

ฤทธิ์ต้านอักเสบต่อเซลล์ผิวหนังและฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราของสารสกัดเมทานอลจากใบกัญชงไทย

ประภัสสร ทิพย์รัตน์¹ ปรัชญา คงทวีเลิศ² ณัฐชัย ดวงนิล¹ สรินยา จุลศรีไกวล์¹ พชรินทร์ จันทรานิมิตร¹ และ สรिता ปันมณี³

¹ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 1 เชียงใหม่ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ เชียงใหม่ 50180

²คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เชียงใหม่ 50200

³สถาบันวิจัยและพัฒนาพื้นที่สูง (องค์การมหาชน) เชียงใหม่ 50200

บทคัดย่อ เนื่องด้วยรัฐบาลมีนโยบายส่งเสริมกัญชงเป็นพืชเศรษฐกิจโดยใช้ประโยชน์จากเส้นใย ดังนั้นการศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้ประโยชน์จากใบกัญชง ซึ่งเป็นส่วนเหลือทิ้งหลังจากการเก็บเกี่ยวเส้นใยของต้นกัญชงจึงเป็นการพัฒนาเพื่อสร้างมูลค่าเพิ่ม การวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสารสกัดใบกัญชง จำนวน 4 พันธุ์ปลูก ได้แก่ RPF1-4 โดยศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ และฤทธิ์ต้านอักเสบ จากผลการศึกษาพบว่า cannabinoids fraction ของ RPF4 มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด โดยมีค่า Trolox equivalent antioxidant capacity เฉลี่ยในช่วง 88.02-180.84 mg/g พบว่าสารสกัดหยาบเมทานอลพันธุ์ปลูก RPF3 และ RPF4 มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก และ *Candida albicans* แต่ไม่สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบได้ โดยมีฤทธิ์ต้านเชื้อ *Clostridium sporogenes* ดีที่สุด มีค่า minimal inhibitory concentrations (MIC) ของสารสกัดที่ 976.5 ng/mL และพบว่าสารสกัดหยาบเมทานอล และ cannabinoids fraction ของสารสกัดจากใบกัญชงทุกพันธุ์ปลูกสามารถลดการสร้างไนตริกออกไซด์ ยับยั้งยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบ ได้แก่ *iNOS*, *COX2* และ *IL1B* ลดการแสดงออกของยีน *MMP3* และ *COL2A1* โดยเฉพาะ RPF4 ที่มีสัดส่วนปริมาณสารกลุ่ม cannabinoids ค่อนข้างสูงและพบสาร tetrahydrocannabivarin (THCV) มีฤทธิ์ต้านอักเสบได้ดีที่สุดใกล้เคียงกับเด็กชาเมทาโซน ซึ่งจากผลการศึกษามีประโยชน์ในการนำส่วนเหลือทิ้งจากการผลิตเส้นใยกัญชงกลับมาใช้ประโยชน์ในการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์สมุนไพร โดยต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมด้านการทดสอบความเป็นพิษ และฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาในสัตว์ทดลอง

คำสำคัญ: ฤทธิ์ต้านอักเสบ, ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย, ฤทธิ์ต้านเชื้อรา, ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ, สารสกัดใบกัญชงไทย

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

Received: 22 February 2023

Revised: 26 July 2023

Accepted: 10 August 2023

บทนำ

พืชกัญชา (*cannabis*) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Cannabis sativa* L. อยู่ในวงศ์ Cannabaceae ปัจจุบันหมายรวมถึงทั้งกัญชงหรือเฮมพ์และกัญชา มีถิ่นกำเนิดอยู่ในทวีปเอเชียกลาง และได้แพร่กระจายไปทั่วโลก⁽¹⁾ เป็นพืชล้มลุกมีอายุเพียง 1 ปี ลำต้นตั้งตรงสีเขียว สูงประมาณ 1–6 เมตร เปลือกของลำต้นสามารถลอกออกเพื่อใช้ประโยชน์จากเส้นใย มีดอก 2 ชนิด คือ ชนิดที่มีดอกเพศผู้และเพศเมียอยู่ในต้นเดียวกัน (monoecious) และชนิดดอกเพศผู้และเพศเมียแยกกันอยู่แต่ละต้น (dioecious) ติดเมล็ดภายใน 2–3 สัปดาห์หลังออกดอก ภายในเมล็ดมีอาหารสะสมจำพวกแป้งและไขมันอัดแน่น โดยมีน้ำมันเป็นส่วนประกอบ 29–34% เป็นไขมันชนิดไม่อิ่มตัว (unsaturated fatty acids) สูง พืชกัญชาสร้างสารที่มีลักษณะเฉพาะ เรียกว่า cannabinoids สารสำคัญที่พบมาก ได้แก่ delta-9-tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC หรือ THC) ซึ่งเป็นสารออกฤทธิ์ต่อจิตและประสาทที่สำคัญ และ cannabidiol (CBD) เป็นสารสำคัญอีกชนิดหนึ่งแต่เป็น non-psychoactive สารในกลุ่ม cannabinoids terpenes และ volatile compounds อื่นๆ ถูกขับออกโดย glandular trichomes ในรูปสารเหนียว เรียกว่า เรซิน ซึ่งมีมากที่สุดในช่วงดอกตัวเมีย^(2,3) สามารถจำแนกกัญชาจากลักษณะการใช้ประโยชน์และลักษณะองค์ประกอบสารสำคัญ ได้แก่ การควบคุมปริมาณ THC ตามที่กำหนด เช่น ประเทศสหรัฐอเมริกากำหนดให้มี THC ในเฮมพ์ไม่เกิน 0.3% น้ำหนักแห้ง⁽¹⁾ รัฐเวสเทิร์นออสเตรเลีย ประเทศออสเตรเลีย กำหนดไม่เกิน 1% น้ำหนักแห้ง⁽⁴⁾ เช่นเดียวกับประเทศไทยที่กำหนดระดับ THC ต้องไม่เกิน 1.0% น้ำหนักแห้ง ตามประกาศคณะกรรมการควบคุมยาเสพติดให้โทษว่าด้วยการกำหนดลักษณะกัญชา⁽⁵⁾ กัญชาถูกใช้เป็นพืชเสพติดและเพื่อประโยชน์ทางการแพทย์ ส่วนกัญชงเป็นพืชที่มีความเกี่ยวข้องกับขนบธรรมเนียมประเพณีและวิถีชีวิตของสังคมมนุษย์มาอย่างยาวนาน ปัจจุบันมากกว่า 30 ประเทศทั่วโลกปลูกกัญชงเป็นพืชเศรษฐกิจเช่นเดียวกับประเทศไทย มีการนำส่วนต่างๆ ของกัญชงมาใช้ประโยชน์อย่างมากมาย รวมถึงการนำสารสกัดมาใช้เป็นยา เช่น

ยารักษาอาการปวดเส้นประสาท อาการหดเกร็งของกล้ามเนื้อ อาการนอนไม่หลับเรื้อรัง เป็นต้น^(6,7) จากการศึกษาทางคลินิก พบว่าทั้ง synthetic THC และสารสกัดพืชกัญชา (high THC, high cannabidiol หรือ THC และ CBD ในอัตราส่วน 1:1) สามารถลดความรุนแรงอาการโรคของผู้ป่วย multiple sclerosis และผู้ป่วย spinal cord injury นอกจากนี้ยังช่วยเพิ่มความสามารถของผู้ป่วยในการเดิน การเขียน การควบคุมกล้ามเนื้อของกระเพาะปัสสาวะให้ดีขึ้น และสามารถนำมาใช้ในการรักษาอาการผิดปกติของระบบประสาท เช่น อาการปวดเส้นประสาทหรือโรคที่เกี่ยวข้องกับระบบประสาท เช่น Parkinson's disease ได้ดี^(8–11) การออกฤทธิ์ของสารกลุ่ม cannabinoids พบว่าออกฤทธิ์ผ่านตัวรับที่จำเพาะ เรียกว่า cannabinoid receptor ได้แก่ cannabinoid receptor 1 และ 2 (CB1 และ CB2) ซึ่งจะพบการแสดงออกโดยทั่วไปในเซลล์สมอง เซลล์ประสาทและเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน⁽¹²⁾ สารกลุ่ม cannabinoids มีส่วนเกี่ยวข้องกับกระบวนการลดการอักเสบของเซลล์บางชนิดได้ พบว่าการกระตุ้นการทำงานผ่าน receptor ส่งผลกระทบต่อกระบวนการหลั่งสาร cytokine จากเซลล์ และเมื่อมีการอักเสบของเซลล์จะมีการแสดงออกของ CB2 receptor ที่มากขึ้นแบบแปรผันตรงกับกระบวนการอักเสบ⁽¹³⁾ มีรายงานว่าพบ cannabinoid receptors บนเซลล์ผิวหนัง และ anandamide ซึ่งเป็น endocannabinoids รวมทั้ง phytocannabinoids ได้แก่ THC, CBD, cannabidiol (CBN) และ cannabigerol (CBG) สามารถยับยั้งการแบ่งตัวที่ผิดปกติของ epidermal keratinocyte ได้⁽¹⁴⁾ จากงานวิจัย การแสดงออกของ cannabinoid receptors มีความสัมพันธ์กับการอักเสบและการเกิดเป็นเซลล์มะเร็งเมื่อได้รับสิ่งกระตุ้น เช่น การสัมผัสกับแสงยูวีเป็นเวลานาน ทำให้เกิดการหลั่งของ TNF- α และ NF- κ B ซึ่งทำให้เกิดกระบวนการอักเสบ และการเกิด tumor⁽¹⁵⁾ นอกจากนี้พบว่าทั้ง THC และ CBD มีฤทธิ์ neuroprotection โดยต้านผลของ 6-hydroxydopamine ที่ทำให้เกิด neurodegeneration ในผู้ป่วยโรคพาร์กินสัน อาศัยคุณสมบัติ antioxidative และ anti-inflammatory

