 50 มิลลิลิตร, test tube ขนาด 15 มิลลิลิตร, micro-spin filter tube 0.22 μm PVDF, cellulose nitrate ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 47 mm 0.45 μm , HPLC vials สีขาว ขนาด 1.5 ml, solid phase extraction cartridges (SPE) Oasis HLB 6 cc (200 mg), เครื่อง LC-MS/MS ประกอบด้วย binary pump, autosampler, micro vacuum degasser, thermostatted column compartment: Agilent 1100-API 4000, detector ชนิด triple quadrupole mass spectrometer และคอลัมน์ EC 150/3 NUCLEOSHELL RP 18, 2.7 μm

การเตรียมตัวอย่าง

สกัดสารกลุ่มแคนนาบินอยด์จากตัวอย่าง โดยใช้น้ำมะพร้าวพาสเจอไรส์เป็นตัวแทนในการทดสอบความใช้ได้ของวิธีการวิเคราะห์สำหรับ matrix เครื่องดื่มแต่งกลิ่นรส ตามวิธีการดังนี้ ชั่งตัวอย่าง 10 ± 0.10 กรัม ลงใน screw cap centrifuge tube ขนาด 30 มิลลิลิตร จากนั้นเติม dichloromethane 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixer และเขย่าด้วยเครื่อง shaker เป็นเวลา 10 - 15 นาที ก่อนนำไป centrifuge ที่ 4,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ -4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วดูดสารละลายชั้น dichloromethane ด้านล่างทั้งหมด ใส่ test tube ขนาด 15 มิลลิลิตร ระเหยสารละลายด้วย nitrogen evaporator ที่อุณหภูมิ 40 - 45 องศาเซลเซียส จนเกือบแห้ง และละลาย residue ด้วย methanol 1 มิลลิลิตร

นำไป clean-up ด้วย SPE Oasis HLB 6 cc (200 มิลลิกรัม) โดยมีขั้นตอนดังนี้ (1) Pre-washing: ด้วย methanol 5 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร ตามลำดับ (2) Loading: ใส่สารละลายที่สกัดได้ทั้งหมดลงใน cartridge (3) Washing: ด้วย 25% methanol 3 มิลลิลิตร (4) Eluting: สะสารวิเคราะห์ และเก็บส่วนที่ไหลผ่านลงมา โดยใช้ 90 : 10 acetonitrile : methanol 5 มิลลิลิตร และ 60 : 40 acetonitrile : methanol 3 มิลลิลิตร ตามลำดับ โดยทุกขั้นตอนต้องควบคุมให้มีอัตราการไหลสม่ำเสมอ และ cartridge ไม่แห้งจนเกินไป ระเหยสารสกัดที่ได้จากการ clean-up ด้วยเครื่อง nitrogen evaporator ที่อุณหภูมิ 40 - 45 องศาเซลเซียส จนเกือบหมด นำมาละลายด้วย acetonitrile 500 ไมโครลิตร กรองผ่าน PVDF filter ขนาด 0.2 ไมโครเมตร แล้วเทสารสกัดใส่ HPLC vial สีชา ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เพื่อนำไปตรวจวิเคราะห์ชนิดและปริมาณด้วยเครื่อง LC-MS/MS

การวิเคราะห์ด้วย LC-MS/MS

สภาวะเครื่องมือ Liquid chromatography : Agilent 1100

mobile phase เป็นระบบตัวทำละลาย 2 ชนิด โดยตัวทำละลาย A คือ 0.1% acetic acid in DI water : methanol (95 : 5) และตัวทำละลาย B คือ 0.1% acetic acid in acetonitrile : methanol (95 : 5) อุณหภูมิของคอลัมน์เท่ากับ 40 องศาเซลเซียส injection volume เท่ากับ 5 ไมโครลิตร และสภาวะที่ใช้ในการแยกสารกลุ่มแคนนาบินอยด์ เป็นแบบ isocratic ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 LC conditions สำหรับการวิเคราะห์สารกลุ่มแคนนาบินอยด์

Time	Mobile phase A (%)	Mobile phase B (%)	Flow rate
0	27	73	0.7
15	27	73	0.7

สภาวะเครื่องมือ Mass spectrometer : API 4000

การวิเคราะห์โดย MS/MS สารจะถูกทำให้เป็นไอออนบวกและลบ โดย electrospray ionization (ESI) ไอออนที่ได้จะถูกวิเคราะห์ด้วย Multiple reaction monitoring (MRM) mode โดยมีสภาวะของ mass spectrometer ดังตารางที่ 2 และ 3

การทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์

การสร้างกราฟมาตรฐาน

เตรียม matrix-matched calibration curve โดยใช้น้ำมะพร้าวที่เป็น matrix blank จำนวน 6 หลอด แล้วเติมสารมาตรฐาน Δ^8 -THC, Δ^9 -THC, THCA, THCV, CBD และ CBN ที่ 6 ระดับความเข้มข้น ได้แก่

0, 3, 5, 10, 30 และ 50 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม จากนั้นทำการสกัดและทำให้บริสุทธิ์เหมือนการสกัดตัวอย่าง สร้างกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐาน (แกน x) กับ peak area ของสารมาตรฐาน (แกน y) และคำนวณหาค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (coefficient of determination, r^2)

ตารางที่ 2 MS/MS พารามิเตอร์สำหรับการวิเคราะห์สารกลุ่มแคนนาบินอยด์

Ionization mode	ESI, positive and negative
Ion spray voltage	5500 eV
Temperature TEM	500°C
collision gas, CAD	Nitrogen, 7 psig
curtain gas (CUR)	25 psig
ion spray nebulizer gas (GS-1)	60 psig
TIS Heater Gas (GS-2)	60 psig

