

การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณแคนนาบินอยด์ ในใบกัญชาด้วยวิธี Ultra High Performance Liquid Chromatography

ธนวัฒน์ ทองจีน สรเพชร มาสุต พีรธรรม เทียมเทียบรัตน์ สายัณห์ เรืองเชตร ศักดิ์วิชัย อ่อนทอง พิเชฐ บัญญัติ
ศิริวรรณ ชัยสมบูรณ์พันธ์ และอัครชัย ช่วยพรหม
สถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000

บทคัดย่อ กัญชา (*Cannabis sativa* L.) ได้ถูกนำมาใช้ในการรักษาโรคตั้งแต่สมัยโบราณ สารสำคัญที่พบในกัญชา คือ Tetrahydrocannabinol (THC) ซึ่งเป็นสารที่ออกฤทธิ์ต่อจิตประสาท และสารที่ไม่ออกฤทธิ์ต่อจิตประสาท เช่น Cannabidiol (CBD) และ Cannabinol (CBN) สาร THC มีฤทธิ์บรรเทาอาการปวด ลดภาวะคลื่นไส้ อาเจียนจากเคมีบำบัด และรักษาภาวะกล้ามเนื้อหดเกร็ง สาร CBD มีฤทธิ์บรรเทาอาการลมชัก แก้ปวด ลดอาการโรคพาร์กินสัน ต้านการอักเสบ ส่วนสาร CBN มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งปอด ปัจจุบันกัญชาถูกนำมาใช้เป็นองค์ประกอบทางยาและผลิตภัณฑ์สุขภาพที่หลากหลาย อย่างไรก็ตามยังไม่มีวิธีการควบคุมคุณภาพสารที่พบในกัญชา การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณแคนนาบินอยด์ (CBD, CBN และ THC) ในใบกัญชาด้วยวิธี Ultra-High Performance Liquid Chromatography (UHPLC) โดยการสกัดตัวอย่างใบกัญชาใน ethanol ด้วยวิธี reflux กรองและนำสารสกัดมาระเหยแห้ง จากนั้นละลายกลับและปรับปริมาตรด้วย methanol แล้วนำมาวิเคราะห์ด้วยเครื่อง UHPLC ผลการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ดังกล่าว พบว่า calibration curve ของ CBD, CBN และ THC มีลักษณะเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 1.07-106.89, 1.00-99.60 และ 1.00-99.90 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ค่า correlation coefficient (r) เท่ากับ 0.999, ค่า %recovery อยู่ในช่วง 96.83-100.89%, ค่า HORRAT อยู่ในช่วง 0.30-1.96, limit of detection (LOD) ของ CBD, CBN และ THC มีค่าเท่ากับร้อยละ 0.006, 0.009 และ 0.003 โดยน้ำหนัก ตามลำดับ ในขณะที่ limit of quantitation (LOQ) มีค่าเท่ากับ ร้อยละ 0.020, 0.032 และ 0.011 โดยน้ำหนัก ตามลำดับ ซึ่งวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นนี้มีความเหมาะสม สามารถนำไปใช้เป็นวิธีตรวจวิเคราะห์ปริมาณสาร CBD, CBN และ THC ในวัตถุดิบและสารสกัดกัญชาได้

คำสำคัญ : กัญชา, CBD, CBN, THC, UHPLC

Corresponding author E-mail: thanawat.t@dmsc.mail.go.th

Received: 13 August 2021

Revised: 7 September 2021

Accepted: 13 September 2021

บทนำ

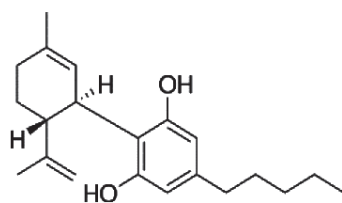
กัญชา มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Cannabis sativa* L. จัดอยู่ในวงศ์ Cannabidaceae มีชื่อเรียกอื่น เช่น กัญชาจีน, คุนแซ่, ปาง, ยานอ, Hashish, Hemp, Indian hemp, Marijuana เป็นต้น จัดเป็นไม้ล้มลุก ต้นตั้งตรง ดอกตัวผู้และดอกตัวเมียแยกกันอยู่คนละต้น มีขนที่มีสารเหนียวๆ ทั่วไป ลำต้นเป็นเหลี่ยมเล็กน้อย ใบที่อยู่ใกล้โคนต้นออกเป็นคู่ตรงข้ามกัน ใบที่อยู่ไกลยอดเรียงแบบบันไดเวียน มีหูใบ 2 อัน เป็นรูปเส้นด้ายติดอยู่โคน ก้านใบยาวประมาณ 0.5 เซนติเมตร ตั้งตรง ไม่ร่วงง่าย แผ่นใบเป็นแฉก 5-7 แฉก แต่ละแฉกเป็นรูปหอก ปลายแฉกแหลมเป็นติ่ง โคนแฉกแหลม ขอบหยัก ก้านใบมีขน ดังแสดงในภาพที่ 1 ดอกตัวผู้ออกเป็นช่อตามง่ามใบและยอด ดอกมีกลีบเพียงชั้นเดียว จำนวน 5 กลีบ ไม่ติดกัน กลีบรูปขอบขนาน ดอกตัวเมีย ออกเดี่ยวๆ ตามง่ามใบและยอด แต่ละดอกมีใบประดับสีเขียวเข้ม คล้ายกาบและมีขนเป็นต่อมหุ้มอยู่ ไม่มีกลีบดอก ผลรูปไข่หรือรูปรี เกสรตัวผู้ มีใบประดับหุ้มอยู่ 2 ใบ สรรพคุณของกัญชามีดังนี้ คือ ใบเป็นยาชูกำลัง แก้อ่อนเพลีย เจริญอาหาร กระตุ้นประสาท ทำให้อ่อนหลับ ช่อดอกตัวเมียช่วยบำรุงประสาท แก้ปวดประสาท ทำให้เคลิ้มฝัน มีฤทธิ์เป็นยาระงับปวด เมล็ดเป็นยาชูกำลัง ทำให้ประจำเดือนมาปกติ ส่วนลำต้นมีสรรพคุณบำรุงประสาท⁽¹⁾ กัญชามีส่วนประกอบของสารเคมีมากกว่า 450 ชนิด โดยมากกว่า 60 ชนิดเป็นสารกลุ่มแคนนาบินอยด์ (cannabinoids) มีองค์ประกอบหลักคือ Tetrahydrocannabinol (THC) และสารชนิดอื่นในกลุ่มเดียวกัน เช่น Cannabinol (CBN), Cannabidiol (CBD), Cannabichromene (CBC), Cannabigerol (CBG) เป็นต้น^(2, 3) ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 424 (พ.ศ. 2564) เรื่อง กำหนดอาหารที่ห้ามผลิต นำเข้า หรือจำหน่าย ลงวันที่ 25 กุมภาพันธ์ 2564 ได้ยกเลิกกัญชา-กัญชง จากบัญชียาเสพติดให้โทษ รวมถึงการอนุญาตให้นำใบซึ่งไม่มียอดหรือช่อดอกติดมาด้วย กิ่ง ก้าน ราก เปลือก ลำต้น เส้นใย ที่ไม่จัดเป็นยาเสพติดประเภทที่ 5 มาใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ การศึกษาวิจัย ผลิตภัณฑ์สุขภาพ รวมทั้งให้ประชาชนสามารถใช้ส่วนต่างๆ ของกัญชา-กัญชง ไปประกอบอาหาร ทำยาโรคได้⁽⁴⁾ ปัจจุบันสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา ได้ออกใบอนุญาตกัญชาสำหรับองค์กรต่าง ๆ ไปแล้วจำนวน 2,210 ราย มีผู้ปลูกกัญชาทั้งพันธุ์ต่างประเทศและพันธุ์ไทย อย่างไรก็ตามกัญชาไทยยังไม่มีข้อมูลชัดเจนในเรื่องของพันธุ์ โดยทางสถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ร่วมกับมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี วิทยาเขตสกลนคร ได้ทำการศึกษากัญชาพันธุ์ไทยจำนวน 4 พันธุ์ ได้แก่ทางกระรอกภูพานเอสที 1 (ST1) ทางเสือสกลนครทีที1 (TT1) ตะนาวศรีก้านขาวดับเบิลยูเอ 1 (WA1) และตะนาวศรีก้านแดงอาร์ดี 1 (RD1) โดยทำการศึกษาทั้งลักษณะฟีโนไทป์ จีโนไทป์ และเคมีไทป์ในส่วนช่อดอก 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) ไปใช้ประโยชน์ได้โดยเฉพาะใบ

ใบกัญชาเป็นส่วนประกอบหนึ่งของกัญชาที่มีสารสำคัญในกลุ่ม Cannabinoids อยู่ โดยสารที่เป็นที่รู้จักกันดีนั้นคือ CBD, CBN และ THC ซึ่งเป็นสารที่ออกฤทธิ์ กระตุ้นระบบประสาท สมอง และภูมิคุ้มกันต่างๆ ในการใช้ประโยชน์ของใบกัญชามักจะนำมาใช้ในการประกอบอาหารเพื่อให้ได้รสชาติที่ดีขึ้นและนำมาเป็นส่วนประกอบการผลิตเป็นยาแผนโบราณในหลายตำรับ เช่น ยาอัคคินิวคณะ ยาสุขไสยาสน์ ยาแก้สัณห์ฆาต ยาแก้โรคจิต ยาอัมฤตโอสถ ยาไพสาลี ยาโกลยาสาลี ยาทำลายพระสุเมรุ ยาทัพยาคูณ⁽⁵⁾ สาร CBD และสาร CBN มีลักษณะเป็นผงสีขาว สาร THC มีลักษณะเป็นของเหลวใส สาร CBD มีฤทธิ์บรรเทาอาการลมชัก ลดอาการวิตกกังวลทั้งในเด็กกลุ่มอาการออทิสติก หรือในผู้ป่วยที่มีประวัติการเสพยาเสพติด สาร CBN มีฤทธิ์ด้านการอักเสบและลดความเจ็บปวด ส่วนสาร THC มีฤทธิ์แก้ปวด กระตุ้นความอยากอาหารและลดอาการคลื่นไส้จากการใช้เคมีบำบัด ช่วยปกป้องและกระตุ้นการสร้างเซลล์สมอง⁽⁶⁾ สูตรโครงสร้างของ CBD, CBN และ THC ดังแสดงในภาพที่ 2