activity สามารถลดการสร้าง tumor necrosis factor (TNF- α), interleukin-1, nitric oxide และ biological active molecules ชนิดอื่นๆ ได้⁽¹⁶⁾ โดยเฉพาะสาร CBD ซึ่งเป็นสารที่ไม่มีฤทธิ์เสพติด (non-psychotropic effect) พบว่ามีฤทธิ์ anti-inflammatory สูง สามารถลดการสร้าง TNF- α , nitric oxide, reactive oxygen intermediates (ROI), Con-A และ arthritis murine collagen-induced arthritis (CIA) ในสัตว์ทดลอง ซึ่งอาจจะพัฒนาเป็นยารักษา rheumatoid arthritis ตัวใหม่ได้⁽¹⁷⁾ จากการศึกษาการกระตุ้นสัญญาณผ่าน cannabinoid receptor ชนิด CB1 ในเซลล์ keratinocyte พบว่าสามารถควบคุมการหลั่งสาร cytokine จากเซลล์ที่อักเสบและลดความรุนแรงของการอักเสบได้⁽¹⁸⁾ เมื่อเกิดการอักเสบของ keratinocyte จะทำให้สร้างสาร cytokine ที่ทำให้เกิดการอักเสบขึ้น ได้แก่ TNF- α , IL-1 β และ interleukin 6 (IL-6) ซึ่งจะทำให้เกิดพยาธิสภาพของผิวหนังบริเวณดังกล่าว เช่น atopic dermatitis, allergic dermatitis และ psoriasis⁽¹⁹⁾ นอกจากนี้ยังมีการศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ของน้ำมันหอมระเหย⁽²⁰⁾ สาร cannabidiolic acid (CBDA) และ CBD ที่แยกได้จากเฮมพ์หรือกัญชง⁽²¹⁾ จากการศึกษาที่ผ่านมา พบว่าสารสกัดจากใบกัญชงสามารถลดการอักเสบของเซลล์ synovocyte เมื่อถูกกระตุ้นให้เกิดการอักเสบด้วย interleukin 1-beta (IL-1 β) ได้⁽²²⁾ ผู้วิจัยมีความสนใจสารสกัดจากใบกัญชง เนื่องจากสามารถลดอาการอักเสบในผิวหนังชั้น dermis ซึ่งเกี่ยวเนื่องกับการอักเสบจากผิวหนังชั้น epidermis โดยผิวหนังชั้น dermis มีเซลล์ fibroblast เป็นองค์ประกอบและอยู่ร่วมกับเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (connective tissue) ชนิดต่าง ๆ เมื่อเซลล์ fibroblast ได้รับ proinflammatory cytokine จะกระตุ้นให้เกิดการอักเสบของเซลล์ กลายเป็น fibrosis และเกิดการขยายการอักเสบเป็นวงกว้าง เกิดการสลาย connective tissue บริเวณใกล้เคียงและทำให้เกิดพยาธิสภาพของผิวหนังชั้นในขึ้นได้⁽²³⁾

ในประเทศไทย การเพาะปลูกกัญชงมีความเกี่ยวข้องกับวัฒนธรรมของชนเผ่าม้งมาอย่างยาวนาน

โดยใช้เส้นใยถักทอเป็นเสื้อผ้าสวมใส่ในชีวิตประจำวันและประกอบพิธีกรรมตามจารีตประเพณี และรัฐบาลเล็งเห็นความสำคัญ จึงส่งเสริมให้การปลูกกัญชงเป็นพืชเศรษฐกิจซึ่งเดิมใช้ประโยชน์จากเส้นใย ลำต้น แก่นลำต้น เท่านั้น ดังนั้นการศึกษาการใช้ประโยชน์จากเศษที่เหลือและส่วนอื่นๆ จากกัญชงเพื่อเพิ่มมูลค่าสูงสุด เป็นแนวทางหนึ่งในการดำเนินการพัฒนาเพื่อสร้างมูลค่าเพิ่มของกัญชง ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 1 เชียงใหม่ ร่วมกับคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ และสถาบันวิจัยและพัฒนาพื้นที่สูง (องค์การมหาชน) จึงได้ทำการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีในสารสกัดใบกัญชงพันธุ์ปลูกต่างๆ (certified cultivars) ได้แก่ พันธุ์ปลูก RPF1, RPF2, RPF3 และ RPF4 ซึ่งเป็นพันธุ์ปลูกสำหรับใช้ประโยชน์จากเส้นใย ส่วนใบที่เหลือทิ้งนำมาสกัดและศึกษาองค์ประกอบทางเคมีในสารสกัด รวมทั้งแยกสารสกัดออกเป็น non-cannabinoids fraction และ cannabinoids fraction ของกัญชงแต่ละพันธุ์ปลูก จากนั้นทดสอบฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา เช่น ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านอักเสบ ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย และฤทธิ์ต้านเชื้อรา ในระดับหลอดทดลอง (*in vitro*) เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้ประโยชน์จากใบกัญชง ซึ่งเป็นส่วนเหลือทิ้งจากการทำเส้นใยมาใช้ประโยชน์ในทางเภสัชกรรมและเพิ่มมูลค่าให้กับกัญชง

วัสดุและวิธีการ

ตัวอย่างพืชกัญชง

กัญชงพันธุ์ปลูกที่อนุญาตให้ปลูกได้ตามกฎหมาย (certified cultivars) ตามกฎกระทรวงการขออนุญาตผลิต จำหน่าย หรือมีไว้ในครอบครองยาเสพติดให้โทษในประเภท 5 เฉพาะกัญชง พ.ศ. 2559 ปลูกโดยสถาบันวิจัยและพัฒนาพื้นที่สูง (องค์การมหาชน) กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ จำนวน 4 พันธุ์ปลูก ได้แก่ พันธุ์ปลูก RPF1 ปลูกที่ศูนย์พัฒนาโครงการหลวงขุนวาง อ.ขุนวาง จ.เชียงใหม่ พันธุ์ปลูก RPF2 ปลูกที่ศูนย์พัฒนาโครงการหลวงห้วยน้ำริน อ.เวียงป่าเป้า จ.เชียงราย พันธุ์ปลูก RPF3 และ RPF4 ปลูกที่สถานีเกษตรหลวงปางดะ อ.สะเมิง จ.เชียงใหม่ โดยเก็บตัวอย่างเฉพาะใบสดไม่เกินหนึ่งส่วนสามของลำต้น (upper third of the

main stem) หรือไม่เกิน 30 เซนติเมตร ของต้นกัญชง ในช่วงออกดอก จากนั้นนำตัวอย่างมาอบแห้งในตู้อบร้อนที่อุณหภูมิ 40 °C นาน 48 ชั่วโมง ให้มีความชื้นไม่เกิน 10% บดให้ละเอียดและร่อนผ่าน sieve ขนาด 32 mesh ได้ผงขนาดน้อยกว่า 500 µm เก็บในขวดแก้วสีชาที่อุณหภูมิ 2–8 °C

สารเคมีและสารมาตรฐาน

สารมาตรฐาน

delta-9-tetrahydrocannabinol (THC) 1 mg/mL purity 98.676±0.028%, cannabidiol (CBD) 1 mg/mL purity 99.950±0.050% และ cannabiol (CBN) 1 mg/mL purity 99.652±0.005% (Lipomed, สวิตเซอร์แลนด์), 2,2,2, triphenyl-acetophenone และ dexamethasone (Aldrich, สหรัฐอเมริกา) antibiotic discs สำเร็จรูป; chloramphenicol 30 µg/disc และ tetracycline 30 µg/disc (BD-BBL, สหรัฐอเมริกา), gentamicin 10 µg/disc (Oxoid, สหราชอาณาจักร), amphotericin B solution 250 µg/mL และ clotrimazole (Sigma, สหรัฐอเมริกา)

สารเคมีสำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญ และทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

methanol, hexane, dichloromethane (Merck, สหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี), 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) (Fluka, สหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี), potassium persulfate (Sigma-Aldrich, ญี่ปุ่น), 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) (Aldrich, สหรัฐอเมริกา), 2,4,6-Tris (2-pyridyl)-s-triazine (TPTZ) (Fluka, สวิตเซอร์แลนด์), iron (III) chloride heptahydrate (FeCl₃·6H₂O) (Sigma-Aldrich, สาธารณรัฐประชาชนจีน), glacial acetic acid, sodium acetate-3-hydrate (C₂H₃NaO₂·3H₂O) (Merck, สหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี) และ trolox (C₁₄H₁₈O₄) (Aldrich, สวิตเซอร์แลนด์)

สารเคมีสำหรับการทดสอบฤทธิ์ต้านอักเสบ

phosphate buffer solution (PBS), dulbecco's modified eagle medium (DMEM), fetal calf serum (FCS), methylthiazol tetrazolium (MTT), dimethyl sulfoxide (DMSO), lipopolysaccharide (LPS) (Gibco, สหรัฐอเมริกา), Griess's reagent (Merck, สหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี), lysis buffer (RA1, RA2 และ RA3), MDB buffer, DNase, diethylpyrocarbonate (DEPC) nuclease free water, oligo(dT) 18 primer, ribonuclease inhibitor, deoxynucleotides triphosphates (dNTPs), revertAid H minus M-MuLV reverse transcriptase, iodonitrotetrazolium chloride (GE Medical Systems, ประเทศไทย), SensiFAST™ cDNA synthesis kit และ SensiFAST™ SYBR® Lo-ROX (Bioline, สิงคโปร์)

สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียและเชื้อรา

dimethyl sulfoxide (DMSO) (Gibco, สหรัฐอเมริกา), meuller hinton agar (MHA), meuller hinton broth (MHB), potato dextrose agar (PDA), potato dextrose broth (PDB), sabouraud dextrose agar (SDA), sabouraud dextrose broth (SDB) และ reinforced clostridial medium (RCM) (Difco, สหรัฐอเมริกา) และ mcfarland standard set (Himedia, อินเดีย)

เชื้อมาตรฐานสำหรับการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียและเชื้อรา

แบคทีเรียแกรมบวก จำนวน 5 สายพันธุ์ ประกอบด้วย แบคทีเรียที่ใช้อากาศ ได้แก่ *Bacillus subtilis* DMST 15896, *Enterococcus faecalis* DMST 2860, *Staphylococcus aureus* DMST 8013, *Staphylococcus epidermidis* DMST 5868 และแบคทีเรียที่ไม่ใช้อากาศ ได้แก่ *Clostridium sporogenes* DMST 15282 แบคทีเรียแกรมลบ จำนวน 5 สายพันธุ์ ได้แก่ *Enterobacter aerogenes* DMST 8841,

Escherichia coli DMST 15537, *Pseudomonas aeruginosa* DMST 15501, *Salmonella typhimurium* DMST 562 และ *Salmonella abony* DMST 21863 ยีสต์และรา ได้แก่ *Candida albicans* DMST 5815 และ *Aspergillus niger* DMST 15538 ได้รับการสนับสนุนจากศูนย์เก็บรักษาและรวบรวมสายพันธุ์จุลินทรีย์ทางการแพทย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

เซลล์เพาะเลี้ยงสำหรับการทดสอบฤทธิ์ต้านอักเสบ

dermal fibroblast cell line (Detroit-551) และ macrophage cell line (Raw 264.7) (ATCC, สหรัฐอเมริกา)

เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ ที่มีส่วนตรวจวัดสาร 2 ชนิด คือ mass spectrometry (MS) และ flame ionization (FID) (รุ่น 7890A series GC equipped with 7693 autosampler and 5975C single Quadrupole MS, Agilent, สหรัฐอเมริกา), เครื่อง flash chromatograph (รุ่น Pure C-810, Buchi, สวิตเซอร์แลนด์), เครื่อง spectrophotometer (รุ่น 8453 UV-Vis, Agilent, สหรัฐอเมริกา), silica gel column (รุ่น Flashpure, Buchi, สวิตเซอร์แลนด์), เครื่อง real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) (รุ่น 7500 Fast, Applied Biosystem (ABI), สหรัฐอเมริกา), ชุดอุปกรณ์สำหรับสกัดสารแบบต่อเนื่อง (Soxhlet's apparatus) (NK laboratory, ไทย), เครื่องระเหยแห้ง (rotary evaporator) (รุ่น R-100, Buchi, สวิตเซอร์แลนด์), เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง (centrifuge) (รุ่น Sorvell ST8, Thermo scientific Inc., สหรัฐอเมริกา), ตู้บ่มเชื้อ (incubator) (รุ่น CCL-240B-8, Esco, สิงคโปร์), เครื่อง Thermal cycler (รุ่น S1000, Bio-rad, สหรัฐอเมริกา) และเครื่องชั่งความละเอียด 0.1 มิลลิกรัม (รุ่น Secura 224-1, Sartorius, สหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี)

การเตรียมสารสกัด

ซึ่งผงตัวอย่างใบกัญชงแห้งแต่ละพันธุ์ปลูก (RPF1, RPF2, RPF3 และ RPF4) 300 กรัม สกัดตัวอย่างด้วยเมทานอลโดยวิธี solvent extraction แบบต่อเนื่อง ใช้ Soxhlet's apparatus ได้สาร crude extract นำสารสกัดมาระเหยแห้งด้วยเครื่อง rotary evaporator และชั่งหาปริมาณสารสกัดหยาบ (crude extract) คำนวณเป็นร้อยละน้ำหนักต่อน้ำหนัก (%w/w) จากนั้นใช้เครื่อง flash chromatograph แยก fraction สารสกัดหยาบของกัญชงทั้ง 4 พันธุ์ปลูก ออกเป็น cannabinoids fraction และ non-cannabinoids fraction ด้วย silica gel column ขนาด 40 g โดยชะด้วยสารละลายผสมระหว่าง hexane กับ diethyl ether อัตราส่วน 9:1 อัตราการไหล 20 mL/min และเก็บสารที่มีการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 209 และ 280 nm ออกเป็น cannabinoids fraction ส่วน fraction ที่เหลือรวบรวมเป็น non-cannabinoids fraction จากนั้นนำแต่ละ fraction ไประเหยแห้งด้วย rotary evaporator

การวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญ⁽²⁴⁾

เตรียมสารละลายสารมาตรฐาน THC, CBD และ CBN ในเมทานอล ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.1974, 0.1999 และ 0.1993 mg/mL (stock standard solution) จากนั้นแยกเตรียมสารละลายมาตรฐาน THC, CBD และ CBN ให้มีความเข้มข้นอย่างน้อย 3 ระดับ ในช่วง 0.01–0.2 mg/mL เพื่อสร้างกราฟสารมาตรฐาน แยกปิเปตสารละลายมาตรฐาน THC, CBD และ CBN แต่ละความเข้มข้นลงใน vial แก้วสีชา ขนาด 2 mL จากนั้นเติมสารละลาย internal standard 2,2,2, triphenylacetophenone ความเข้มข้น 0.2 mg/mL ในเมทานอล ด้วยอัตราส่วน 1:1

เตรียมสารละลายตัวอย่าง โดยชั่งใบกัญชงแห้ง บดละเอียด 1 กรัม (ชั่ง 25 มิลลิกรัม สำหรับสารสกัด) สกัดด้วยเมทานอล ปริมาตร 25 mL เขย่านาน 1 ชั่วโมง กรองและนำสารละลายมาเจือจางด้วยสารละลาย internal standard 2,2,2, triphenylacetophenone ความเข้มข้น 0.2 mg/mL ด้วยอัตราส่วน 1:1

วิเคราะห์สารสำคัญโดยฉีดสารละลายตัวอย่างและสารละลายมาตรฐานอย่างละ 1 μL เข้าสู่เครื่อง GC-FID โดยใช้ DB-1 capillary column, 30 m, 0.25 mm ID, film thickness 0.25 μm โดยมีสภาวะของเครื่องมือดังนี้ อุณหภูมิส่วนฉีดสาร: 260 °C, อุณหภูมิส่วนตรวจวัดสาร: 280 °C, อุณหภูมิส่วนตู้บคอลัมน์: ตั้งที่ 230 °C นาน 7 นาที และเพิ่มอุณหภูมิไปที่ 260 °C ด้วยอัตรา 10 °C/min และตั้งที่ 260 °C นาน 2 นาที จากนั้นคำนวณหาปริมาณสารเป็น %w/w as is ของ THC, CBD และ CBN โดยใช้ peak ratio (อัตราส่วนระหว่าง peak area ของสารสำคัญกับ internal standard) ของสารสำคัญในตัวอย่าง เทียบกับ peak ratio ในสารมาตรฐาน

การศึกษาเอกลักษณ์ทางเคมี (chemical fingerprint)^(24,25)