ตารางที่ 3 M/Z ของสารกลุ่มแคนนาบินอยด์ และ fragmentation conditions

compound name	precursor ion (m/z)	product ion (m/z)	Dwell time (m/z)	DP (ms)	CE (eV)	RT (min)
Δ^9 -THC	315.00	193.000 (primary)	50	70	31	6.28
		135.000 (secondary)	50	70	27	
Δ^8 -THC	315.100	193.100 (primary)	50	70	31	5.97
		135.100 (secondary)	50	70	25	
THCA	357.400	313.000 (primary)	50	-100	-35	8.41
		245.200 (secondary)	50	-100	-42	
THCV	286.900	165.000 (primary)	50	60	30	3.29
		123.000 (secondary)	50	60	45	
CBN	311.000	222.900 (primary)	50	80	30	4.65
		241.100 (secondary)	50	80	30	
CBD	315.000	123.100 (primary)	50	73	45	3.09
		259.000 (secondary)	50	73	24	

การวิเคราะห์ method blank และ matrix blank

วิเคราะห์ method blank โดยสกัดตามวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนา ด้วยการใช้สารเคมีทั้งหมดแต่ไม่มีการเติมตัวอย่าง และ matrix blank โดยการสกัดน้ำมะพร้าวที่ไม่มีการปนเปื้อนของสารกลุ่มแคนนาบินอยด์ ตามวิธีวิเคราะห์ข้างต้น ฉีดสารสกัด method blank และ matrix blank เข้าเครื่อง LC-MS/MS เพื่อดูว่ามี m/z หรือ peak ที่รบกวน ตรงกับตำแหน่งของสารมาตรฐานหรือไม่

การหาขีดจำกัดของการตรวจพบ (limit of detection, LOD)

ทดสอบโดยเติมสารมาตรฐานทั้ง 6 ชนิด ที่ระดับความเข้มข้น 2 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ลงใน matrix blank วิเคราะห์ 10 ซ้ำ แล้วตรวจสอบค่า signal/noise โดยผลต้องไม่พบ false negative

การหาขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (limit of quantitation, LOQ)

ทดสอบโดยเติมสารมาตรฐานทั้ง 6 ชนิด ที่ระดับความเข้มข้น 3 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ลงใน matrix blank วิเคราะห์ 10 ซ้ำ คำนวณปริมาณเทียบกับ calibration curve แล้วคำนวณ %recovery, %RSD และ HORRAT

การทดสอบความเป็นเส้นตรง และช่วงการวิเคราะห์

ทดสอบโดยเติมสารมาตรฐานลงใน matrix blank ที่ระดับความเข้มข้นตาม calibration curve ทั้งหมด 6 ระดับ ได้แก่ 0, 3, 5, 10, 30 และ 50 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม วิเคราะห์ระดับละ 3 ซ้ำ สร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐาน กับ peak area ของสารมาตรฐานทั้ง 6 ชนิด และคำนวณหาค่า r^2

การทดสอบความแม่นยำ และความเที่ยง

ทดสอบโดยเติมสารมาตรฐานทั้ง 6 ชนิด ที่ระดับความเข้มข้น 3, 5 และ 50 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ลงใน matrix blank วิเคราะห์ระดับละ 10 ซ้ำ คำนวณปริมาณเทียบกับ calibration curve แล้วคำนวณ ค่าเฉลี่ย %recovery, %RSD และ HORRAT โดยประเมินผลการทดสอบความถูกต้องของวิธีตามเกณฑ์ที่กำหนดดังนี้

ความแม่นยำ (accuracy) กำหนดเกณฑ์ยอมรับโดยค่าเฉลี่ย %recovery อยู่ในช่วง 60 – 120% ความเที่ยง (precision) เกณฑ์ยอมรับโดยใช้ HORRAT (Horwitz ratio) ที่ Codex และ EU กำหนดไว้ที่ ≤ 2 ซึ่ง HORRAT (Horwitz ratio) คำนวณจาก

$$\text{HORRAT} = \frac{\text{Experimental RSDr}}{\text{Predicted RSDr}}$$

การประเมินค่าความไม่แน่นอนของการวิเคราะห์

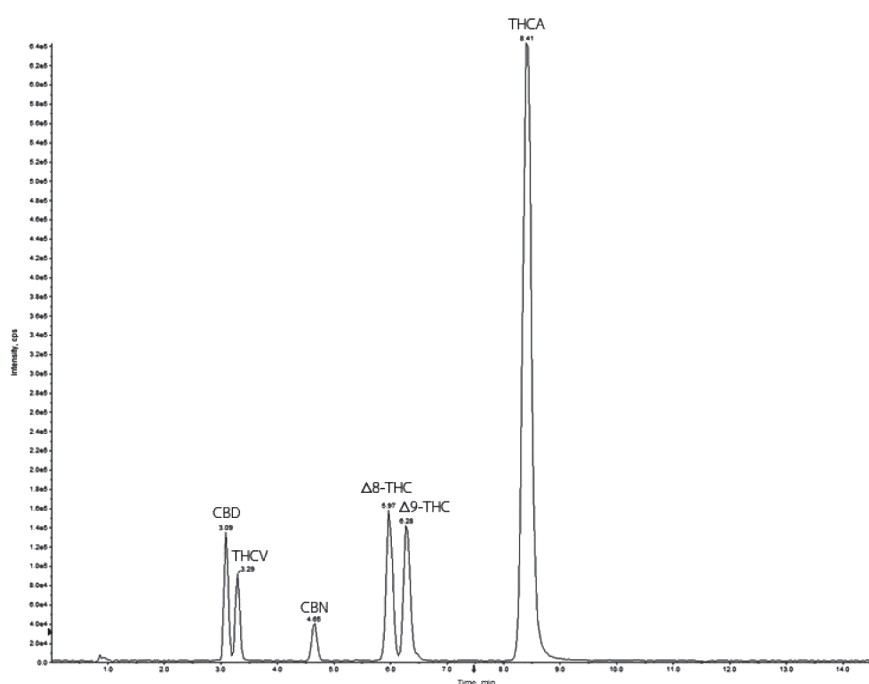
การประเมินค่าความไม่แน่นอนของการวัด⁽¹¹⁾ คำนึงถึงแหล่งของความไม่แน่นอนจากทุกแหล่ง ได้แก่ น้ำหนัก ปริมาตร กราฟมาตรฐาน ความเที่ยง และความแม่นยำ แล้วคำนวณรวมค่าความไม่แน่นอนทั้งหมด จากนั้นหาค่าความไม่แน่นอนขยายที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($k = 2$) เพื่อประเมินค่าความไม่แน่นอนของการวิเคราะห์ตามวิธีที่ได้ทดสอบ