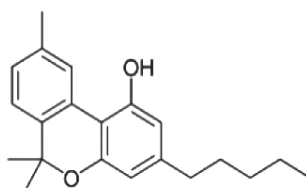
ปัจจุบัน การพัฒนาพืชสมุนไพรกัญชาเพื่อประโยชน์ทางการแพทย์ จำเป็นต้องมีการศึกษาการพัฒนาสารสกัด การแยกสารบริสุทธิ์และผลิตภัณฑ์จากกัญชา เพื่อให้เป็นพืชที่สามารถใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ได้อย่างเหมาะสม และในการนำใบกัญชามาประกอบอาหารและเป็นองค์ประกอบในการปรุงตำรับยา ยังไม่มีข้อมูลปริมาณสารสำคัญ ในปี 2555 มีรายงานการหาปริมาณสาร CBD, CBN และ THC ในกัญชาด้วยวิธี HPLC/UV⁽⁷⁾ แต่เนื่องจากการวิเคราะห์ปริมาณสารกลุ่ม Cannabinoids ในกัญชาด้วยวิธี HPLC/UV นั้น ใช้เวลานาน คือ 22 นาที ทำให้สิ้นเปลือง วัฏภาคเคลื่อนที่ (Mobile phase) และต่อมาในปี 2561 มีรายงานการหาปริมาณสาร Cannabinoids ในกัญชาด้วยวิธี HPLC-DAD⁽⁸⁾ และการวิเคราะห์ปริมาณสารกลุ่ม Cannabinoids ในกัญชาด้วยวิธี HPLC-DAD นี้ ใช้เวลานาน ถึง 50 นาที และก็เป็นสาเหตุของการสิ้นเปลืองสารเคมีด้วยเช่นกัน การวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์ในการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ CBD, CBN และ THC ในใบกัญชา และทดสอบความถูกต้องของวิธีเพื่อให้ได้วิธีมาตรฐานของห้องปฏิบัติการ ที่มีความถูกต้องแม่นยำ สะดวก รวดเร็ว และประหยัดสารเคมี เพื่อใช้ในการประเมินคุณภาพของกัญชาพันธุ์ไทย 4 พันธุ์ และวัตถุดิบของใบกัญชาที่ปลูกในประเทศไทย รวมทั้งการหาปริมาณสารสำคัญที่อยู่ในใบและสามารถนำใบกัญชา พันธุ์ไทยของแต่ละพันธุ์ให้สามารถนำไปใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ได้อย่างเหมาะสม นอกจากนี้ยังสามารถใช้ในการวิจัย และพัฒนาตำรับยาและผลิตภัณฑ์จากสมุนไพรที่มีกัญชาเป็นส่วนผสม รวมถึงเป็นข้อมูลในการพัฒนาพันธุ์กัญชา เพื่อเพิ่มมูลค่าของใบกัญชาทางเศรษฐกิจต่อไป



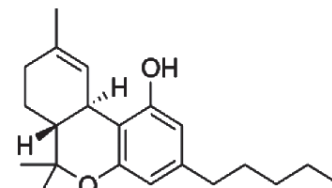
ภาพที่ 1 ใบกัญชา



Cannabidiol (CBD)



Cannabinol (CBN)



Tetrahydrocannabinol (THC)

ภาพที่ 2 สูตรโครงสร้างของ CBD, CBN และ THC

วัสดุและวิธีการ

สารมาตรฐานและสารเคมี

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

สารเคมี: methanol (HPLC grade), acetonitrile (HPLC grade), ethanol (AR grade), hexane (AR grade) และน้ำปราศจากไอออน (deionized water)

เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่อง Ultra High Performance Liquid Chromatography-DAD detector รุ่น 1290 Infinity II ผลิตภัณฑ์ของ Agilent, คอลัมน์ชนิด ARC-18, ขนาด 4.6×150 มิลลิเมตร, ขนาดอนุภาค 2.7 ไมโครเมตร และ ARC-8, ขนาด 2.1×100 มิลลิเมตร, ขนาดอนุภาค 3.0 ไมโครเมตร ผลิตภัณฑ์ของ Restek, ตู้อบร้อนไฟฟ้า รุ่น UL-50 ผลิตภัณฑ์ของ Memmert, เครื่องบดปั่น รุ่น RT 34 ผลิตภัณฑ์ของ ChyunTseh Industrial, เครื่องแรง รุ่น AS 200 Basic ผลิตภัณฑ์ของ Retsch, เครื่องระเหยสุญญากาศ ผลิตภัณฑ์ของ Eyela ประกอบด้วย อ่างน้ำแบบควบคุมอุณหภูมิ รุ่น SB-1000, เครื่อง rotavapor รุ่น N-1000, เครื่อง Aspirator รุ่น A-3S และ เครื่องทำน้ำเย็นหมุนเวียน รุ่น CA-101, เครื่องชั่งไฟฟ้าความละเอียด 0.1 มิลลิกรัม รุ่น XB 220A ผลิตภัณฑ์ของ Precisa และ Nylon filter syringe ขนาด 0.2 ไมโครเมตร, กระดาษกรองเบอร์ 4 และเครื่องแก้ว

ตัวอย่าง

ใบกัญชาถูกรวบรวมจากโครงการศึกษาการปลูกและขยายพันธุ์ต้นกัญชาภายใต้สภาพโรงเรือนแบบปิดของสถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ และมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี วิทยาเขตสกลนคร จำนวน 12 ตัวอย่าง คือ กัญชาไทย จำนวน 4 พันธุ์ ได้แก่ ทางกระรอกภูพานเอสที1 (ST1), ทางเสือสกลนครที่ 1 (TT1), ตะนาวศรีก้านขาวดับเบิ้ลยูเอ1 (WA1) และตะนาวศรีก้านแดงอาร์ดี1 (RD1)

การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณ CBD, CBN และ THC ในใบกัญชา

การศึกษาหาสภาวะของระบบโครมาโทกราฟี

เตรียมสารละลายมาตรฐาน CBD, CBN และ THC ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร นำสารละลายมาตรฐานที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง UHPLC

สกัดตัวอย่างใบกัญชาแห้ง น้ำหนัก 1 กรัม ด้วย ethanol ปริมาตร 40 มิลลิลิตร โดยวิธี reflux เป็นเวลา 60 นาที กรองและนำสารสกัดที่ได้มาระเหยแห้ง ละลายและปรับปริมาตรด้วย methanol จนครบ 50 มิลลิลิตร โดยใช้ volumetric flask กรองผ่าน Nylon filter syringe นำสารละลายตัวอย่างที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง UHPLC

การเลือกชนิดของตัวทำละลายในการสกัด

สกัดตัวอย่างใบกัญชาแห้ง น้ำหนัก 1 กรัม โดยใช้ ethanol 40 มิลลิลิตร เปรียบเทียบกับ hexane 40 มิลลิลิตร ด้วยวิธี reflux เป็นเวลา 30 นาที กรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 4 นำสารสกัด ethanol และ สารสกัด hexane ไประเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ จากนั้นละลายและปรับปริมาตรด้วย methanol จนครบ 50 มิลลิลิตร โดยใช้ volumetric flask กรองผ่าน Nylon filter syringe แล้วนำมาวิเคราะห์ด้วยเครื่อง UHPLC เพื่อเปรียบเทียบความสามารถในการสกัดสาร CBD, CBN และ THC จากใบกัญชา

การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการสกัด

สกัดตัวอย่างใบกัญชาแห้ง น้ำหนัก 1 กรัม ด้วย ethanol โดยวิธี reflux เป็นเวลา 30, 60 และ 90 นาที กรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 4 นำสารละลายที่ได้ไประเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ จากนั้นละลายและปรับปริมาตรด้วย methanol จนครบ 50 มิลลิลิตร โดยใช้ volumetric flask กรองผ่าน Nylon filter syringe นำสารละลายตัวอย่างที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง UHPLC เพื่อเปรียบเทียบผลของเวลาที่ใช้ในการสกัดสาร CBD, CBN และ THC

การเลือกใช้ความยาวคลื่นในการตรวจวิเคราะห์สาร CBD, CBN และ THC

สกัดตัวอย่างใบกัญชาแห้ง น้ำหนัก 1 กรัม ด้วย ethanol โดยวิธี reflux เป็นเวลา 60 นาที กรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 4 นำสารละลายที่ได้ไประเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ จากนั้นละลายและปรับปริมาตรด้วย methanol จนครบ 50 มิลลิลิตร โดยใช้ volumetric flask กรองผ่าน Nylon filter syringe นำสารละลายตัวอย่างที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง UHPLC วัดการดูดกลืนแสง UV ของ CBD, CBN และ THC เพื่อดูความยาวคลื่นที่สารชนิดนี้สามารถดูดกลืนแสงสูงสุด (λ_{max}) และวิเคราะห์สารละลายตัวอย่างใบกัญชาโดยใช้ DAD เพื่อเลือกความยาวคลื่นสำหรับการตรวจวัด CBD, CBN และ THC โดยที่ไม่พบการซ้อนทับของ peak (co-elute)