เตรียมสารละลายตัวอย่างโดยสกัดใบกัญชงแห้งบดละเอียด 500 mg ด้วยเฮกเซนปริมาตร 10 mL เขย่านาน 1 ชั่วโมง นำไป centrifuge ที่ความเร็วรอบ 4,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที ฉีดสารละลายตัวอย่าง 1 μL เข้าสู่เครื่อง GC-MS โดยใช้คอลัมน์ DB-5MS (5% phenylmethylpolysiloxane, 30 m, 0.25 mm ID, 0.25 μm film thickness) โดยมีสภาวะเครื่องมือดังนี้ carrier gas: helium (99.999%), flow rate: 1.2 mL/min, split ratio: 1:100, อุณหภูมิส่วนฉีดสาร: 230 °C, อุณหภูมิส่วนตู้บคอลัมน์: เริ่มที่ 60 °C และเพิ่มอุณหภูมิไปที่ 240 °C ด้วยอัตรา 3 °C/min และตั้งที่ 240 °C นาน 5 นาที, อุณหภูมิ MS source: 300 °C, อุณหภูมิ single quad: 150 °C, อุณหภูมิ transfer line: 280 °C, mass range: 50–500 m/z ratio at rate of 0.5 seconds per scan, ส่วนตรวจวัด: mass-selective detector with electron impact ionization ประมวลผลด้วย enhanced chemstation software จากนั้นเปรียบเทียบ retention time และ mass spectra ของแต่ละองค์ประกอบทางเคมีในตัวอย่าง เปรียบเทียบกับ MS databases ของ NIST library version 2.0, 2011

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระใช้วิธีทดสอบที่แตกต่างกัน 3 วิธี เพื่อใช้ยืนยันฤทธิ์ ประกอบด้วย วิธี ABTS free radical scavenging assay⁽²⁶⁾ DPPH free radical scavenging assay⁽²⁷⁾ และ Ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay⁽²⁸⁾ โดยวิธีการเตรียมสารละลายสำหรับทดสอบ กระบวนการทดสอบ และการอ่านผล อ้างอิงจากงานวิจัยที่มีการระบุไว้ก่อนหน้านี้ ผลของฤทธิ์ antioxidant ที่ทดสอบ ทั้ง 3 วิธี เปรียบเทียบกับ standard curve ในช่วงความเข้มข้น 2–12 μg Trolox และแสดงเป็นค่า Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) ในหน่วย mg/g ของสารสกัด

การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียและเชื้อรา^(29–31)

Agar diffusion method: Kirby-Bauer method

การเตรียมตัวอย่าง: ละลาย crude extract, cannabinoids fraction และ non-cannabinoids fraction ของกัญชงแต่ละพันธุ์ปลูก ด้วย DMSO ให้ได้ความเข้มข้น 100 mg/mL

การเตรียมเชื้อและ inoculum: สำหรับ aerobic bacteria ให้ถ่ายเชื้อจาก MHA slant 4 °C ลง MHA fresh agar plate บ่มที่ 32.5 $\pm$ 2.5 °C นาน 24 ชั่วโมง ก่อนทดสอบ ถ่ายเชื้อ 1 loop ลงใน MHB บ่มที่ 32.5 $\pm$ 2.5 °C นาน 24 ชั่วโมง ปรับความขุ่นด้วย 0.5 McFarland standard จะได้เชื้อประมาณ 1.5 $\times$ 10⁸ cfu/mL สำหรับ anaerobic bacteria ให้ถ่ายเชื้อจาก RCM 4 °C ลง MHA fresh agar plate บ่มที่ 32.5 $\pm$ 2.5 °C นาน 24 ชั่วโมง ในสภาวะไร้อากาศ (anaerobic condition) ก่อนทดสอบ จากนั้นถ่ายเชื้อ 1 loop ลงใน RCM บ่มที่ 32.5 $\pm$ 2.5 °C นาน 24 ชั่วโมง ในสภาวะไร้อากาศ ปรับความขุ่นด้วย 0.5 McFarland standard จะได้เชื้อประมาณ 1.5 $\times$ 10⁸ cfu/mL สำหรับเชื้อยีสต์ให้ถ่ายเชื้อจาก SDA slant 4 °C ลง SDA fresh agar plate บ่มที่ 32.5 $\pm$ 2.5 °C นาน 24 ชั่วโมง ก่อนทดสอบ ถ่ายเชื้อ 1 loop ลงใน SDB บ่มที่ 32.5 $\pm$ 2.5 °C นาน 24 ชั่วโมง ปรับความขุ่น

ด้วย 0.5 McFarland standard จะได้เชื้อประมาณ 1.4×10^6 cfu/mL ส่วนเชื้อราให้ถ่ายเชื้อจาก PDA slant 4 °C ลง PDA fresh agar plate บ่มที่ 25 ± 2.5 °C นาน 7 วัน ก่อนทดสอบ ถ่ายเชื้อ 1 loop ลงใน PDB บ่มที่ 25 ± 2.5 °C นาน 7 วัน กรองให้ได้สารแขวนลอยสปอร์เชื้อรา (spore suspension) ปรับความขุ่นด้วย 0.5 McFarland standard จะได้เชื้อประมาณ $(0.6-5) \times 10^6$ cfu/mL

การเตรียม discs: นำ disc ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 mm (Whatman[®] filter paper No.1) ที่ปราศจากเชื้อ โดยอบที่ 160 °C หรือ disc สำเร็จรูปมาใส่สารสกัด 100 mg/mL ปริมาณ 20 µL ทิ้งให้ solvent ระเหยนาน 1 ชั่วโมง ในตู้ปลอดเชื้อ (เตรียมก่อนใช้ทุกครั้ง) การเตรียม negative control: ดูด DMSO 20 µL ใส่ disc ปราศจากเชื้อ ทิ้งให้ระเหย การเตรียม positive control: antibiotic discs ได้แก่ chloramphenicol 30 µg/disc, tetracycline 30 µg/disc, gentamicin 10 µg/disc, amphotericin B 100 µg/disc และ clotrimazole 100 µg/disc

การทดสอบ: เท MHA (สำหรับแบคทีเรีย), SDA (สำหรับยีสต์) และ PDA (สำหรับเชื้อรา) ลง plate 15 mL รอให้แข็ง ใช้ inoculum 0.5 mL spread ลง plate ที่แข็ง 3 ระบาย (ประมาณ 60°) โดยใช้ sterile cotton wadding paper disc ที่มี test extracts (20 µL/disc), negative control และ antibiotic discs เป็น positive control บนผิว agar plate โดยระยะห่างเท่ากันด้วย sterile forcep (ห่างกันประมาณ 15 mm) บ่มเชื้อแบคทีเรียที่เจริญโดยใช้อากาศและเชื้อยีสต์ที่ 32.5 ± 2.5 °C นาน 24 ชั่วโมง (สำหรับแบคทีเรียที่เจริญโดยไม่ใช้อากาศ บ่มที่ 32.5 ± 2.5 °C นาน 24 ชั่วโมง ในสภาวะไร้อากาศ) ส่วนเชื้อราบ่มที่ 25 ± 2.5 °C นาน 7 วัน อ่านผลโดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของ zone of inhibition หน่วยเป็น mm โดยทดสอบ 3 ซ้ำ และบันทึกผลเป็น mean $\pm$ SD

การทดสอบหาค่า Minimum inhibition concentration (MIC)

ทำการทดสอบเมื่อทราบชนิดหรือ fraction ของสารสกัดที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา วิธี microbroth dilution โดยนำสารสกัดหรือ fraction

ของสารสกัดมาละลายใน 50% DMSO และเจือจางให้มีความเข้มข้น 100–0.05 mg/mL ด้วย tryptic soy broth (TSB) ใน 96-well microplates จากนั้นเติมเชื้อที่สารสกัดหรือ fraction ของสารสกัดมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อนั้น ที่ความเข้มข้นของเชื้อ 1×10^5 cfu/mL จำนวน 50 µL บ่มที่ 37 °C นาน 24 ชั่วโมง สังเกตความขุ่น (turbidity) โดย Minimum inhibition concentration (MIC) คือ ความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่ไม่ขุ่น โดยแต่ละความเข้มข้นทำการทดสอบ 3 ซ้ำ

การทดสอบหาค่า Minimum bactericidal concentration (MBC) และ Minimal fungicidal concentration (MFC)

การทดสอบหาค่า MIC ไม่เกิดความขุ่น จะใช้วิธี MBC หรือ MFC โดยใช้ broth dilution 20 µL จาก well ที่ไม่เกิดความขุ่น มา spread บน tryptic soy agar (TSA) นำไปบ่มที่ 37 °C นาน 24 ชั่วโมง โดยค่า MBC หรือ MFC คือ ความเข้มข้นของสารสกัดหรือ fraction ของสารสกัดที่น้อยที่สุดที่สามารถฆ่าเชื้อได้ 99.9% โดยแต่ละความเข้มข้นทำการทดสอบ 3 ซ้ำ