ปริมาณสารที่พบหน่วยเป็นไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ($\mu\text{g/kg}$) และคำนวณความเข้มข้นของสารที่ตรวจพบจาก standard curve

$$\begin{aligned} \text{โดยใช้สมการเส้นตรง} \quad Y &= aX + b \\ \text{ปริมาณของสารที่ตรวจพบ} \quad CA (\mu\text{g/kg}) &= (Y - b)/a \\ \text{โดย} \quad X &= \text{concentration} \\ Y &= \text{peak area} \\ C_A &= \text{conc. of analyte } (\mu\text{g/kg}) \\ a &= \text{slope ของ calibration curve} \\ b &= \text{intercept ของ calibration curve} \end{aligned}$$

ผล

จากการศึกษาการวิเคราะห์สารกลุ่มแคนนาบินอยด์ ทั้ง 6 ชนิด ได้แก่ Δ^8 -THC, Δ^9 -THC, THCA, THCV, CBD และ CBN ภายใต้วิธีการและสภาวะที่กำหนด สามารถสร้างกราฟมาตรฐานความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้น กับ peak area ของสารมาตรฐานดังกล่าวได้ ในช่วงความเข้มข้น 3 – 50 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ได้กราฟที่เป็นเส้นตรง มีค่า r^2 ในช่วง 0.9921 – 0.9985 และมีลักษณะของ peak ดังแสดงในภาพที่ 2 และเมื่อวิเคราะห์ method blank ของสารเคมีที่ใช้ทั้งหมด และ matrix blank ของตัวอย่างน้ำมะพร้าว ไม่พบ peak รบกวนในช่วงของการตรวจวัดสารเป้าหมาย



ภาพที่ 2 โครมาโตแกรมของสารมาตรฐานแคนนาบินอยด์ 6 ชนิด ได้แก่ Δ^9 -THC, Δ^8 -THC, THCA, THCV, CBD และ CBN วิเคราะห์ด้วยเครื่อง LC-MS/MS

ผลการทดสอบขีดจำกัดของการตรวจพบ (LOD) ของสารกลุ่มแคนนาบินอยด์ ทั้ง 6 ชนิด สำหรับ matrix เครื่องดื่ม เท่ากับ 2 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม โดยให้สัญญาณ S/N สูงกว่า 3 เท่า ในทุกตัวอย่าง ส่วนค่าขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (LOQ) เท่ากับ 3 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ผลการพิสูจน์ค่า LOQ โดยการเติมสารมาตรฐานและวิเคราะห์ 10 ซ้ำ พบว่า มีค่าความแม่นยำที่ประเมินจากค่าเฉลี่ย %recovery ในช่วง 103.93 – 113.37% และ %RSD ในช่วง 2.6 – 4.3% ความเที่ยงจาก HORRAT อยู่ในช่วง 0.10 – 0.17 ดังแสดงในตารางที่ 4

ผลการทดสอบความเป็นเส้นตรงและช่วงการวิเคราะห์ (linearity and working range) ที่ช่วงความเข้มข้น 3 – 50 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ได้กราฟเส้นตรง มีค่า r^2 ในช่วง 0.9921 – 0.9985 ส่วนการทดสอบค่าความแม่นยำและความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์ที่ระดับความเข้มข้น 3, 5 และ 50 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ พบว่า มีค่าความแม่นยำที่ประเมินจากค่าเฉลี่ย %recovery ของสาร Δ^8 -THC, Δ^9 -THC, THCA, THCV, CBD และ CBN อยู่ในช่วง 92.20 – 108.20, 95.96 – 107.53, 94.00 – 112.70, 91.16 – 113.37, 96.02 – 106.96 และ 94.82 – 109.13% ตามลำดับ ซึ่ง %recovery ที่ทุกระดับความเข้มข้นอยู่ในช่วงการยอมรับ 60 – 120% และความเที่ยง (precision) ที่ประเมินจาก %RSD และ HORRAT อยู่ในช่วง 2.65 – 15.00% และ 0.10 – 0.90 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 4 ผลการวิเคราะห์สารกลุ่มแคนนาบินอยด์ในตัวอย่างน้ำมะพร้าวที่ค่า LOD และ LOQ

	$\Delta 9$ -THC	$\Delta 8$ -THC	THCA	THCV	CBD	CBN
Limit of Detection (LOD)						
2 $\mu\text{g/kg}$						
Range of S/N	30.7 – 54.9	15.6 – 30.5	35.1 – 153.9	11.6 – 34.1	13.8 – 59.1	5.9 – 12.9
Average S/N	39.40	22.07	69.18	17.15	30.03	8.58
Limit of Quantification (LOQ) 3 $\mu\text{g/kg}$						
Average conc. ($\mu\text{g/kg}$)	3.23	3.25	3.26	3.40	3.12	3.27
Recovery (%)	107.53	108.20	108.57	113.37	103.93	109.13
Standard deviation (SD)	0.14	0.13	0.09	0.13	0.13	0.10
Relative standard deviation (%RSD)	4.31	4.01	2.65	3.86	4.33	2.94
%RSD _{expected}	25.32	25.32	25.32	25.32	25.32	25.32
HORRAT	0.17	0.16	0.10	0.15	0.17	0.12