วัฏภาคคงที่ (Stationary phase) และวัฏภาคเคลื่อนที่ (Mobile phase)

วัฏภาคคงที่ เปรียบเทียบผลของคอลัมน์ชนิดต่างๆ ที่แตกต่างกันในเรื่องชนิดอนุภาคภายในคอลัมน์ (ARC-18 และ ARC-8) ความยาวคอลัมน์ (150 และ 100 มิลลิเมตร) โดยพิจารณาเลือกคอลัมน์ จากลักษณะของ peak shape, peak symmetry และ retention time

วัฏภาคเคลื่อนที่ ศึกษาชนิดและสัดส่วนของวัฏภาคเคลื่อนที่ โดยพิจารณาจาก peak shape และ retention time ของ CBD, CBN และ THC ความสามารถในการแยก impurity จาก peak ของ CBD CBN และ THC ในสารละลายตัวอย่างใบกัญชา และความดันของระบบโครมาโทกราฟี

การทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์

ทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ปริมาณ CBD, CBN และ THC ในใบกัญชาที่พัฒนาขึ้นตามแนวปฏิบัติการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ทางเคมีโดยห้องปฏิบัติการเดียว กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข⁽⁹⁾

การทดสอบความเป็นเส้นตรง (linearity)

การเตรียมสารละลายมาตรฐาน CBD, CBN และ THC

ชั่งสารมาตรฐาน CBD, CBN และ THC น้ำหนัก 10, 25 และ 100 มิลลิกรัม ตามลำดับ ละลายและปรับปริมาตรด้วย methanol จนครบ 10, 25 และ 50 มิลลิลิตร ด้วย volumetric flask ตามลำดับ จะได้ stock solution ของสารละลายมาตรฐาน CBD, CBN และ THC เข้มข้น 1,000, 1,000 และ 2,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ปิเปตสารละลายมาตรฐาน CBD, CBN และ THC ปริมาตร 1,000, 1,000 และ 500 ไมโครลิตร ตามลำดับ ใส่ลงใน volumetric flask ขนาด 10 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วย methanol จากนั้นเจือจางให้ได้ 5 ระดับความเข้มข้น คือ 1, 10, 20, 50 และ 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ฉีดสารละลายมาตรฐาน CBD, CBN และ THC ที่ 5 ระดับความเข้มข้น ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ ด้วยเครื่อง UHPLC นำค่า peak area และความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน CBD, CBN และ THC ไปสร้าง calibration curve ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient, r)

การทดสอบหาร้อยละของการคืนกลับ (%recovery) และความเที่ยง (precision)

เตรียม sample blank (sample blank คือ ตัวอย่างใบกัญชาที่นำมาสกัดและตรวจวิเคราะห์หาปริมาณ CBD, CBN และ THC แล้วมีปริมาณสาร CBD, CBN และ THC ในปริมาณต่ำๆ) โดยชั่งตัวอย่างใบกัญชา 1 กรัม สกัดด้วย ethanol โดยวิธี reflux เป็นเวลา 60 นาที กรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 4 นำสารละลายที่ได้ไประเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ จากนั้นละลายและปรับปริมาตรด้วย methanol จนครบ 50 มิลลิลิตร โดยใช้ volumetric flask กรองผ่าน Nylon filter syringe นำสารละลายตัวอย่างที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง UHPLC จำนวน 6 ซ้ำ แล้วนำมาหาค่าเฉลี่ย (mean)

เตรียม spiked sample ลงใน sample blank โดยเติมสารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้น 3 ระดับๆ ละ 3 ซ้ำ นิตซ้ำละ 2 ครั้ง โดยเตรียม spiked sample ให้มีความเข้มข้น 50, 100, 150%

เติมสารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้น 3 ระดับ ลงใน sample blank แล้ววิเคราะห์ sample blank (unspiked) จำนวน 6 ซ้ำ และวิเคราะห์ spiked sample ระดับละ 3 ซ้ำ จากนั้นคำนวณค่า %recovery

$$\%recovery = \frac{(C_1 - C_2) \times 100}{C_3}$$

เมื่อ C_1 คือ ความเข้มข้นของสารใน spiked sample

C_2 คือ ความเข้มข้นของสารใน sample blank

C_3 คือ ความเข้มข้นของสารที่เติม

การทดสอบความเที่ยง (precision)

Repeatability precision วิเคราะห์ปริมาณสาร CBD, CBN และ THC ในตัวอย่างใบกัญชา ซ้ำ 10 ครั้ง ในวันเดียวกัน คำนวณค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD)

Intermediate precision, between day วิเคราะห์ปริมาณสาร CBD, CBN และ THC ในตัวอย่างใบกัญชา เป็นเวลา 3 วันๆ ละ 10 ซ้ำ คำนวณค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD)

การทดสอบขีดจำกัดของการตรวจพบ (Limit of Detection, LOD)

คำนวณค่าประมาณของ LOD จาก calibration curve

LOD ($\mu\text{g/ml}$), estimated = $3 \times \text{standard error/slope}$

$$\text{LOD (\%w/w), estimated} = \frac{\text{LOD (\mu g/ml)} \times \text{ปริมาตรที่เตรียม (ml)} \times \text{ระดับเจือจาง} \times 100}{1,000,000 \times \text{น้ำหนักตัวอย่าง (g)}}$$

เตรียมสารละลายตัวอย่างใบกัญชา โดยชั่งตัวอย่างใบกัญชา 1 กรัม สกัดด้วย ethanol โดยวิธี reflux เป็นเวลา 60 นาที กรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 4 นำสารละลายที่ได้ไประเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ จากนั้นละลายและปรับปริมาตรด้วย methanol จนครบ 50 มิลลิลิตร โดยใช้ volumetric flask กรองผ่าน Nylon filter syringe

เตรียมสารละลาย spiked sample ให้มีความเข้มข้นใกล้เคียงกับค่าประมาณของ LOD แล้วตรวจวิเคราะห์ปริมาณ CBD, CBN และ THC ใน spiked sample 6 ซ้ำ

การทดสอบขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (Limit of Quantitation, LOQ)

คำนวณค่าประมาณของ LOQ จาก calibration curve ดังนี้

$$\text{LOQ } (\mu\text{g/ml}), \text{ estimated} = 10 \times \text{standard error/slope}$$

$$\text{LOQ } (\%w/w), \text{ estimated} = \frac{\text{LOQ } (\mu\text{g/ml}) \times \text{ปริมาตรที่เตรียม (ml)} \times \text{ระดับเจือจาง} \times 100}{1,000,000 \times \text{น้ำหนักตัวอย่าง (g)}}$$

เตรียมสารละลาย spiked sample ให้มีความเข้มข้นใกล้เคียงกับค่าประมาณของ LOQ แล้วตรวจวิเคราะห์ปริมาณ CBD CBN และ THC ใน spiked sample 6 ซ้ำ คำนวณค่า %RSD และ %recovery

การทดสอบความจำเพาะ (Specificity)

ฉีดสารละลาย mixed working standard solution ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และสารละลายตัวอย่าง ด้วยเครื่อง UHPLC เพื่อตรวจสอบการแยกสาร CBD, CBN และ THC ออกจากกันและออกจาก การรบกวนของสารอื่น ซึ่งต้องมีค่า retention time แยกจากกันได้

การวิเคราะห์ปริมาณ CBD, CBN และ THC ในใบกัญชา

การเตรียมสารละลายตัวอย่าง

สกัดตัวอย่างใบกัญชา น้ำหนัก 1 กรัม ด้วย ethanol ปริมาตร 40 มิลลิลิตร โดยวิธี reflux เป็นเวลา 60 นาที กรองและนำสารสกัดที่ได้มาระเหยแห้ง ละลายและปรับปริมาตรด้วย methanol จนครบ 50 มิลลิลิตร โดยใช้ volumetric flask กรองผ่าน Nylon filter syringe นำสารละลายตัวอย่างที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง UHPLC

วิเคราะห์ปริมาณ CBD, CBN และ THC ในตัวอย่างใบกัญชา จำนวน 12 ตัวอย่าง ด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้น โดยที่แต่ละตัวอย่างให้วิเคราะห์ 3 ซ้ำ แล้วนำมาหาค่าเฉลี่ย (mean)

การคำนวณความเข้มข้นของสารที่วิเคราะห์ในตัวอย่างใบกัญชา (ร้อยละโดยน้ำหนักตัวอย่างใบกัญชา, %w/w)

$$C_s (\%w/w) = \frac{C_o (\mu\text{g/ml}) \times \text{ปริมาตรที่เตรียม (ml)} \times \text{ระดับเจือจาง} \times 100}{1,000,000 \times \text{น้ำหนักตัวอย่าง (g)}}$$

เมื่อ C_o คือ ความเข้มข้นของสารที่วิเคราะห์ที่คำนวณได้จากกราฟมาตรฐาน

C_s คือ ความเข้มข้นของสารที่วิเคราะห์เพื่อแปลงเป็นร้อยละโดยน้ำหนัก

ผล**การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณ CBD, CBN และ THC ในใบกัญชา**