การทดสอบฤทธิ์ต้านอักเสบ⁽³²⁻³⁴⁾

การเพาะเลี้ยงเซลล์

การศึกษานี้ใช้ Detroit-511 cell line ที่เลี้ยงใน complete DMEM เป็น model โดยทำการแบ่งเซลล์ให้ได้ความเข้มข้น 50,000 cell/mL ใช้ในการศึกษาความเป็นพิษของสารต่อเซลล์ และการทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบ ใช้ Raw 264.7 cell line ที่เลี้ยงใน complete DMEM เป็น model ในการทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบ โดยแบ่งเซลล์ให้มีความเข้มข้น 25,000 cell/mL

การทดสอบความเป็นพิษของสารต่อเซลล์ Detroit-551 ด้วยเทคนิค Methylthiazol tetrazolium (MTT) assay

เตรียมสารละลาย MTT ความเข้มข้น 5 mg/mL ในสารละลาย PBS ที่ปราศจากเชื้อ โดยก่อนนำไปใช้งานจริงให้ dilute 1:10 ด้วย complete DMEM (working MTT) ทำการเจือจางความเข้มข้นของเซลล์ Detroit-551

ให้เหลือ 50,000 cells/mL โดยใช้ complete media เติม cell suspension ปริมาตร 100 μ L (มีเซลล์จำนวนประมาณ 5,000 เซลล์) ลงใน 96-well plate แต่ละหลุมเลี้ยงนาน 24 ชั่วโมง ในตู้เพาะเลี้ยงที่ 5% CO₂ และอุณหภูมิ 37 °C เมื่อครบเวลาทำการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์เป็นอาหารเลี้ยง (incomplete media) ที่ผสมตัวอย่างสารสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ ความเข้มข้น 0, 1, 5, 10, 50, 100, 500 และ 1,000 μ g/mL ปริมาตร 100 μ L ทำการเลี้ยงต่อเนื่อง 24 ชั่วโมง ในตู้เพาะเลี้ยง จากนั้นเติม 20 μ L ของ working MTT ลงใน 96-well plate ด้วยเทคนิคปราศจากเชื้อ นำ plate บ่มที่ 37 °C นาน 4 ชั่วโมง ดูสารละลายออกจากหลุมอย่างระมัดระวังไม่ให้กระทบกระเทือนเซลล์ เติมสารละลาย DMSO 100 μ L ต่อหลุม ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที เขย่าและทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 nm และทำการคัดเลือกความเข้มข้นของสารสกัดที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบในขั้นตอนต่อไป

การทดสอบฤทธิ์ต้านอักเสบ

การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดที่ต้องการในเซลล์

Raw 264.7

ทำการเจือจางความเข้มข้นของ Raw 264.7 ใน cell suspension ให้เหลือประมาณ 25,000 cells/mL โดยใช้ incomplete media เติม cell suspension ปริมาตร 2 mL ลงในแต่ละหลุม เลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในตู้เพาะเลี้ยงที่ 5% CO₂ และอุณหภูมิ 37 °C จากนั้นเตรียมสารละลายของสารที่ต้องการจะทดสอบ ความเข้มข้น 10 μ g/mL ใน incomplete DMEM เติมสารที่ต้องการทดสอบฤทธิ์ลงในแต่ละหลุม โดยใส่สารละลาย LPS (เพื่อจำลองสภาวะการกระตุ้นการอักเสบ) ความเข้มข้น 1 μ g/mL ทำการทดสอบฤทธิ์ของสารที่สนใจเปรียบเทียบกับสาร dexamethasone ความเข้มข้น 10⁻⁷ M โดยใช้เซลล์ที่ treat ด้วย incomplete media เพียงอย่างเดียวเป็นตัวควบคุม นำ 6-well plate ดังกล่าวบ่มตู้เพาะเลี้ยง 37 °C นาน 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาทดสอบ แยก supernatant ออกไปวิเคราะห์หาปริมาณ nitric oxide ด้วยวิธี Griess's method ส่วนของ cell จะนำไปเตรียม

total RNA สำหรับการวิเคราะห์ gene expression ในขั้นตอนถัดไป โดยเซลล์ Raw 264.7 จะทำการศึกษาการแสดงออกของยีน *iNOS*, *COX2* และ *IL1B*

การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดที่ต้องการในเซลล์

Detroit-551

ขั้นตอนการทดสอบ เซลล์ Raw 264.7 มีขั้นตอนเช่นเดียวกับข้างต้น แต่มีการเลี้ยงเซลล์ Detroit-551 ควบคู่กัน โดยทำการเจือจางความเข้มข้นของ Detroit-551 ใน cell suspension ให้เหลือประมาณ 25,000 cells/mL เติม cell suspension ปริมาตร 2 mL ลงในแต่ละหลุม เลี้ยงนาน 24 ชั่วโมง ในตู้เพาะเลี้ยงที่ 5% CO₂ และอุณหภูมิ 37 °C นำ plate ที่เลี้ยง Raw 264.7 ที่เติมสารละลาย LPS ความเข้มข้น 1 μ g/mL ลงในหลุมกลุ่มจำลองสภาวะการอักเสบ เพาะบ่มจนครบเวลาดูดส่วน supernatant เพื่อนำไปใส่ใน plate ที่เลี้ยง Detroit-551 ต่อ โดยแบ่งเป็นกลุ่มควบคุมและกลุ่มจำลองสภาวะการอักเสบที่มีการ treat LPS เอาไว้ก่อนหน้านี้ จากนั้นทำการ treat สารละลายของสารที่ต้องการจะทดสอบ ความเข้มข้น 10 μ g/mL ลงไปในแต่ละกลุ่ม และใช้ dexamethasone ความเข้มข้น 10⁻⁷ M เป็นสารควบคุมบวก นำ 6-well plate ดังกล่าวบ่มในตู้เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาทดสอบ ดู cell suspension ทั้งหมดในแต่ละหลุมออก สกัด total RNA สำหรับการวิเคราะห์ gene expression โดยเซลล์ Detroit-551 จะทำการศึกษาการแสดงออกของยีน *MMP3* และ *COL2A1*

การตรวจวัดปริมาณ nitric oxide (NO)

ด้วยวิธี Griess's method

นำ supernatant จากการเพาะเลี้ยงเซลล์ที่ต้องการตรวจวัดปริมาณ nitric oxide ลงใน 96-well plate ปริมาตรหลุมละ 100 μ L เติม Griess's reagent หลุมละ 100 μ L ตั้งไว้ให้สารทำปฏิกิริยากัน 5 นาที นำ plate ดังกล่าวไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 nm โดยวัดค่าเปรียบเทียบกับ standard curve ที่ได้จากการวัดสารมาตรฐาน sodium nitrite (NaNO₂) ช่วงความเข้มข้น 0–100 nM

การเตรียม total RNA จาก cell culture

เมื่อครบเวลานำ culture plate ออกจาก incubator ตูด media ออกจากแต่ละหลุมให้หมด ทำการล้างเซลล์ด้วย PBS ปริมาตร 1 mL เติม RA 1 buffer แต่ละหลุมปริมาตร 350 μ L ผสมให้เข้ากันจนสารละลายที่ได้มีความหนืด (เซลล์เกิดการ lysis แล้ว) ตูดสารละลายลงใน column ของชุด RNA spin mini filter unit ปั่นที่ความเร็ว 13,000 $\times$ g นาน 1 นาที เพื่อกำจัดเศษเซลล์ที่เกิดจากการแตกเซลล์ ตูด filtrate ผสมกับ 70% ethanol ปริมาตร 350 μ L ใส่ลงใน RNA spin mini column ปั่นที่ 8,000 $\times$ g นาน 30 วินาที ล้าง column ด้วย MDB buffer ปริมาตร 350 μ L ปั่นที่ 11,000 $\times$ g นาน 1 นาที เติมสารละลาย DNase 95 μ L (เจือจางจาก stock 1:10) ลงในแต่ละ column ทิ้งไว้นาน 10 นาที ล้าง column ด้วย RA2 buffer ปริมาตร 200 μ L ปั่นที่ 11,000 $\times$ g นาน 1 นาที ล้าง column ด้วย RA3 buffer ปริมาตร 600 μ L ปั่นที่ 11,000 $\times$ g นาน 1 นาที ล้างซ้ำด้วย RA3 buffer ปริมาตร 250 μ L ปั่นที่ 11,000 $\times$ g นาน 2 นาที, ปั่นแห้งที่ 11,000 $\times$ g นาน 1 นาที เติม DEPC-treated H₂O ปริมาตร 40 μ L ลงใน column ปั่นที่ 11,000 $\times$ g นาน 1 นาที ได้เป็น RNA ให้นำไปเก็บที่อุณหภูมิ -80 °C ก่อนนำไปสังเคราะห์ complementary DNA