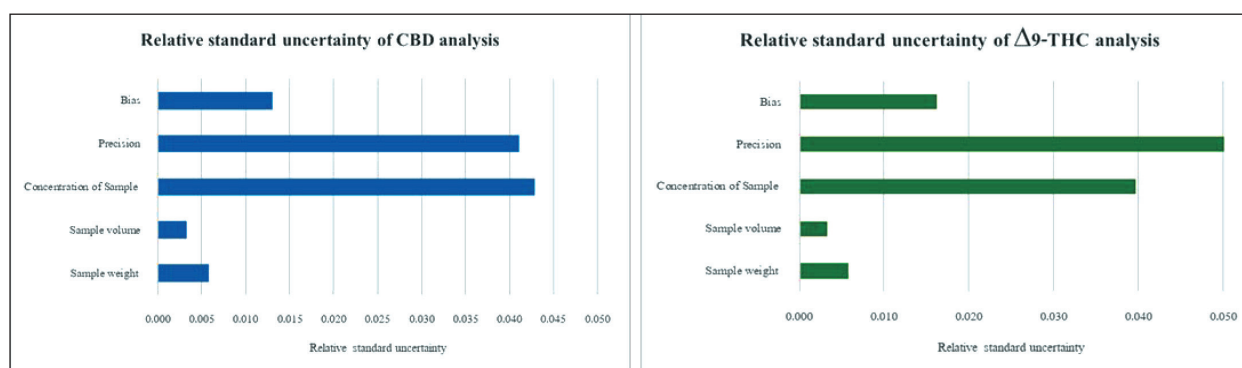
ตารางที่ 5 Accuracy และ precision ของวิธีการวิเคราะห์แคนนาบินอยด์ในน้ำมะพร้าว

สารมาตรฐาน	Spiked level ($\mu\text{g/kg}$)	%recovery (n=10) Min - Max	Mean $\pm$ SD	%RSD (เกณฑ์ยอมรับ $\leq 20\%$)	HORRAT (เกณฑ์ยอมรับ ≤ 2)
$\Delta 8$ -THC	3	99.67 – 114.33	108.20 $\pm$ 4.34	4.01	0.16
	5	95.60 – 111.20	104.50 $\pm$ 4.62	4.42	0.19
	50	69.80 – 109.40	92.20 $\pm$ 13.83	15.00	0.90
$\Delta 9$ -THC	3	100.67 – 113.33	107.53 $\pm$ 4.64	4.31	0.17
	5	99.20 – 109.60	105.38 $\pm$ 3.69	3.51	0.15
	50	77.20 – 115.0	95.96 $\pm$ 14.32	14.32	0.86
THCA	3	105.67 – 113.67	108.57 $\pm$ 2.88	2.65	0.10
	5	103.40 – 120.00	112.68 $\pm$ 5.38	4.78	0.20
	50	75.60 – 110.20	94.00 $\pm$ 13.60	14.47	0.87
THCV	3	104.33 – 118.67	113.37 $\pm$ 4.38	3.86	0.15
	5	97.60 – 118.60	109.52 $\pm$ 8.09	7.39	0.32
	50	74.40 – 103.80	91.16 $\pm$ 10.19	11.18	0.67
CBD	3	97.00 – 110.00	103.93 $\pm$ 4.50	4.33	0.17
	5	99.80 – 115.00	106.96 $\pm$ 4.95	4.63	0.20
	50	74.60 – 107.00	96.02 $\pm$ 10.14	10.56	0.64
CBN	3	102.33 – 112.67	109.13 $\pm$ 3.21	2.94	0.12
	5	97.00 – 113.00	104.12 $\pm$ 5.36	5.15	0.22
	50	75.00 – 112.80	94.82 $\pm$ 11.94	12.60	0.76

การประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวิเคราะห์ นำการวิเคราะห์สาร CBD และ $\Delta 9$ -THC ในน้ำมะพร้าวเป็นตัวอย่าง พบแหล่งที่มาของความไม่แน่นอน ได้แก่ น้ำหนักของตัวอย่าง ปริมาตร ความเข้มข้นที่อ่านได้จาก calibration curve สารมาตรฐาน bias และ precision เมื่อคำนวณค่าความไม่แน่นอนขยายของสาร CBD และ $\Delta 9$ -THC พบว่ามีค่าเท่ากับ $\pm 12.2\%$ และ 13.4% ตามลำดับ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ดังแสดงในตารางที่ 6 และภาพที่ 3 และเปรียบเทียบสัดส่วนค่าความไม่แน่นอน จากแหล่งความไม่แน่นอนที่ส่งผลต่อปริมาณสาร CBD จากมากไปน้อย ได้แก่ calibration curve (4.3%) ความเที่ยง (4.1%) ความเบี่ยงเบนจากค่าจริง (1.3%) การชั่งน้ำหนัก (0.6%) และปริมาตร (0.3%) สำหรับ $\Delta 9$ -THC ได้แก่ ความเที่ยง (5.1%) calibration curve (4.0%) ความเบี่ยงเบนจากค่าจริง (1.6%) การชั่งน้ำหนัก (0.6%) และปริมาตร (0.3%) ตามลำดับ

ตารางที่ 6 การประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวิเคราะห์สำหรับสาร CBD และ $\Delta 9$ -THC

Source of uncertainty	unit	x	CBD		x	$\Delta 9$ -THC	
			u(x)	Percent		u(x)	Percent
1. Sample weight	g	10	0.06	0.58	10	0.06	0.58
2. Sample volume	mL	5	0.02	0.33	5	0.02	0.33
3. Concentration of Sample	$\mu\text{g/kg}$	50.83	2.18	4.29	50.33	1.99	3.96
4. Precision	%	100	4.10	4.10	100	5.12	5.12
5. Bias	%	100	1.30	1.30	100	1.62	1.62
- Combined relative standard uncertainty of sample conc.	$\mu\text{g/kg}$	50.83	3.11	6.11	50.33	3.38	6.71
- Expanded Uncertainty at C.I. 95 % (k=2)			6.21	12.23		6.75	13.41



ภาพที่ 3 Relative standard uncertainty ของการวิเคราะห์ CBD และ $\Delta 9$ -THC จากแหล่งความไม่แน่นอนต่าง ๆ