การศึกษาหาสภาวะของระบบโครมาโทกราฟี หลังจากนำสารละลายมาตรฐานของ CBD, CBN และ THC และสารละลายตัวอย่างใบกัญชาไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง UHPLC พบว่าได้สภาวะของระบบโครมาโทกราฟีที่เหมาะสมในการแยกสาร CBD, CBN และ THC ดังแสดงในตารางที่ 1 โดยสัดส่วนของวัฏภาคเคลื่อนที่แบบ gradient program จะเริ่มที่เวลา นาทีที่ 0.0 ถึง นาทีที่ 8.5 ใช้ %A : %B (28 : 72), นาทีที่ 8.5 ถึง นาทีที่ 8.6 ใช้ %A : %B (5 : 95), นาทีที่ 8.6 ถึง นาทีที่ 9.5 ใช้ %A : %B (5 : 95), นาทีที่ 9.5 ถึง นาทีที่ 12.1 ใช้ %A : %B (2 : 72) และ นาทีที่ 12.1 ถึง นาทีที่ 15.0 ใช้ %A : %B (28 : 72) ดังแสดงในตารางที่ 2

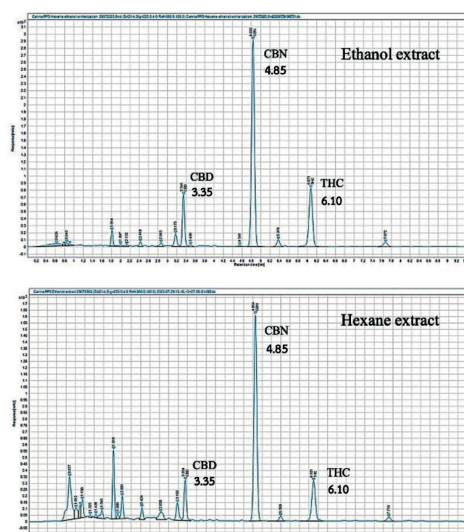
ตารางที่ 1 สภาวะของระบบโครมาโทกราฟีที่เหมาะสมในการแยกสาร CBD, CBN และ THC ด้วยระบบ UHPLC

สภาวะที่เหมาะสม	
วัฏภาคคงที่	UHPLC column ชนิด ARC-18, ขนาด 4.6×150 มิลลิเมตร, ขนาดอนุภาค 2.7 ไมโครเมตร
อุณหภูมิคอลัมน์	40 องศาเซลเซียส
วัฏภาคเคลื่อนที่	Gradient: 0.1% ortho-phosphoric acid ในน้ำ และ 0.1% ortho-phosphoric acid ใน acetonitrile
อัตราการไหล	1.5 มิลลิลิตร/นาที
การตรวจวัดสาร	DAD ที่ความยาวคลื่น 220 นาโนเมตร
ปริมาตรการฉีด	5 ไมโครลิตร

ตารางที่ 2 วัฏภาคเคลื่อนที่แบบ Gradient program

Time (min)	Flow (ml/min)	0.1% ortho-phosphoric acid in water (%A)	0.1% ortho-phosphoric acid in acetonitrile (%B)
Initial	1.5	28	72
8.5	1.5	28	72
8.6	1.5	5	95
9.5	1.5	5	95
12.1	1.5	28	72
15.0	1.5	28	72

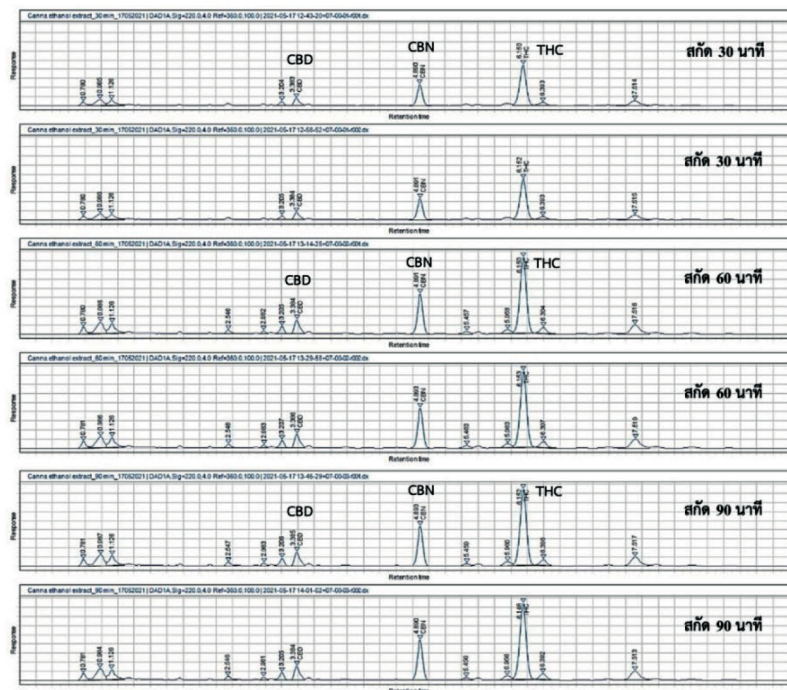
การศึกษานิตของตัวทำละลายในการสกัด ผลการศึกษาพบว่าเมื่อนำสารละลายที่ได้จากการสกัดใบกัญชาด้วย ethanol และ hexane วิเคราะห์ด้วยเครื่อง UHPLC ตัวอย่างละ 2 ซ้ำ พบว่า พื้นที่ใต้กราฟเฉลี่ยของ peak สาร CBD, CBN และ THC จากการสกัดใบกัญชาด้วย ethanol ที่ retention time 3.35, 4.85 และ 6.10 นาที ตามลำดับ มีค่า 323.89, 1,036.74 และ 2,431.62 ซึ่งมากกว่าใบกัญชาที่สกัดด้วย hexane คือ มีพื้นที่ใต้กราฟเฉลี่ยเท่ากับ 309.89, 1,006.44 และ 2,141.23 ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 3



ภาพที่ 3 ผลการสกัด CBD, CBN และ THC ในใบกัญชาด้วย ethanol และ hexane

ดังนั้นในการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณ CBD, CBN และ THC ในใบกัญชา จึงเลือกใช้ ethanol เป็นตัวทำละลายในการสกัดใบกัญชา

การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการสกัด พบว่าสารละลายที่ได้จากการสกัดตัวอย่างใบกัญชา ซึ่งสกัดด้วยวิธีเดียวกันโดยการ reflux กับ ethanol แต่ละระยะเวลาที่ใช้ในการสกัดแตกต่างกัน เมื่อนำมาวิเคราะห์ด้วยเครื่อง UHPLC พบว่า สาร CBD, CBN และ THC ให้ retention time 3.39, 4.89 และ 6.15 นาที ตามลำดับ จากการสกัดด้วยระยะเวลา 30, 60 และ 90 นาที มีค่าดังนี้ คือ ค่าพื้นที่ใต้พีคของสาร CBD, CBN และ THC จากการสกัดด้วยระยะเวลา 30 นาที น้อยกว่าการสกัดด้วยระยะเวลา 60 และ 90 นาที ส่วนค่าพื้นที่ใต้พีคของสาร CBD, CBN และ THC จากการสกัดด้วยระยะเวลา 60 และ 90 นาที ไม่แตกต่างกัน ดังแสดงในภาพที่ 4 และตารางที่ 3



ภาพที่ 4 ผลของระยะเวลาที่ใช้ในการสกัด CBD, CBN และ THC จากตัวอย่างใบกัญชา

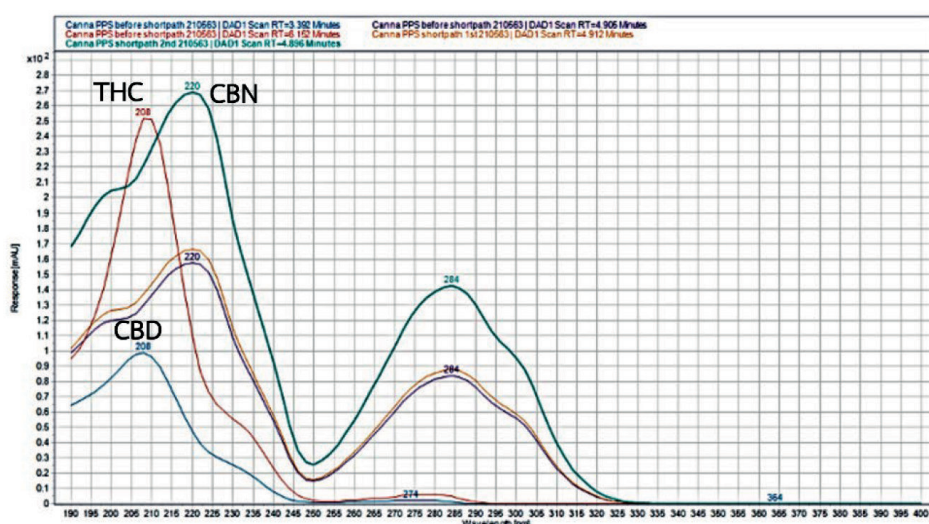
ตารางที่ 3 ค่าพื้นที่ใต้พีคของสาร CBD, CBN และ THC จากการสกัดด้วย ethanol ที่ระยะเวลา 30, 60 และ 90 นาที

ลำดับที่	ตัวอย่าง	ขวดที่	Retention time (นาที)/พื้นที่ใต้พีค		
			CBD	CBN	THC
1	Ethanol extract (30 นาที)	1	3.383/175.134	4.890/528.840	6.150/1243.732
2	Ethanol extract (30 นาที)	2	3.384/175.080	4.891/529.344	6.152/1243.689
3	Ethanol extract (60 นาที)	1	3.384/333.796	4.891/1009.748	6.150/2346.040
4	Ethanol extract (60 นาที)	2	3.386/333.899	4.893/1010.747	6.153/2348.429
5	Ethanol extract (90 นาที)	1	3.385/334.259	4.893/1012.480	6.152/2352.464
6	Ethanol extract (90 นาที)	2	3.384/333.998	4.890/1011.890	6.148/2350.904