การสังเคราะห์ complementary cDNA จาก total RNA

ทำการสังเคราะห์ cDNA จาก RNA ที่สกัดได้จากขั้นตอนข้างต้นโดยใช้ชุดสกัด SensiFAST™ cDNA synthesis kit มีขั้นตอนการสังเคราะห์ดังนี้ นำสารที่ใช้ในการสังเคราะห์มาแช่ในน้ำแข็ง ผสมสารต่าง ๆ ลงใน PCR tube ดังนี้ total RNA: โดยให้มีปริมาณของ RNA 1 μ g, 5x TransAmp Buffer 4 μ L, reverse transcriptase 1 μ L และปรับปริมาตรให้ครบ 20 μ L ด้วย nuclease-free water ทำการผสมให้เข้ากันด้วย micropipette ทำการเพิ่มจำนวนของ cDNA ด้วยเครื่อง Thermal cycler ตั้งโปรแกรมการทำงานของ

เครื่องดังนี้ primer annealing ที่ 25 °C นาน 10 นาที reverse transcription ที่ 42 °C นาน 15 นาที และ inactivation ที่ 85 °C นาน 5 นาที จากนั้นแช่ในน้ำแข็ง (หรือที่อุณหภูมิ 4 °C) ผลิตภัณฑ์ที่ได้สามารถนำไปใช้สำหรับการวิเคราะห์ด้วย real-time PCR ในอัตราส่วน 1/5 ได้ หรือนำไปเก็บในตู้แช่ที่อุณหภูมิ -20 °C เพื่อนำไปวิเคราะห์ต่อไป

การทดสอบปริมาณการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค quantitative real-time PCR

เตรียม PCR mastermix ด้วยชุด SensiFAST™ SYBR® Lo-ROX โดยใน mastermix 20 μ L ประกอบด้วย 2x SensiFAST™ SYBR® Lo-ROX 10 μ L, Forward และ reverse primer ของยีนที่ต้องการศึกษา (ได้แก่ *iNOS*, *COX2*, *IL1B*, *MMP3* และ *COL2A1*) ในความเข้มข้น 10 μ M อย่างละ 0.8 μ L, cDNA template และ nuclease-free water ในปริมาณที่เหมาะสม โดย PCR mastermix เตรียมใน PCR plate ได้โดยตรง นำ PCR plate ใส่ในเครื่อง real-time PCR ทำตามขั้นตอนในคู่มือการใช้งานของเครื่อง ตั้งค่าการทำงาน Thermal cycle ดังนี้: step 1 (polymerase activation) 95 °C นาน 2 นาที, step 2-40 เป็นการทำงานวนเป็นรอบ ประกอบด้วย denaturation ที่อุณหภูมิ 95 °C นาน 5 วินาที annealing ที่อุณหภูมิ 60-65 °C นาน 10 วินาที และ extension ที่อุณหภูมิ 72 °C นาน 5-20 วินาที (ปรับตามความเหมาะสมของการวิเคราะห์ gene แต่ละตัว) เมื่อเสร็จสิ้นรอบการทำงานให้ทำการบันทึกข้อมูลแล้วนำมาวิเคราะห์ทางสถิติต่อไป

การวิเคราะห์ทางสถิติ

ใช้โปรแกรมสำเร็จรูป IBM® SPSS statistics version 20 ทดสอบด้วยสถิติ ANOVA และ Turkey's HSD test เพื่อทดสอบความแตกต่างของวิธีทดสอบ และ significant differences ตามลำดับ ใช้ Pearson's correlation coefficient ในการหาความสัมพันธ์ของข้อมูลที่ได้

ผล

ผลการวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญ (cannabinoids content) ที่สำคัญ ได้แก่ tetrahydrocannabinol (THC) และ cannabidiol (CBD) ในใบกัญชง ทั้ง 4 พันธุ์ปลูก ได้แก่ พันธุ์ปลูก RPF1, RPF2, RPF3 และ RPF4 พบว่า RPF4 มีปริมาณ THC และ CBD มากที่สุด เท่ากับ 0.04 และ 0.78 %w/w ตามลำดับ ส่วน RPF1, RPF2 และ RPF3 มีปริมาณ THC และ CBD ไม่ต่างกัน เมื่อสกัดตัวอย่างใบกัญชงด้วยเมทานอล พบว่า RPF1 มีปริมาณสารสกัดหยาบเมทานอลมากที่สุด ที่ 17.62 %w/w รองลงมาได้แก่ RPF4, RPF2 และ RPF3 ซึ่งได้ปริมาณสารสกัดไม่แตกต่างกันที่ประมาณ 11 %w/w โดยสารสกัดหยาบเมทานอลของ RPF4 มีปริมาณ THC และ CBD มากที่สุด เท่ากับ 0.37 และ 6.65 %w/w ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 1 ผลการศึกษาองค์ประกอบสารสำคัญบางชนิดในกลุ่ม terpenoids และ cannabinoids ในตัวอย่างใบ สารสกัดหยาบเมทานอล cannabinoids fraction และ non-cannabinoids fraction ของกัญชงพันธุ์ปลูกต่างๆ พบว่าสารในกลุ่ม cannabinoids ได้แก่ CBD ในสัดส่วนที่สูงที่สุดในทุกพันธุ์ปลูก โดยในตัวอย่างใบพบในช่วง 62.07–79.25 %area สารสกัดหยาบเมทานอลพบในช่วง 42.82–69.02 %area THC พบในสัดส่วนค่อนข้างน้อย ในช่วง 0.56–3.16 %area และพบ β -caryophyllene ซึ่งเป็นสารกลุ่ม terpenoids ในตัวอย่างใบและสารสกัดหยาบเมทานอลของใบกัญชงทุกพันธุ์ปลูก ดังแสดงในตารางที่ 2

จากการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดหยาบเมทานอล รวมทั้ง cannabinoids fraction และ non-cannabinoids fraction ของกัญชงทั้ง 4 พันธุ์ปลูก โดยทำการทดสอบ 3 ขั้ว และศึกษาเปรียบเทียบกับ 3 วิธี ได้แก่ วิธี ABTS, DPPH และ FRAP เมื่อทดสอบความสัมพันธ์โดยใช้ค่า Pearson's correlation coefficient (r) พบว่าการทดสอบทั้ง 3 วิธี มีความสัมพันธ์ในเชิงบวก ($0.63 \leq r \leq 0.86$, $p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของกัญชงแต่ละพันธุ์ปลูกพบว่า เป็นไปในทางเดียวกัน คือ RPF4 มีฤทธิ์ต้านอนุมูล

อิสระดีที่สุด แตกต่างจาก RPF1, RPF2 และ RPF3 อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p < 0.05$) โดย RPF1, RPF2 และ RPF3 มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระไม่แตกต่างกัน นอกจากนี้พบว่าแต่ละ fraction ได้แก่ สารสกัดหยาบเมทานอล cannabinoids fraction และ non-cannabinoids fraction มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระแตกต่างกัน โดย cannabinoids fraction มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีที่สุด รองลงมา คือ สารสกัดหยาบเมทานอล ส่วน non-cannabinoids fraction มีฤทธิ์น้อยที่สุด ดังแสดงในตารางที่ 3

จากผลการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียและเชื้อราในสารสกัดหยาบเมทานอล รวมทั้ง cannabinoids fraction และ non-cannabinoids fraction ของกัญชงทั้ง 4 พันธุ์ปลูก เมื่อประเมินจาก zone of inhibition ที่มากกว่า 6 mm พบว่าสามารถต้านแบคทีเรียแกรมบวก จำนวน 5 สายพันธุ์ คือ *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Clostridium sporogenes* และ *Enterococcus faecalis* ซึ่งมีฤทธิ์ต้านเชื้อบ้างเล็กน้อย และยีสต์ก่อโรค คือ *Candida albicans* แต่ไม่สามารถต้านแบคทีเรียแกรมลบได้ โดย cannabinoids fraction มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียมากกว่าสารสกัดหยาบเมทานอลและ non-cannabinoids fraction ของกัญชงแต่ละพันธุ์ปลูก ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ของกัญชงทั้ง 4 พันธุ์ปลูก พบว่า cannabinoids fraction ของ RPF3 มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียได้ดีที่สุด โดยสามารถต้านการเจริญของ *S. epidermidis* สูงที่สุด ส่วน cannabinoids fraction ของ RPF4 มีฤทธิ์ต้านเชื้อ *C. sporogenes* ดีที่สุด ดังแสดงในตารางที่ 4 จากนั้นทำการทดสอบหาค่า minimal inhibitory concentration (MIC) ค่า minimal bactericidal concentration (MBC) และค่า minimal fungicidal concentration (MFC) ของสารสกัดกัญชงที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียและเชื้อราของ RPF1, RPF3 และ RPF4 เพื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ของสารสกัดกัญชงทั้ง 3 ชนิด พบว่าสารสกัดหยาบเมทานอล RPF4

มีฤทธิ์ดีที่สุด สามารถยับยั้งเชื้อได้ 5 ชนิด ซึ่งพบว่า มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *C. sporogenes* สูงที่สุด โดยมีค่า MIC ของสารสกัดอยู่ที่ 0.9765 µg/mL และค่า MBC ของสารสกัดอยู่ที่ 0.9765 µg/mL รองลงมา