วิจารณ์

สารวิเคราะห์ทั้ง 6 ชนิดที่ได้ทำการตรวจวิเคราะห์โดยเทคนิค LC-MS/MS ครอบคลุมตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่อง ผลิตภัณฑ์อาหารที่มีสารสกัดแคนนาบิไดโอยด์เป็นส่วนประกอบ ที่มีค่ากำหนดสำหรับสาร CBD และ THC นอกจากนี้การวิเคราะห์ยังครอบคลุมอนุพันธ์อื่นๆ ที่สำคัญ ได้แก่ total THC หรือปริมาณสารออกฤทธิ์ THC ทั้งหมดที่สามารถพบได้หลังจากกัญชาหรือกัญชงได้รับความร้อน เช่น จากกระบวนการการต้มหรือพาสเจอร์ไรส์ในการผลิตเครื่องดื่ม ซึ่งคำนวณจากผลรวมของ $\Delta 8$ -THC, $\Delta 9$ -THC และ THCA โดย THCA เป็นสารที่ไม่ออกฤทธิ์

ต่อจิตประสาทโดยตรง แต่เมื่อได้รับความร้อนที่อุณหภูมิ ตั้งแต่ 85 องศาเซลเซียส ขึ้นไป สามารถเกิด decarboxylation และกลายเป็น THC โดยการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 3 ชั่วโมง หรือที่อุณหภูมิสูง 160 องศาเซลเซียส 10 นาที และ 200 องศาเซลเซียส ไม่กี่วินาที สามารถเปลี่ยน THCA ทั้งหมดไปเป็น THC ได้อย่างสมบูรณ์⁽¹²⁾ และ จะเริ่มระเหยตั้งแต่อุณหภูมิ 157 องศาเซลเซียส ขึ้นไป ดังนั้นการให้ความร้อนสูงในระยะเวลาที่นานเกินไปจะทำให้ปริมาณสาร THC ลดลงเป็นอย่างมาก⁽¹³⁾ สำหรับสาร Δ^8 -THC ซึ่งเป็นสารที่ไม่ออกฤทธิ์และเป็นไอโซเมอร์ของ Δ^9 -THC สามารถเปลี่ยนแปลงโครงสร้างผ่านการเกิด isomerization กลายเป็นสารออกฤทธิ์ Δ^9 -THC ได้ นอกจากนี้วิธีการวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นสามารถใช้ตรวจวิเคราะห์ CBN ได้เช่นกัน ซึ่ง CBN เป็นสารที่เกิดจากการสลายตัวของ THCA และ THC เมื่อได้รับความร้อน 85 - 100 องศาเซลเซียส และเพื่อให้สามารถระบุปริมาณสารสำคัญได้อย่างครอบคลุม ควรเพิ่มเติมการตรวจวิเคราะห์สาร Cannabidiolic acid (CBDA) เนื่องจาก CBDA เป็นสารตั้งต้นที่สามารถเปลี่ยนเป็น CBD ผ่าน decarboxylation เช่นเดียวกับการเปลี่ยนจาก THCA เป็น THC แต่จะมีอัตราการเกิดปฏิกิริยาช้ากว่าประมาณ 2 เท่า⁽³⁾

อนุพันธ์ในกลุ่ม แคนนาบินอยด์ มีโครงสร้างเป็น bi- หรือ tri-cyclic ซึ่งประกอบด้วยธาตุคาร์บอนและไฮโดรเจนเป็นหลัก มีออกซิเจน 2 อะตอม จึงมีคุณสมบัติเป็นสารไม่มีขั้ว (hydrophobic) ละลายได้ไม่ดีในน้ำหรือตัวทำละลายที่มีขั้วมาก แต่ละลายได้ดีในตัวทำละลายอินทรีย์ โดยเฉพาะไขมันและแอลกอฮอล์⁽¹⁴⁾ และมีอนุพันธ์ที่เป็นกรด เช่น THCA ซึ่งประกอบไปด้วยออกซิเจน 4 อะตอม และมีหมู่ฟังก์ชันเป็นกรดคาร์บอกซิลิก จึงเป็นสารที่มีขั้วมากกว่าอนุพันธ์อื่นๆ ดังนั้นการเลือกใช้ตัวทำละลายที่เหมาะสมจึงมีความสำคัญอย่างมากในการสกัดให้ได้ recovery สูง และทำให้สารสกัดบริสุทธิ์ ไม่มีสารปนเปื้อนมากเกินไป การใช้ตัวทำละลายที่มีขั้วปานกลาง (intermediate polarity) ผสมกัน เป็นอีกทางเลือกหนึ่ง แต่ต้องมีการปรับชนิดและสัดส่วนให้เหมาะสม⁽¹⁵⁾ งานวิจัยก่อนหน้านี้⁽¹⁶⁾ ได้ทำการสกัดสารกลุ่มแคนนาบินอยด์จากน้ำอัดลม โดย degassing ด้วยวิธีการ sonication และใช้ 1 : 99 acetic acid : acetonitrile เป็นตัวทำละลาย ก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วย LC-MS/MS อย่างไรก็ดีตาม วิธีการนี้ใช้หลักการเจือจาง ซึ่งทำให้ได้ค่า LOD และ LOQ สูงเกินกว่าที่ต้องการ เนื่องจากข้อแนะนำระบุการปนเปื้อนสูงสุดของ THC ในเครื่องดื่มไว้เพียง 0.005 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม จึงทดลองโดยใช้วิธีการ liquid-liquid extraction (LLE) และใช้ตัวทำละลายเป็น dichloromethane ซึ่งเป็นตัวทำละลายอินทรีย์ที่ค่อนข้างมีขั้วน้อย มี polarity index เท่ากับ 3.1 ทำให้แยกชั้นกับตัวอย่างเครื่องดื่มและสามารถดึงสารกลุ่มแคนนาบินอยด์ออกมาในชั้นตัวทำละลายอินทรีย์ รวมทั้งแยกสารที่ละลายได้ในน้ำชนิดอื่นๆ ที่อาจรบกวนการวิเคราะห์ เช่น น้ำตาล เกลือแร่ ออกไป มีงานวิจัยที่ใช้การสกัดด้วยวิธีการ LLE เช่นกัน⁽¹⁷⁾ โดยเป็นการสกัดผลิตภัณฑ์จากกัญชง เช่น เครื่องดื่ม เบียร์ ชา และวอดก้า ด้วยตัวทำละลายผสมระหว่าง ethyl acetate : hexane อัตราส่วน 1 : 9 ซึ่งมี polarity index เท่ากับ 4.4 และ 0.1 ตามลำดับ

การวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Liquid chromatography หากเป็นการวัดที่ระดับความเข้มข้นสูง เช่น ในระดับ มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม สามารถใช้ detector ชนิด UV และตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 220 นาโนเมตร⁽¹⁸⁾ แต่สำหรับวิธีการที่พัฒนาขึ้นนี้ มีเป้าหมายเพื่อตรวจวัดในระดับที่ต่ำกว่า 5 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม จึงเลือกใช้เทคนิค LC-MS/MS ซึ่งมีความไวและจำเพาะกับสารวิเคราะห์ที่ต้องการ เนื่องจากเป็นการตรวจวัด m/z ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะตัวของสารแต่ละชนิด ยกเว้นสารที่เป็น isomer กันบางชนิด ในการวิเคราะห์นี้ ได้แก่ Δ^8 -THC และ Δ^9 -THC ซึ่งมีค่า m/z เท่ากันทั้ง precursor ion และ product ions⁽¹⁹⁾ ดังนั้นการแยกสารทั้งสองชนิดนี้ออกจากกันรวมถึงการแยกอนุพันธ์อื่น ๆ เพื่อให้สามารถระบุชนิดและปริมาณได้อย่างถูกต้อง ต้องอาศัยการใช้ mobile phase และ stationary phase ที่เหมาะสม มีงานวิจัยรายงานว่า คอลัมน์ชนิด C18 ซึ่งเป็น reversed-phase chromatography มีประสิทธิภาพสูงในการแยกสารกลุ่มแคนนาบินอยด์⁽⁹⁾ ในการพัฒนาวิธีครั้งนี้ เคยทดลองใช้ Zorbax SB-C18 column ผลพบว่า ไม่สามารถแยกสาร Δ^8 -THC และ Δ^9 -THC ออกจากกันได้ โดยสารทั้งสองชนิดมีการ co-elute ออกมาพร้อมกันเป็น single peak จึงเปลี่ยนคอลัมน์เป็นชนิด EC 150/3 NUCLEOSHELL RP 18, 2.7 μ m ซึ่งมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเล็กลง

และมีความจำเพาะกับการแยกสารในกลุ่มแคนนาบินอยด์ จึงสามารถแยกอนุพันธ์ทั้ง 6 ชนิด ออกจากกันได้อย่างชัดเจน อย่างไรก็ตาม การใช้คอลัมน์นี้ ส่งผลให้ความดันในส่วนของ LC ค่อนข้างสูง และความระมัดระวังไม่ให้มีอนุภาคขนาดใหญ่เข้าสู่คอลัมน์ เนื่องจากมีเส้นผ่านศูนย์กลางขนาดเล็กมาก ดังนั้นควรกรองสารสกัดด้วย filter ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 0.2 ไมครอนเมตร ทุกครั้งก่อนนำไปฉีดเข้าเครื่อง LC อีกทั้งการเลือกใช้ mobile phase มีความสำคัญในการแยกสาร ซึ่งพบว่าการใช้ mobile phase ที่เติม formic acid เล็กน้อย สามารถช่วยให้ลักษณะของ peak ดีขึ้นได้และช่วยให้สารแยกออกจากกันได้ดีขึ้น⁽²⁰⁾ มีการศึกษารายงานว่าการใช้ mobile phase ที่มี pH 5 สามารถแยกสารได้ดีขึ้น peak มีความสมมาตรมากขึ้นและมี baseline น้อยกว่าที่ pH 7.15⁽²¹⁾ โดยในการพัฒนานี้ขึ้นแรกใช้ mobile phase ชนิด 0.1% formic acid in DI water และ 0.1% formic acid in acetonitrile พบว่ามีความสามารถในการแยกสารทั้ง 6 ชนิดได้ แต่เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ 0.1% acetic acid in (95 : 5) DI water : methanol และ 0.1% acetic acid in (95 : 5) acetonitrile : methanol พบว่า peak ของแต่ละสารมีการแยกกันชัดเจนมากขึ้น ลักษณะของ peak มีความสมมาตรกัน และ intensity สูงขึ้น

จากการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ ผ่านการทดสอบในทุกพารามิเตอร์ ค่า precision ที่ได้มีค่า HORRAT น้อยกว่า 2 ซึ่งเป็นไปตามเกณฑ์ของ Codex และ EU กำหนดไว้ นอกจากนี้ยังได้มีการวางแผนการควบคุมคุณภาพภายใน (internal quality control) เพื่อความมั่นใจในผลการวิเคราะห์ตัวอย่างทุก batch โดยจะทำการทดสอบ method blank, matrix blank, duplication และ spiked sample ที่ระดับ 0.005 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ควบคุม %recovery ให้อยู่ในช่วง 60 – 120% โดยการนำ control chart สำหรับกราฟมาตรฐานของสารบางชนิดที่มี r^2 น้อยกว่า 0.995 เนื่องจากการทำ matrix-matched calibration curve จึงทำให้อาจมีความแปรผันจากขั้นตอนการสกัด ส่งผลให้บางจุดเบี่ยงเบนไปจากกราฟเส้นตรง เมื่อพิจารณาถึงความสมเหตุสมผลของค่าความไม่แน่นอน โดยใช้เกณฑ์การคำนวณจากค่า standard deviation ซึ่งค่าความไม่แน่นอนที่เหมาะสมควรน้อยกว่า 2 เท่าของ predicted Horwitz's RSD⁽²²⁾ โดยค่าความไม่แน่นอนที่ควรจะเป็นจากการคำนวณ เท่ากับ 46.9% ส่วนค่าความไม่แน่นอนขยาย ($k = 2$) ของวิธีจากแหล่งความไม่แน่นอนต่าง ๆ สำหรับการวิเคราะห์ CBD และ $\Delta 9$ -THC มีค่าเท่ากับ 12.2% และ 13.4% ตามลำดับ ซึ่งมีค่าน้อยกว่าเกณฑ์กำหนดประมาณ 3 – 4 เท่า เนื่องจากการทำ calibration curve แบบ matrix-matched calibration curve ซึ่งเป็นการเติมสารมาตรฐานที่ความเข้มข้นระดับต่าง ๆ ลงใน matrix blank ที่มีความใกล้เคียงกับตัวอย่างจริง และทำการสกัดตามขั้นตอนการวิเคราะห์เช่นเดียวกับตัวอย่าง จึงเป็นการชดเชยผลกระทบจากลักษณะตัวอย่าง (matrix effect) และชดเชยการสูญเสียของสารที่สนใจที่อาจเกิดขึ้นในขั้นตอนการสกัด ทำให้สามารถลดค่าความไม่แน่นอนจากแหล่งความไม่แน่นอนที่มาจาก recovery ลงได้ เช่น ค่าความไม่แน่นอนจากความเบี่ยงเบนจากค่าจริง (bias) นอกจากนี้การเลือกใช้สารมาตรฐานและเครื่องมือที่มีค่าความไม่แน่นอนน้อย ก็มีผลทำให้ค่าความไม่แน่นอนของวิธีลดลงได้เช่นกัน สุดท้ายนี้ เนื่องจากเครื่องเดิมเป็น matrix ที่มีความหลากหลายการนำไปประยุกต์ใช้กับเครื่องเดิมชนิดอื่น ๆ จึงควรทำการทดสอบ working range ก่อน ซึ่งผู้วิจัยจะดำเนินการต่อไปในอนาคต

สรุป

วิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นสามารถใช้ตรวจสอบสารกลุ่มแคนนาบินอยด์ในน้ำมะพร้าวได้ทั้งหมด 6 ชนิด ได้แก่ $\Delta 8$ -THC, $\Delta 9$ -THC, THCA, THCV, CBD และ CBN โดยเทคนิค LC-MS/MS เป็นวิธีที่มีสมรรถนะผ่านเกณฑ์การยอมรับของการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ทางเคมีโดยห้องปฏิบัติการเดียว มีความถูกต้องแม่นยำ มีความไว และมีความจำเพาะต่อสารที่ต้องการทดสอบ เหมาะกับการใช้งานตามวัตถุประสงค์ สามารถนำวิธีนี้ไปใช้ในการตรวจวิเคราะห์เพื่อควบคุมคุณภาพอาหารควบคุมเฉพาะ ตามร่างประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่อง ผลิตภัณฑ์อาหารที่มีสารสกัด Cannabidiol (CBD) เป็นส่วนประกอบ รวมถึงสามารถใช้ในการตรวจวิเคราะห์

เพื่อสำรวจปริมาณสารแคนนาบินอยด์ในผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มประเภทอื่น ๆ ที่มีกัญชาหรือกัญชง เพื่อเป็นข้อมูลประกอบการประเมินความปลอดภัยในการบริโภคอาหารประเภทนี้ของคนไทยต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณนางลัดดา แก้วกล้าปัญญาเจริญ หัวหน้าฝ่ายยาเสพติดและวัตถุออกฤทธิ์ และบุคลากรทุกท่านในฝ่ายที่ช่วยดำเนินการพัฒนาวิธีการวิเคราะห์และสนับสนุนในทุกขั้นตอน จนการศึกษานี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

1. Newton DE. Marijuana : a reference handbook. 2nd ed. California : ABC-CLIO; 2017.
2. ยาใจ อภิบุณโยภาส, วินัย วนานุกูล. ภาวะพิษจากกัญชา. จุลสารพิษวิทยา 2552; 17(2) : 3-5.
3. Wang M, Wang YH, Avula B, Radwan MM, Wanas AS, van Antwerp J, et al. Decarboxylation study of acidic cannabinoids : a novel approach using ultra-high-performance supercritical fluid chromatography/photodiode array-mass spectrometry. Cannabis Cannabinoid Res 2016; 1(1) : 262-71.
4. พระราชบัญญัติอาหาร พ.ศ. 2522. ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 424 (พ.ศ. 2564) เรื่อง กำหนดอาหารที่ห้ามผลิต นำเข้า หรือจำหน่าย. ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 138 ตอนพิเศษ 45 ง (วันที่ 25 กุมภาพันธ์ 2564). หน้า 32.
5. BfR. BgVV empfiehlt Richtwerte für THC (tetrahydrocannabinol) in hanfhaltigen Lebensmitteln. [online]. 2000; [cited 2021 Jul 9]; [1 screen]. Available from : URL : https://www.bfr.bund.de/de/presseinformation/2000/07/bgvv_empfiehl_richtwerte_fuer_thc_tetrahydrocannabinol_in_hanfhaltigen_lebensmitteln-884.html.
6. Arcella D, Cascio C, Mackay K. Acute human exposure assessment to tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC). EFSA J 2020; 18(1) : 5953. (41 pages).
7. พระราชบัญญัติอาหาร พ.ศ. 2522. ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 425 (พ.ศ. 2564) เรื่อง เมล็ดกัญชง น้ำมันจากเมล็ดกัญชง โปรตีนจากเมล็ดกัญชง และผลิตภัณฑ์อาหารที่มีส่วนประกอบของเมล็ดกัญชง น้ำมันจากเมล็ดกัญชง หรือโปรตีนจากเมล็ดกัญชง. ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 138 ตอนพิเศษ 49 ง (วันที่ 4 มีนาคม 2564). หน้า 1.
8. พระราชบัญญัติอาหาร พ.ศ. 2522. ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 427 (พ.ศ. 2564) เรื่อง ผลิตภัณฑ์อาหารที่มีส่วนประกอบของส่วนของกัญชาหรือกัญชง. ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 138 ตอนพิเศษ 168 ง (วันที่ 23 กรกฎาคม 2564). หน้า 22.
9. Pourseyed Lazarjani M, Torres S, Hooker T, Fowlie C, Young O, Seyfoddin A. Methods for quantification of cannabinoids : a narrative review. J Cannabis Res 2020; 2 : 35. (10 pages).
10. Magnusson B, Örnemark U, editors. The fitness for purpose of analytical method : a laboratory guide to method validation and related topics. 2nd ed. United Kingdom : EURACHEM; 2014.
11. Ellison SLR, Williams A, editors. Quantifying uncertainty in analytical measurement. 3rd ed. United Kingdom : EURACHEM/CITAC; 2012.
12. Iffland K, Carus M, Grotenhermen F. Decarboxylation of Tetrahydrocannabinolic acid (THCA) to active THC. Brussels, Belgium : European Industrial Hemp Association; 2016.