ดังนั้นในการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณสาร CBD, CBN และ THC ในใบกัญชาจึงเลือกใช้ ethanol เป็นตัวทำละลายในการสกัดและใช้เวลาในการสกัด 60 นาที

ความยาวคลื่นในการตรวจวัดสาร CBD, CBN และ THC

จากการศึกษาการดูดกลืนแสง UV ของ CBD, CBN และ THC พบว่า $\lambda_{\max}$ ของสาร CBD และ THC มีค่าเท่ากับ 208 และ 274 นาโนเมตร ส่วน $\lambda_{\max}$ ของ CBN มีค่าเท่ากับ 220 และ 284 นาโนเมตร ดังแสดงในภาพที่ 5 และเมื่อวิเคราะห์สารละลายตัวอย่างกัญชาด้วยเครื่อง UHPLC โดยใช้ DAD เป็นเครื่องตรวจวัด ที่ความยาวคลื่น 220 นาโนเมตร ไม่พบการซ้อนทับของ peak ของสารอื่น



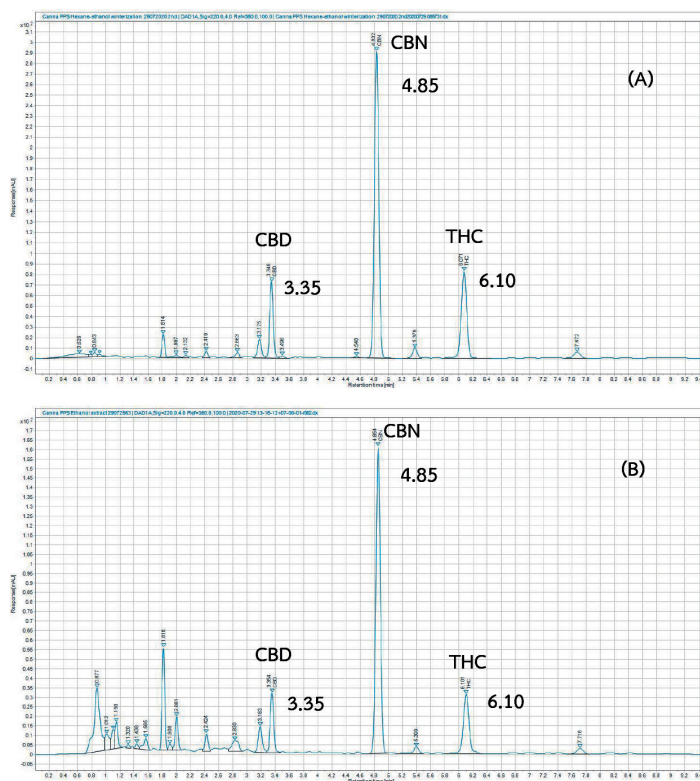
ภาพที่ 5 UV spectrum ของ CBD, CBN และ THC

ดังนั้นในการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณสาร CBD, CBN และ THC ในใบกัญชา จึงเลือกการตรวจวัดการดูดกลืนแสง UV ที่ความยาวคลื่น 220 นาโนเมตร

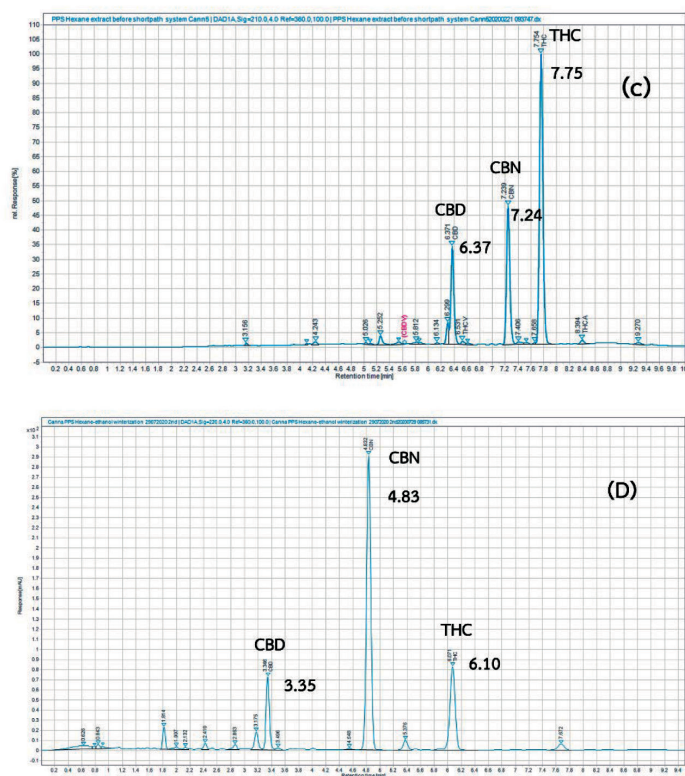
วัฏภาคคงที่ (Stationary phase) และวัฏภาคเคลื่อนที่ (Mobile phase)

วัฏภาคคงที่ จากการศึกษา UHPLC chromatographic fingerprint ของสารสกัด ethanol จากใบกัญชาและตรวจวัดด้วย DAD ที่ความยาวคลื่น 220 นาโนเมตร โดยใช้ 0.1% ortho-phosphoric acid ในน้ำ และ 0.1% ortho-phosphoric acid ใน acetonitrile เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ พบว่าเมื่อใช้ UHPLC column ชนิด ARC-18 (A), ขนาด 4.6×150 มิลลิเมตร, ขนาดอนุภาค 2.7 ไมโครเมตร UHPLC chromatogram ที่ได้ให้ peak ของ CBD, CBN และ THC ที่ retention time 3.35, 4.85 และ 6.10 นาที ตามลำดับ ซึ่งมีการแยกจากสิ่งเจือปน (impurity) อื่นอย่างชัดเจน แต่ UHPLC column ชนิด ARC-8 (B), ขนาด 2.1×100 มิลลิเมตร, ขนาดอนุภาค 3.0 ไมโครเมตร ให้การแยกสารออกจากสิ่งเจือปนอื่นได้น้อยกว่า column ชนิด ARC-18 ดังแสดงในภาพที่ 6

วัฏภาคเคลื่อนที่ เมื่อปรับเปลี่ยนองค์ประกอบของวัฏภาคเคลื่อนที่จากน้ำและ acetonitrile (C) เป็น 0.1% ortho-phosphoric acid ในน้ำ และ 0.1% ortho-phosphoric acid ใน acetonitrile (D) พบว่า retention time ของสาร CBD, CBN และ THC เปลี่ยนจาก 6.37, 7.24 และ 7.75 นาที เป็น 3.35, 4.85 และ 6.10 นาที จะได้ peak shape ของ CBD, CBN และ THC ที่ดีขึ้น การแยกดีขึ้น และแยกจาก impurity อื่นอย่างชัดเจน ดังแสดงในภาพที่ 7



ภาพที่ 6 Chromatogram ของสารละลายตัวอย่างใบกัญชา เมื่อใช้วัฏภาคคงที่ต่างกัน โดยที่ (A) คือ คอลัมน์ชนิด ARC-18 และ (B) คือ คอลัมน์ชนิด ARC-8