ยับยั้งเชื้อ *S. aureus* และ *S. epidermidis* โดยมีค่า MIC ของสารสกัดอยู่ที่ 62.5 และ 62.5 µg/mL ตามลำดับ ค่า MBC ของสารสกัดอยู่ที่ 125 และ 500 µg/mL ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 1 ปริมาณสารสำคัญในใบกัญชงและสารสกัดหยาบเมทานอลของใบกัญชงแห้งพันธุ์ปลูกต่างๆ (%w/w)

พันธุ์ปลูก	ปริมาณสารสำคัญในใบกัญชงแห้ง (%w/w, n = 2)		Yield of methanolic extracts (%w/w)	ปริมาณสารสำคัญใน สารสกัดหยาบเมทานอล (%w/w, n = 2)	
	THC	CBD		THC	CBD
RPF1	0.017±0.001	0.608±0.030	17.62	0.096±0.007	3.451±0.172
RPF2	0.014±0.001	0.616±0.036	11.48	0.122±0.008	5.365±0.214
RPF3	0.019±0.001	0.552±0.028	11.44	0.166±0.010	4.825±0.241
RPF4	0.043±0.002	0.777±0.039	11.69	0.367±0.022	6.647±0.266

การศึกษาความเป็นพิษ (cytotoxicity) ของสารสกัดใบกัญชงต่อเซลล์ผิวหนัง Detriot-551 (Dermal fibroblast cell line) ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสมที่จะใช้ในการทดสอบและไม่ทำให้เซลล์เสียชีวิต โดยใช้วิธี MTT assay สารที่ต้องการศึกษา คือ สารสกัดหยาบเมทานอล cannabinoids fraction และ non-cannabinoids fraction ของสารสกัดจากใบกัญชงทั้ง 4 พันธุ์ปลูก (RPF1, RPF2, RPF3 และ RPF4) ความเข้มข้น 0, 1, 5, 10, 50, 100, 500 และ 1,000 µg/mL ใน DMSO 0.04% โดยผลการศึกษา cytotoxicity test พบว่าที่ความเข้มข้นสูง (> 50 µg/mL) สารสกัดหยาบเมทานอลและทุก fraction ของสารสกัดจากใบกัญชงมีความเป็นพิษต่อ Detroit-551 ค่อนข้างมาก คือ % cell survival น้อยกว่า 50% แต่เมื่อลดความเข้มข้นลงเหลือ 10 µg/mL พบว่าร้อยละของเซลล์ที่ยังคงมีชีวิตรอดมากกว่า 90% จึงเลือกใช้ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบและทุก fraction ของ

สารสกัดจากใบกัญชงที่ 10 µg/mL ในการศึกษาฤทธิ์ต้านอักเสบต่อไป ดังแสดงในภาพที่ 1

กระบวนการอักเสบ biological marker ที่สามารถตรวจวัดได้ง่ายอย่างหนึ่ง คือ ปริมาณของสาร nitric oxide (NO) ในการศึกษาผลของสารสกัดจากใบกัญชงต่อการสร้างสาร nitric oxide เลือกใช้เซลล์ Raw 264.7 ซึ่งเป็น macrophage cell line เมื่อเติมสารสกัดหยาบเมทานอล cannabinoids fraction และ non-cannabinoids fraction ของใบกัญชงทั้ง 4 พันธุ์ปลูกในความเข้มข้น 10 µg/mL ลงในเซลล์ Raw 264.7 ที่ถูกกระตุ้นให้เกิดการอักเสบและนำไปวัดหาปริมาณ NO ด้วยวิธี Griess's method พบว่าสารสกัดใบกัญชงในกลุ่มสารสกัดหยาบเมทานอลของ RPF1 และ RPF4 และใน cannabinoids fraction เท่านั้นที่สามารถลดการสร้าง NO จากเซลล์ที่ถูกกระตุ้นให้เกิดการอักเสบได้อย่างมีนัยสำคัญ ดังแสดงในภาพที่ 2

ตารางที่ 2 องค์ประกอบทางเคมีของสารบางชนิดในกลุ่ม terpenoids cannabinoids ในตัวอย่างใบ สารสกัดหยาบเมทานอล และสารสกัดแยกส่วนของกัญชงพันธุ์ปลูก RPF1, RPF2, RPF3 และ RPF4 วิเคราะห์โดยใช้วิธี GC-MS (เปรียบเทียบ retention time และ MS databases ของ NIST library version 2.0, 2011)

Compounds	MW	RT	%Area ในตัวอย่างใบกัญชงแห้ง				%Area ในสารสกัดหยาบเมทานอล				%Area ใน cannabinoids fraction				%Area ใน non-cannabinoids fraction			
			RPF1	RPF2	RPF3	RPF4	RPF1	RPF2	RPF3	RPF4	RPF1	RPF2	RPF3	RPF4	RPF1	RPF2	RPF3	RPF4
β -Caryophyllene	204.188	23.738	0.87	0.45	2.35	0.5	0.96	0.45	0.70	0.45	ND	ND	ND	0.23	ND	ND	ND	ND
Humulene	204.188	25.185	ND	ND	0.62	0.14	ND	ND	0.27	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Caryophyllene oxide	220.183	30.358	ND	ND	ND	ND	ND	0.78	0.63	0.64	ND	ND	0.36	0.62	ND	ND	ND	ND
α -Bisabolol	222.198	34.104	ND	0.3	ND	0.28	ND	0.27	ND	0.23	ND	ND	ND	0.27	ND	ND	ND	ND
CBDV	286.41	51.082	13.23	ND	11.23	24.82	10.70	ND	14.45	25.43	11.41	ND	15.63	28.46	ND	ND	ND	ND
THCV	286.41	53.868	ND	ND	ND	1.5	ND	ND	ND	1.81	ND	ND	ND	2.21	ND	ND	ND	ND
Cannabispiran	246.126	55.284	0.91	ND	ND	1.21	0.69	ND	0.91	1.55	ND	ND	ND	0.68	ND	ND	ND	ND
CBD	314.225	56.732	71.02	79.25	71.83	62.07	69.02	57.36	47.75	42.82	71.31	67.21	55.62	49.48	2.12	7.15	1.89	0.87
CBC	314.225	57.064	2.1	2.23	2.49	2.2	1.46	0.97	1.42	1.22	2.34	1.37	2.23	1.99	ND	ND	ND	ND
Cannabicaumaronone	328.204	58.595	0.76	ND	ND	ND	0.69	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Δ^9 -THC	314.225	59.306	2.85	0.84	1.09	1.74	1.19	0.56	1.52	2.64	2.56	1.17	2.45	3.16	ND	ND	ND	0.53

หมายเหตุ: ND = not detected

จากผลการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากใบกัญชงต่อการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบในเซลล์ Raw 264.7 พบว่าสารสกัดหยาบเมทานอลและ cannabinoids fraction จากใบกัญชงทั้ง 4 พันธุ์ปลูกสามารถลดการแสดงออกของยีน *iNOS* และ *COX2* ได้อย่างมีนัยสำคัญ แต่มีความสามารถในการลดการแสดงออกของยีน *IL1B* ได้ไม่ดีเท่าที่ควร ดังแสดงในภาพที่ 3

จากผลการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากใบกัญชงต่อการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบในเซลล์ Detroit-551 พบว่า สารสกัดหยาบเมทานอลและ cannabinoids fraction จากใบกัญชงทั้ง 4 พันธุ์ปลูกลดการแสดงออกของยีน *MMP3* ได้อย่างมีนัยสำคัญ และพบว่ามีเพียง crude extract และ cannabinoids fraction จากพันธุ์ปลูก RPF1 และ RPF4 ที่สามารถลดการแสดงออกของยีน *COL2A1* ได้อย่างมีนัยสำคัญ ดังแสดงในภาพที่ 4

ตารางที่ 3 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของกัญชงทั้ง 4 พันธุ์ปลูก โดยใช้วิธี ABTS, DPPH และ FRAP (ค่าเฉลี่ย $\pm$ SD, n = 3)