13. Dussy FE, Hamberg C, Luginbühl M, Schwerzmann T, Briellmann TA. Isolation of Delta9-THCA-A from hemp and analytical aspects concerning the determination of Delta9-THC in cannabis products. *Forensic Sci Int* 2005; 149(1): 3-10.
14. Saingam W, Sakunpak A. Development and validation of reverse phase high performance liquid chromatography method for the determination of delta-9-tetrahydrocannabinol and cannabidiol in oromucosal spray from cannabis extract. *Rev Bras Farmacogn* 2018; 28: 669-72.
15. Klein RFX. Analysis of “marijuana edibles” – food products containing marijuana or marijuana extracts – an overview, review, and literature survey. *Microgram J* 2017; 14(1-4): 9-32.
16. Telepchak MJ, Searfoss J, Wang X, Mackowsky D. Determination of cannabinoid content and pesticide residues in cannabis edibles and beverages. *LCGC* 2016; 34(10): 20-7.
17. Holler JM, Bosy TZ, Dunkley CS, Levine B, Past MR, Jacobs A. Delta9-tetrahydrocannabinol content of commercially available hemp products. *J Anal Toxicol* 2008; 32(6): 428-32.
18. Mandrioli M, Tura M, Scotti S, Gallina Toschi T. Fast detection of 10 cannabinoids by RP-HPLC-UV method in Cannabis sativa L. *Molecules* 2019; 24(11): 2113. (12 pages).
19. Christinat N, Savoy MC, Mottier P. Development, validation and application of a LC-MS/MS method for quantification of 15 cannabinoids in food. *Food Chem* 2020; 318: 126469. (10 pages).
20. Citti C, Ciccarella G, Braghiroli D, Parenti C, Vandelli MA, Cannazza G. Medicinal cannabis: principal cannabinoids concentration and their stability evaluated by a high performance liquid chromatography coupled to diode array and quadrupole time of flight mass spectrometry method. *J Pharm Biomed Anal* 2016; 128: 201-9.
21. De Backer B, Debrus B, Lebrun P, Theunis L, Dubois N, Decock L, et al. Innovative development and validation of an HPLC/DAD method for the qualitative and quantitative determination of major cannabinoids in cannabis plant material. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2009; 877(32): 4115-24.
22. ทิพวรรณ นิ่งน้อย. แนวปฏิบัติการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ทางเคมีโดยห้องปฏิบัติการเดียว. นนทบุรี: กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข; 2549.

The Development and Validation of Analysis Method for Cannabinoids in Coconut Juice using LC-MS/MS

Sakulrat Somsuntisuk Atcharee Inkaew Saovane Wajasi Suwimol Muadmah

Kanyarat Chuakunchat Witthawat Wangkaewhiran and Thongsuk Payanan

Bureau of Quality and Safety of Food, Department of Medical Sciences, Tiwanond Road, Nonthaburi 11000, Thailand

ABSTRACT Cannabis and hemp have been classified as narcotics of category V, but some parts of them are recently allowed to be used legally. Consequently, foods and beverages containing hemp or cannabis have been in the limelight among food producers and consumers due to their active substances called cannabinoids, which consist of both psychotropic and non-psychotropic compounds. The main metabolites, CBD and Δ^9 -THC, can provide effects of relaxing, relieving worries and improving sleep. However, the overconsumption of cannabis and hemp products can cause adverse effects, such as drowsiness, headache, fast heart rate and possibly severe symptoms, such as hallucination and an uncontrollable body. Therefore, the regulation of cannabinoids in foods and beverages is very important for protecting consumer's health. The Bureau of Quality and Safety of Food has developed and validated method for analyzing 6 derivatives of cannabinoid group which are Δ^8 -THC, Δ^9 -THC, THCA, THCV, CBD and CBN in coconut juice. The extraction method was relied on liquid-liquid extraction and cleaning-up with SPE HLB cartridge. For the analysis technique, LC-MS/MS was employed to determine the type and quantify the amount of cannabinoids in beverages. As a result, this method had the limit of detection (LOD) at 2 $\mu\text{g/kg}$ and the limit of quantitation (LOQ) at 3 $\mu\text{g/kg}$. The linearity of working range remained at 3 - 50 $\mu\text{g/kg}$, and the method could provide a correlation coefficient between 0.9921 - 0.9985. The accuracy was demonstrated by percentage of mean recovery which was in the range of 91.16 - 113.37%. Finally, the precision of the method was proven by percent relative standard deviation (%RSD) which was approximately 2.65 - 15.00%. In conclusion, this developed method is reliable and suitable for analyzing cannabinoids in flavored beverages.

Keyword: Cannabis, Hemp, Cannabinoids, LC-MS/MS, Coconut juice