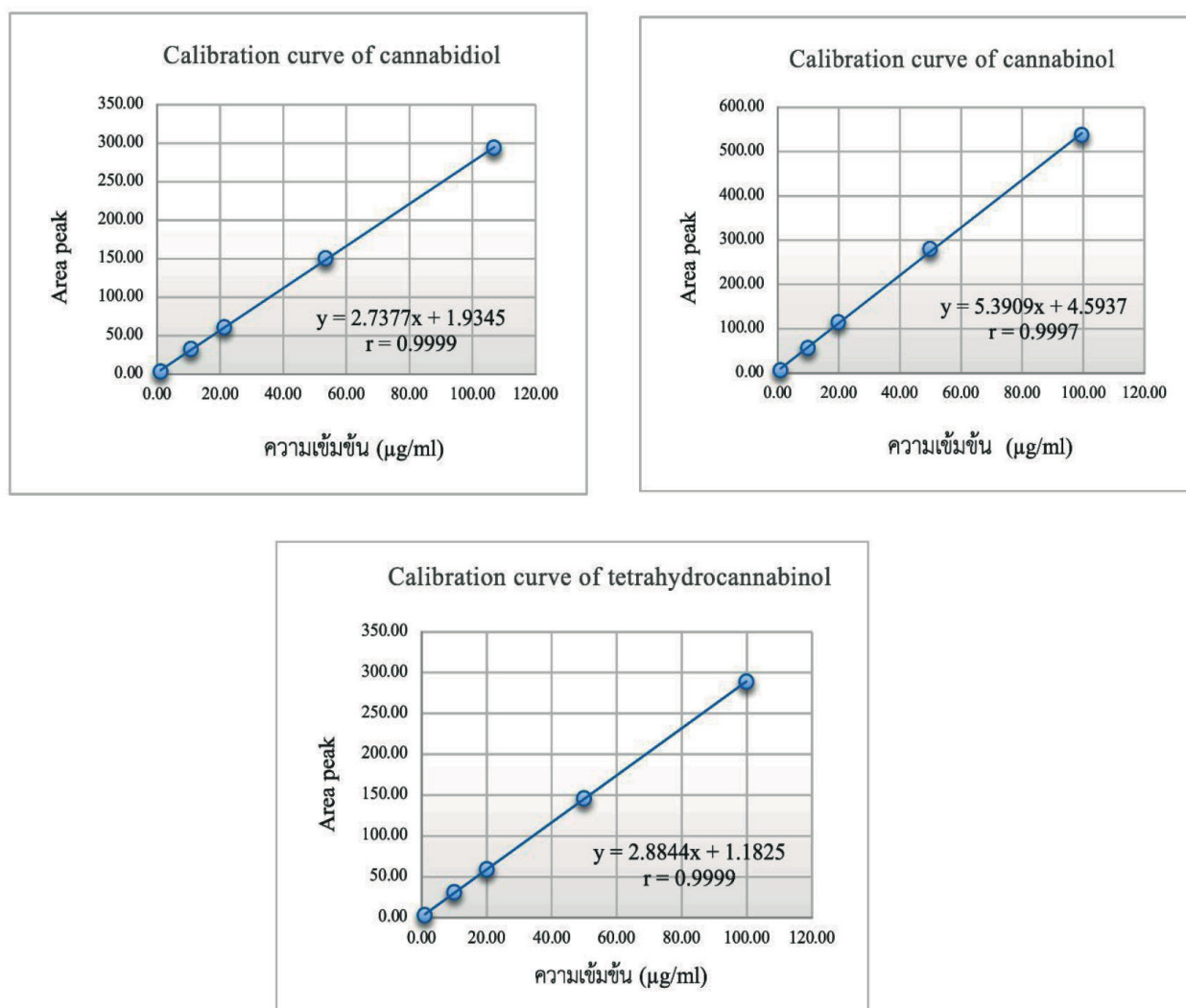


ภาพที่ 7 Chromatogram ของสารละลายตัวอย่างใบกัญชา เมื่อใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ต่างกัน โดยที่ (C) คือ น้ำ และ acetonitrile ส่วน (D) คือ 0.1% ortho-phosphoric acid ในน้ำ และ 0.1% ortho-phosphoric acid ใน acetonitrile

ดังนั้นในการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณ CBD, CBN และ THC ในกัญชาด้วยเครื่อง UHPLC จึงเลือกใช้ UHPLC column ชนิด ARC-18, ขนาด 4.6×150 มิลลิเมตร, ขนาดอนุภาค 2.7 ไมโครเมตร ใช้ 0.1% ortho-phosphoric acid ในน้ำ และ 0.1% ortho-phosphoric acid ใน acetonitrile เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ ตรวจวัดด้วย DAD ที่ความยาวคลื่น 220 นาโนเมตร

การทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์

ความเป็นเส้นตรง (linearity) : จากกราฟมาตรฐาน (Calibration curve) ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานและพื้นที่ใต้พีค พบว่าความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน CBD, CBN และ THC กับพื้นที่ใต้พีค มีลักษณะเป็นเส้นตรง โดยสารมาตรฐาน CBD มีลักษณะเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 1.07–106.89 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) เท่ากับ 0.9999 สารมาตรฐาน CBN มีลักษณะเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 1.00–99.60 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) เท่ากับ 0.9997 และสารมาตรฐาน THC มีลักษณะเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 1.00–99.90 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) เท่ากับ 0.9999 ดังแสดงในภาพที่ 8



ภาพที่ 8 Calibration curve ของสารละลายมาตรฐาน CBD, CBN และ THC ในช่วงความเข้มข้น 1.00–100.00 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

การทดสอบร้อยละของการคืนกลับ (%recovery) และความเที่ยง (precision) เมื่อเติมสารละลายสารมาตรฐาน CBD, CBN และ THC ที่ความเข้มข้นระดับต่าง ๆ ในช่วงการใช้งาน 3 ระดับ ลงใน sample blank วิเคราะห์ sample blank จำนวน 6 ซ้ำ และวิเคราะห์ spiked sample ระดับละ 3 ซ้ำ แต่ละซ้ำทำ duplicate ตามลำดับ การเตรียม spiked sample ให้มีความเข้มข้น 50, 100, 150% ความเข้มข้นของ CBD, CBN และ THC ที่คำนวณได้เท่ากับร้อยละ 9.09, 16.67 และ 23.08 โดยน้ำหนัก ตามลำดับ

จากการวิเคราะห์ตัวอย่าง spiked sample พบว่าร้อยละของการคืนกลับของสาร CBD CBN และ THC อยู่ในช่วงร้อยละ 97.50–99.75, 97.77–100.89 และ 96.83–98.33 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4

การทดสอบความเที่ยง (precision)

Repeatability precision เครื่องวัดปริมาณสาร CBD, CBN และ THC ในตัวอย่างใบกัญชา พบว่ามีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) เท่ากับ 0.89, 0.55 และ 0.33 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 5

การทดสอบ Intermediate precision, between-day วิเคราะห์ปริมาณสาร CBD, CBN และ THC ในตัวอย่างใบกัญชา พบว่ามีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) เท่ากับ 0.42, 0.51 และ 0.32 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 4 ผลการศึกษา %recovery และ repeatability

สารที่วิเคราะห์	Sample blank		Spiked level		%recovery mean $\pm$ SD	%RSD	HORRAT
	($\mu\text{g/ml}$)	(%w/w)	(%)	(%w/w)			
CBD	14.40	0.07	50	9.09	97.50 $\pm$ 2.50	2.56	1.96
			100	16.67	97.70 $\pm$ 0.49	0.50	0.60
			150	23.08	99.75 $\pm$ 1.17	1.17	1.79
CBN	6.84	0.03	50	9.09	97.94 $\pm$ 1.58	1.62	1.23
			100	16.67	100.89 $\pm$ 0.76	0.75	0.89
			150	23.08	97.77 $\pm$ 0.26	0.27	0.41
THC	13.91	0.07	50	9.09	96.83 $\pm$ 0.38	0.39	0.30
			100	16.67	97.02 $\pm$ 0.74	0.76	0.90
			150	23.08	98.33 $\pm$ 0.96	0.97	1.47

เกณฑ์การยอมรับของ %recovery ตาม AOAC Peer-verified methods program on policies and procedures, Arlington, VA, USA (1998) คือ 95–105% และการยอมรับความเที่ยง ประเมินจาก HORRAT (< 2)

ตารางที่ 5 ผลการศึกษา intermediate precision between-day

สารที่วิเคราะห์ในตัวอย่างใบกัญชา	%RSD ของ Repeatability	%RSD ของ intermediate precision between-day
CBD	0.89	0.42
CBN	0.55	0.51
THC	0.33	0.32

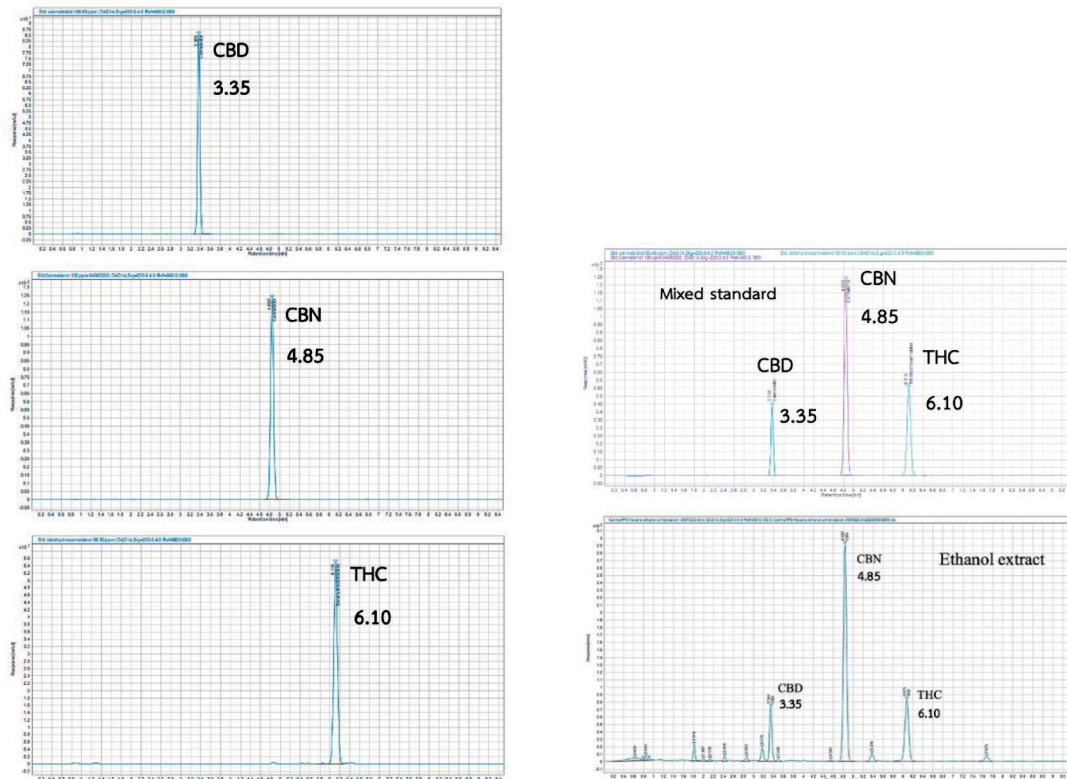
การทดสอบขีดจำกัดของการตรวจพบ (**Limit of detection, LOD**) พบว่า LOD ของการวิเคราะห์ CBD, CBN และ THC เท่ากับร้อยละ 0.006, 0.009 และ 0.003 โดยน้ำหนัก ตามลำดับ

การทดสอบขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (**limit of quantitation, LOQ**) พบว่า LOQ ของการวิเคราะห์ CBD, CBN และ THC เท่ากับร้อยละ 0.020, 0.032 และ 0.011 โดยน้ำหนัก ตามลำดับ โดยมีค่า %RSD เท่ากับ 1.00, 1.19 และ 1.54 ตามลำดับ และร้อยละของการคืนกลับอยู่ในช่วงร้อยละ 95.75–98.33, 95.51–98.21 และ 97.62–99.87 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 ผลการศึกษา limit of quantitation (LOQ)

สารที่วิเคราะห์	Spiked sample ($\mu\text{g/ml}$)	LOQ (% w/w)	%recovery	%recovery mean $\pm$ SD	%RSD
CBD	0.96	0.020	97.15	96.91 $\pm$ 0.97	1.00
			95.75		
			98.33		
			96.20		
			97.65		
			96.39		
CBN	6.34	0.032	95.51	96.90 $\pm$ 1.16	1.19
			97.08		
			98.21		
			95.57		
			98.01		
			97.03		
THC	2.14	0.011	99.87	98.52 $\pm$ 1.52	1.54
			97.62		
			98.74		
			96.00		
			100.08		
			98.81		

การทดสอบความจำเพาะ (**Specificity**) จากการฉีดสารละลายมาตรฐานและสารละลายตัวอย่าง พบว่า ภายใต้สภาวะ UHPLC ที่พัฒนาขึ้น สามารถแยกสาร CB, CBN และ THC ออกจากกันได้ และไม่มีการรบกวนของสารอื่นในตัวอย่าง โดยมีค่า retention time เท่ากับ 3.35, 4.85 และ 6.10 นาที ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 9



ภาพที่ 9 Chromatogram ของสารละลายมาตรฐาน CBD, CBN และ THC และสารละลายตัวอย่างใบกัญชา

การวิเคราะห์ปริมาณ CBD, CBN และ THC ในใบกัญชา

ผลการวิเคราะห์ปริมาณ CBD, CBN และ THC ในตัวอย่างใบกัญชา จำนวน 12 ตัวอย่าง พบว่าใบกัญชาพันธุ์ทางกระรอกภูพานเอสที1 (ST1) ทางเสือกลนครที่ที1 (TT1) ตะนาวศรีก้านขาวดับเบิลยูเอ1 (WA1) และตะนาวศรีก้านแดงอาร์ดี1 (RD1) มีปริมาณสาร THC ในระยะใบอ่อนสูงกว่าใบเฟสลาดและใบแก่ ส่วนปริมาณสาร CBD พบมากในใบแก่ของพันธุ์ RD1 ถึงร้อยละ 2.50 โดยน้ำหนัก ปริมาณสาร CBD, CBN และ THC ในตัวอย่างใบกัญชามีค่าอยู่ในช่วงร้อยละ 0.002–2.500, 0.002–0.023 และ 1.363–7.392 โดยน้ำหนัก ตามลำดับ ปริมาณ CBD, CBN และ THC มีค่าอยู่ในช่วงร้อยละ 0.002–2.500, 0.002–0.023 และ 1.363–7.392 โดยน้ำหนัก ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 7

ตารางที่ 7 ผลการวิเคราะห์ปริมาณ CBD, CBN และ THC ในใบกัญชาด้วยวิธี UHPLC

ตัวอย่าง	พันธุ์/ระยะการเก็บเกี่ยว	น้ำหนัก ตัวอย่าง (g)	ความเข้มข้นของสารที่คำนวณได้จากสมการ เส้นตรงจาก Calibration curve ($\mu\text{g/ml}$)			ปริมาณสาร (% w/w)		
			CBD	CBN	THC	CBD	CBN	THC
1	ST1 ระยะใบอ่อน	1.0044	12.037	0.060	54.585	1.198	0.006	5.435
2	ST1 ระยะใบเฟสลาด	1.0033	14.160	0.081	55.360	0.882	0.002	1.379
3	ST1 ระยะใบแก่	1.0040	40.164	0.457	54.720	1.000	0.011	1.363
4	TT1 ระยะใบอ่อน	1.0049	0.284	0.121	74.284	0.028	0.012	7.392
5	TT1 ระยะใบเฟสลาด	1.0036	0.320	0.440	70.531	0.016	0.022	3.514

ตารางที่ 7 ผลการวิเคราะห์ปริมาณ CBD CBN และ THC ในใบกัญชาด้วยวิธี UHPLC (ต่อ)

ตัวอย่าง	พันธุ์/ระยะการเก็บเกี่ยว	น้ำหนัก ตัวอย่าง (g)	ความเข้มข้นของสารที่คำนวณได้จากสมการ เส้นตรงจาก Calibration curve ($\mu\text{g/ml}$)			ปริมาณสาร (%w/w)		
			CBD	CBN	THC	CBD	CBN	THC
6	TT1 ระยะใบแก่	1.0045	0.082	0.640	67.380	0.002	0.016	1.677
7	WA1 ระยะใบอ่อน	1.0054	0.750	0.470	71.492	0.075	0.020	7.111
8	WA1 ระยะใบเพสลาด	1.0019	0.223	0.347	68.060	0.011	0.017	3.397
9	WA1 ระยะใบแก่	1.0050	0.139	0.454	49.694	0.007	0.023	2.472
10	RD1 ระยะใบอ่อน	1.0043	23.990	0.080	45.420	2.389	0.008	4.523
11	RD1 ระยะใบเพสลาด	1.0045	41.725	0.286	61.665	2.077	0.014	3.069
12	RD1 ระยะใบแก่	1.0046	50.222	0.424	44.182	2.500	0.021	2.199

วิจารณ์

กัญชาเป็นสมุนไพรที่มีศักยภาพเชิงพาณิชย์และมีประโยชน์ทั้งเป็นยาและเป็นผลิตภัณฑ์สุขภาพ สามารถนำมาผสมในผลิตภัณฑ์ต่างๆ เช่น เครื่องดื่มสมุนไพร ผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง มีรายงานการศึกษาทางวิทยาศาสตร์ทางด้านเคมี เกษษิตวิทยา และพิษวิทยามากมายที่สนับสนุนการใช้ แต่การพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์นั้น ปัจจัยที่สำคัญที่ควรคำนึงถึงคือ ปัจจัยด้านคุณภาพของสมุนไพรเนื่องจากกัญชามีสารสำคัญกลุ่มแคนนาบินอยด์ คือ CBD, CBN และ THC ที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา ในการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณสารแคนนาบินอยด์ ในวัตถุดิบใบกัญชา โดยสกัดใบกัญชาแห้งน้ำหนัก 1 กรัม ด้วย ethanol ปริมาตร 40 มิลลิลิตร โดยวิธี reflux เป็นเวลา 60 นาที กรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 4 และนำสารสกัดที่ได้ไประเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ จากนั้นละลายและปรับปริมาตรด้วย methanol จนครบ 50 มิลลิลิตร โดยใช้ volumetric flask แล้วกรองผ่าน Nylon filter syringe นำสารละลายดังกล่าว ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ฉีดเข้าสู่ระบบโครมาโทกราฟีของเครื่อง UHPLC ซึ่งใช้คอลัมน์ชนิด ARC-18, ขนาด 4.6×150 มิลลิเมตร, ขนาดอนุภาค 2.7 ไมโครเมตร และใช้ 0.1% ortho-phosphoric acid ใน deionized water และ 0.1% ortho-phosphoric acid ใน acetonitrile เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ อัตราการไหล 1.5 มิลลิลิตร/นาที ตรวจวัดด้วย DAD ที่ความยาวคลื่น 220 นาโนเมตร จะปรากฏ peak ของ CBD, CBN และ THC ที่ retention time เท่ากับ 3.35, 4.85 และ 6.10 นาที ตามลำดับ ผลการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ดังกล่าว พบว่า calibration curve มีความเป็นเส้นตรง โดยสารมาตรฐาน CBD มีลักษณะเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 1.07–106.89 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) เท่ากับ 0.9999 สารมาตรฐาน CBN มีลักษณะเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 1.00–99.60 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) เท่ากับ 0.9997 และสารมาตรฐาน THC มีลักษณะเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 1.00–99.90 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) เท่ากับ 0.9999 ค่า %recovery อยู่ในช่วง 97.17–99.85, 97.92–101.89 และ 97.08–98.99% ตามลำดับ ค่า HORRAT เท่ากับ 0.60–1.96, 0.41–1.23 และ 0.30–1.47 ตามลำดับ LOD ของการวิเคราะห์ CBD, CBN และ THC เท่ากับร้อยละ 0.006, 0.009 และ 0.003 โดยน้ำหนัก ตามลำดับ LOQ ของการวิเคราะห์ CBD, CBN และ THC เท่ากับร้อยละ 0.020, 0.032 และ 0.011 โดยน้ำหนัก ตามลำดับ โดยมีค่า %RSD เท่ากับ 1.00, 1.19 และ 1.54 ตามลำดับ และร้อยละของการคืนกลับอยู่ในช่วงร้อยละ 95.75–98.33, 95.51–98.21 และ 97.62–99.87 ตามลำดับ ปริมาณสาร CBD, CBN และ THC ในตัวอย่างวัตถุดิบใบกัญชา จำนวน

12 ตัวอย่าง สามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการกำหนดปริมาณสาร CBD, CBN และ THC ในตัวอย่างวัตถุดิบ ใบกัญชาได้ ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการตรวจปริมาณสารแคนนาบินอยด์ของตัวอย่างใบกัญชาในระยะเวลาเจริญเติบโตของใบที่แตกต่างกัน คือ ในระยะใบอ่อน ใบเพสลาด และใบแก่ของกัญชาไทย 4 พันธุ์ ได้แก่ ทางกระรอกภูพานเอสที 1 (ST1) ทางเสือกลนครที่ 1 (TT1) ตะนาวศรีก้านขาวดับเบิลยูเอ 1 (WA1) และตะนาวศรีก้านแดงอาร์ดี 1 (RD1) พบว่าปริมาณสาร THC ในระยะใบอ่อนสูงกว่าใบเพสลาดและใบแก่ในกัญชาอายุ 2 เดือน ส่วนปริมาณสาร CBD พบมากในใบแก่ของพันธุ์ RD1 ถึงร้อยละ 2.50 โดยน้ำหนัก ส่วนปริมาณสาร CBN พบในใบค่อนข้างน้อย เมื่อเปรียบเทียบพันธุ์กับปริมาณสารแคนนาบินอยด์ พบว่า WA1 และ TT1 มีปริมาณสาร THC และ CBN สูงกว่าพันธุ์อื่น ซึ่งปริมาณของ CBN จะแปรผันตามปริมาณสาร THC ที่สูงขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยที่พบว่าสาร CBN จะเป็นผลผลิตที่ได้จาก THC ในช่วงของการ decarboxylation ระหว่างการอบแห้งผ่านความร้อน ซึ่งถ้าหากมีปริมาณ THC ที่สูง ปริมาณของ CBN จะสูงไปด้วย^(10, 11) ส่วนปริมาณสาร CBD พบมากเพียง 2 พันธุ์ คือ RD1 และ ST1 ซึ่งจากข้อมูลปริมาณสารสำคัญที่อยู่ในใบค่อนข้างสูง เมื่อเปรียบเทียบกับผู้ศึกษาปริมาณสารแคนนาบินอยด์ในใบ ซึ่งพบว่ามีค่าอยู่ระหว่าง 1.10–2.10%⁽¹²⁾ จากข้อมูลสามารถนำไปกัญชาไทยในแต่ละพันธุ์ไปใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ได้อย่างเหมาะสม รวมถึงเป็นข้อมูลในการพัฒนาพันธุ์กัญชาเพื่อเพิ่มมูลค่าของใบกัญชาทางเศรษฐกิจต่อไป

UHPLC เป็น High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ที่มีการพัฒนาเพื่อให้มีประสิทธิภาพการแยกสาร ความไวในการแยกสารที่ดีขึ้น ใช้วัฏภาคเคลื่อนที่น้อยลง และลดระยะเวลาในการตรวจวิเคราะห์ คือ เมื่อนำวิธีวิเคราะห์ปริมาณ CBD, CBN และ THC ในใบกัญชาด้วยวิธี UHPLC ที่พัฒนาขึ้นมาใหม่ เปรียบเทียบกับการหาปริมาณสาร CBD, CBN และ THC ในกัญชาด้วยวิธี HPLC/UV⁽⁷⁾ และวิธี HPLC-DAD⁽⁸⁾ พบว่าวิธี HPLC/UV และวิธี HPLC-DAD ใช้เวลาวิเคราะห์ตัวอย่างกัญชาต่อ 1 ตัวอย่าง นาน 22 นาที และ 50 นาที ตามลำดับ ทำให้สิ้นเปลืองวัฏภาคเคลื่อนที่ (Mobile phase) ส่วนวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นมาใหม่ ใช้เวลาในการวิเคราะห์ 10 นาที ซึ่งรวดเร็วและประหยัดวัฏภาคเคลื่อนที่ ดังนั้นจึงเลือกใช้เครื่อง UHPLC ในการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณ CBD, CBN และ THC ในใบกัญชา จากการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ปริมาณ CBD, CBN และ THC ที่พัฒนาขึ้น พบว่า %recovery จากการวิเคราะห์ spiked sample อยู่ในเกณฑ์ยอมรับได้ (95–105%) ซึ่งแสดงถึงความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ และค่า HORRAT อยู่ในเกณฑ์ยอมรับได้ (< 2) ซึ่งแสดงถึงความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้น วิธีดังกล่าวจึงมีความเหมาะสม สามารถนำไปใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณสาร CBD, CBN และ THC เพื่อใช้ควบคุมปริมาณสารของใบกัญชาต่อไปได้ ในเบื้องต้นจะนำวิธีที่พัฒนาขึ้นนี้ตรวจวิเคราะห์วัตถุดิบจากแหล่งปลูกต่างๆ เพื่อให้มีข้อมูลหลากหลายเป็นประโยชน์ต่อการพัฒนาพันธุ์กัญชาไทยต่อไป

สรุป

การศึกษานี้ได้พัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์ปริมาณแคนนาบินอยด์ในใบกัญชาด้วยวิธี UHPLC และทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ ผลการศึกษาพบว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นมีความถูกต้องแม่นยำ สะดวก รวดเร็ว และประหยัดสารเคมีที่ใช้ใน mobile phase จึงนำวิธีที่ได้มาตรวจวิเคราะห์ปริมาณแคนนาบินอยด์ในตัวอย่างใบกัญชาไทย 4 พันธุ์ ทำให้ได้ข้อมูลซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการพัฒนาพันธุ์กัญชา และผลิตภัณฑ์ผสมกัญชาต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ที่สนับสนุนงบประมาณในการวิจัยนี้ ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ห้องปฏิบัติการฟิสิกส์และเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการวิจัยเพื่อแยกสารสำคัญจากสมุนไพรทุกท่าน ที่ทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

1. นันทวัน บุญยะประภัศร, อรุณช โชคชัยเจริญพร, บรรณธิการ. สมุนไพรไม้พุ่มบ้าน. กรุงเทพฯ: คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล; 2542.
2. Mechoulam R, Hanuš LO, Pertwee R, Howlett AC. Early phytocannabinoid chemistry to endocannabinoids and beyond. *Nat Rev Neurosci* 2014; 15(11): 757-64.
3. Velasco G, Sánchez C, Guzmán M. Towards the use of cannabinoids as antitumour agents. *Nat Rev Cancer* 2012; 12(6): 436-44.
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. สำนักงานจัดการกัญชาและกระท่อมทางการแพทย์แผนไทย. Infographic 16 ตำรับยาแผนไทยที่มีกัญชาปรุงผสมอยู่. [ออนไลน์]. 2564; [สืบค้น 2 ก.ค. 2564]; [1 หน้า]. เข้าถึงได้ที่: URL: <https://ockt.dtam.moph.go.th/index.php/cannabis-formula/200-infographic-16>.
6. ศราวุธ ระดาพงษ์, พราว ศุภจริยวัตร, เมธิณี ผดุงกิจ.ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาและพิษวิทยาของกัญชา. ว. กรมวิทย์ พ 2564; 63(1) : 219-32.
7. Veniero G, Lucia D, Fiorenza F, Rino F, Elisa S, Giovanna T. Determination of primary active constituents in Cannabis preparations by high-resolution gas chromatography/flame ionization detection and high-performance liquid chromatography/UV detection. *Anal Chim Acta* 2002; 468(2): 245-54.
8. Ciolino LA, Ranieri TL, Taylor AM. Commercial cannabis consumer products part 2 : HPLC-DAD quantitative analysis of cannabis cannabinoids. *Forensic Sci Int* 2018; 289 : 438-47.
9. กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. แนวปฏิบัติการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ทางเคมีโดยห้องปฏิบัติการเดี่ยว. นนทบุรี: กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข; 2549.
10. 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.
11. Russo EB, Marcu J. Cannabis pharmacology : the usual suspects and a few promising leads. *Adv Pharmacol* 2017; 80 : 67-134.
12. Dan Jin, Kaiping Dai, Zhen Xie & Jie Chen. Secondary metabolites profiled in cannabis inflorescences, leaves, stem barks, and roots for medicinal purposes. *Sci Rep* 2020; 10(1) : 3309. (14 pages).

Development and Method Validation of Cannabinoid Contents In *Cannabis sativa* L. Leaves by Ultra High Performance Liquid Chromatography

Thanawat Thongchin Sorrapetch Marsud Peradhama Thiemthieprat Sayan Ruengkhet Sakwichai Ontong Phichet Banyati Siriwan Chaisomboonpan and Aussavashai Shuayprom
Department of Medical Sciences, Tiwanond Road, Nonthaburi 11000, Thailand

ABSTRACT Cannabis (*Cannabis sativa* L.) has been used to treat several diseases since the ancient time. Tetrahydrocannabinol (THC) is the major psychoactive compound and the other non-psychoactive ingredients are Cannabidiol (CBD) and Cannabinol (CBN). THC has been used for pain relief, reducing nausea from chemotherapy and muscle contraction treatment. CBD has antiepileptic mechanism, relieve pain and neuroprotective property for Parkinson's disease, while CBN has a potential use for anti-cancer therapy. Cannabis have been used as active ingredient of several drugs and products in the markets. However, the appropriate analytical methods for quality control of those compounds are still limited. This study aimed to develop analytical methods for quantification assessment of CBD, CBN and THC in cannabis leaf samples using the Ultra High Performance Liquid Chromatography (UHPLC) technique. Samples were prepared by refluxing in ethanol, filtering and evaporating until dry. The residue was redissolved and adjusted with methanol and injected into UHPLC system. Linearity was established for CBD, CBN and THC at concentration range of 1.07–106.89, 1.00–99.60 and 1.00–99.90 µg/ml, respectively, with a determination correlation coefficient (r) of 0.999. The %recovery was in the range of 96.83–100.89% and HORRAT was in the range of 0.30–1.96. The limit of detection (LOD) of CBD, CBN and THC were 0.006, 0.009, and 0.003 %w/w, respectively, while limit of quantitation (LOQ) was 0.020, 0.032, and 0.011 %w/w, respectively. It has been shown that the developed method is suitable and can be used to analyze the content of CBD, CBN and THC in cannabis leaves. Therefore, the appropriate specification of cannabinoid contents (CBD, CBN and THC) in cannabis leaf extract can be established.

Keywords: Cannabis, CBD, CBN, THC, UHPLC