Hemp cultivars	Fraction	Anti-oxidant activity (mg TE/g สารสกัด)		
		ABTS	DPPH	FRAP
RPF1	Methanolic crude extract	97.84 $\pm$ 10.62	54.56 $\pm$ 0.48	99.82 $\pm$ 1.45
	Cannabinoid fraction	147.67 $\pm$ 9.16	73.27 $\pm$ 1.07	113.90 $\pm$ 2.13
	Non-cannabinoids fraction	66.65 $\pm$ 3.32	48.20 $\pm$ 0.87	82.42 $\pm$ 1.84
RPF2	Methanolic crude extract	139.30 $\pm$ 11.78	44.11 $\pm$ 0.78	91.13 $\pm$ 1.24
	Cannabinoid fraction	153.96 $\pm$ 2.41	62.12 $\pm$ 0.91	103.40 $\pm$ 0.92
	Non-cannabinoids fraction	89.26 $\pm$ 2.75	40.06 $\pm$ 0.57	79.37 $\pm$ 4.38
RPF3	Methanolic crude extract	104.71 $\pm$ 5.31	51.17 $\pm$ 0.51	109.55 $\pm$ 4.58
	Cannabinoid fraction	118.36 $\pm$ 4.62	62.89 $\pm$ 1.46	120.71 $\pm$ 1.30
	Non-cannabinoids fraction	76.29 $\pm$ 5.18	53.15 $\pm$ 0.31	87.21 $\pm$ 0.72
RPF4	Methanolic crude extract	115.05 $\pm$ 6.68	70.07 $\pm$ 2.42	143.24 $\pm$ 1.75
	Cannabinoid fraction	180.84 $\pm$ 6.36	88.02 $\pm$ 2.10	153.99 $\pm$ 5.92
	Non-cannabinoids fraction	114.36 $\pm$ 7.89	57.37 $\pm$ 1.36	127.93 $\pm$ 5.23

ตารางที่ 4ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียและราชนิดต่างๆของสารสกัดกัญชงพันธุ์ปลูก RPF1, RPF2, RPF3 และ RPF4 (ค่าเฉลี่ย±SD, n = 3)

Zone of inhibition (mm) (Mean±SD, n = 3)													
Hemp cultivars	Fraction/ antibiotics	<i>E. coli</i>	<i>S. Abony</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>aeruginosa</i>	<i>aerogenes</i>	<i>faecalis</i>	<i>sporogenes</i>	<i>epidermidis</i>	<i>aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>C. albicans</i>	<i>A. niger</i>
RPF1	CE	6.00±0.00	6.00±0.00	6.00±0.00	6.00±0.00	6.00±0.00	6.67±0.58	7.00±0.00	10.00±1.00	9.50±0.87	9.67±0.58	6.17±0.29	6.00±0.00
	CBs	6.00±0.00	6.00±0.00	6.00±0.00	6.00±0.00	6.00±0.00	7.00±0.00	8.00±0.00	12.00±0.00	11.00±1.00	10.33±0.58	6.00±0.00	6.00±0.00
	Non-CBs	6.00±0.00	6.00±0.00	6.00±0.00	6.00±0.00	6.00±0.00	6.00±0.00	6.50±0.00	7.00±0.00	6.83±0.29	6.67±0.58	6.00±0.00	6.00±0.00
RPF2	CE	6.00±0.00	6.00±0.00	6.00±0.00	6.00±0.00	6.00±0.00	7.67±0.58	6.00±0.00	9.00±0.00	8.00±0.00	9.00±0.00	6.00±0.00	6.00±0.00
	CBs	6.00±0.00	6.00±0.00	6.00±0.00	6.00±0.00	6.00±0.00	7.00±0.00	7.00±0.00	8.33±0.58	7.33±0.58	8.00±0.00	6.17±0.29	6.00±0.00
	Non-CBs	6.00±0.00	6.00±0.00	6.00±0.00	6.00±0.00	6.00±0.00	6.00±0.00	6.50±0.00	7.00±0.00	6.33±0.29	6.17±0.29	6.00±0.00	6.00±0.00
RPF3	CE	6.00±0.00	6.00±0.00	6.00±0.00	6.00±0.00	6.00±0.00	6.83±0.29	7.67±0.58	15.33±1.53	10.00±0.00	12.00±1.00	6.67±0.58	6.00±0.00
	CBs	6.00±0.00	6.00±0.00	6.00±0.00	6.00±0.00	6.00±0.00	8.00±0.00	10.33±0.58	16.33±0.58	13.33±0.58	14.67±0.58	6.67±0.29	6.00±0.00
	Non-CBs	6.00±0.00	6.00±0.00	6.00±0.00	6.00±0.00	6.00±0.00	7.00±0.00	6.50±0.00	13.67±1.15	6.83±0.29	9.00±1.00	6.00±0.00	6.00±0.00
RPF4	CE	6.00±0.00	6.00±0.00	6.00±0.00	6.00±0.00	6.00±0.00	6.50±0.50	11.67±0.58	11.00±0.00	10.33±0.58	10.50±0.50	6.00±0.00	6.00±0.00
	CBs	6.00±0.00	6.00±0.00	6.00±0.00	6.00±0.00	6.00±0.00	6.50±0.00	13.00±0.00	9.67±0.58	10.50±0.50	9.33±0.58	6.00±0.00	6.00±0.00
	Non-CBs	6.00±0.00	6.00±0.00	6.00±0.00	6.00±0.00	6.00±0.00	6.33±0.29	6.00±0.00	9.67±1.15	7.83±0.29	8.33±0.58	14.00±0.00	6.00±0.00
control (n=2)	Chloram.	26.67±1.53	26.00±0.00	30.67±0.58	7.00±0.00	22.67±2.31	20.33±0.58	43.33±1.15	33.67±0.58	23.00±1.00	32.00±1.00	ND	ND
	Tetra.	20.33±1.15	22.67±1.53	22.33±1.53	6.67±0.29	20.00±1.73	8.33±0.58	56.00±2.65	42.00±0.00	23.00±0.00	30.00±0.00	ND	ND
	Genta.	17.67±0.58	22.00±1.00	25.00±0.00	18.67±0.58	17.67±0.58	10.67±1.15	6.50±0.50	27.00±0.00	22.00±0.00	27.00±0.00	ND	ND
	Clotri.	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	9.33±1.15	9.33±0.58
	Ampho.	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	6.00±0.00	6.00±0.00

หมายเหตุ : ND = not determined, CE = methanolic crude extract, CBs = cannabinoids fraction, non-CBs = non cannabinoids fraction tested micro-organisms: *Enterococcus faecalis*, *Salmonella abony*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli*, *Clotridium sporogenes*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans*, *Aspergillus niger*

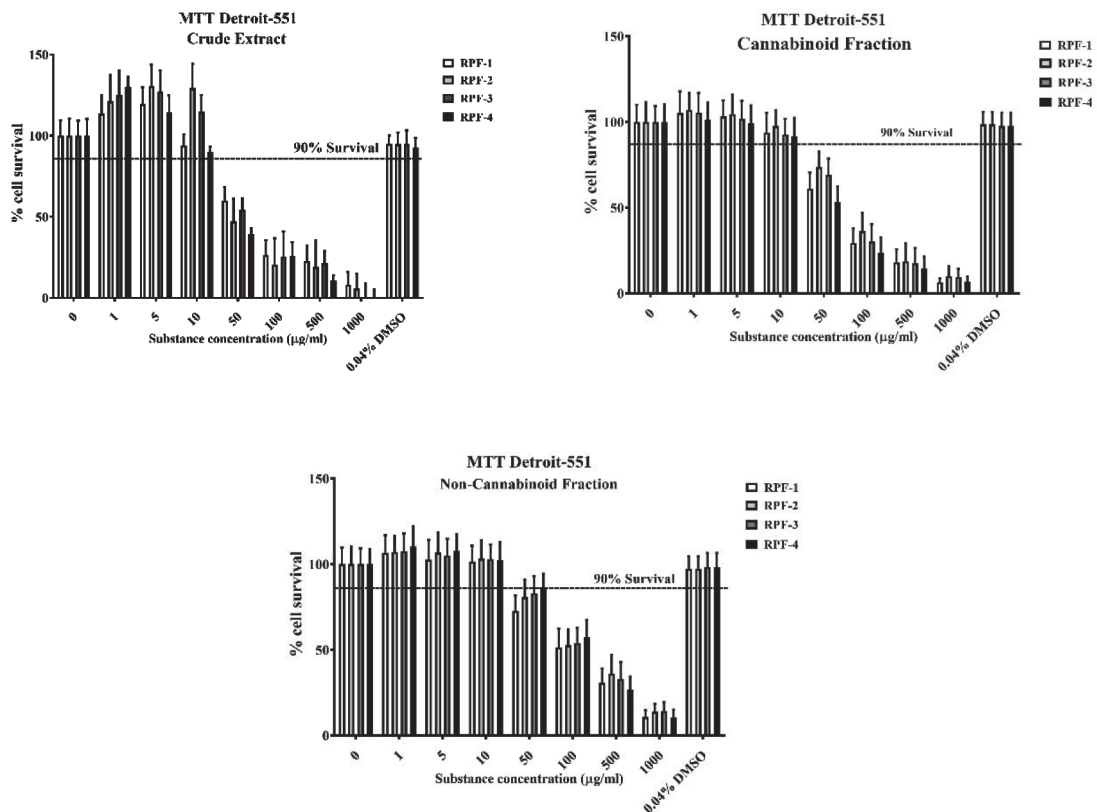
antibiotics used as positive control: Chloram. = chloramphenicol 30 µg/disc, Tetra. = tetracycline 30 µg/disc,

Genta. = gentamycin 10 µg/disc, Clotri. = clotrimazole 100 µg/disc, Ampho. = amphotericin B 100 µg/disc

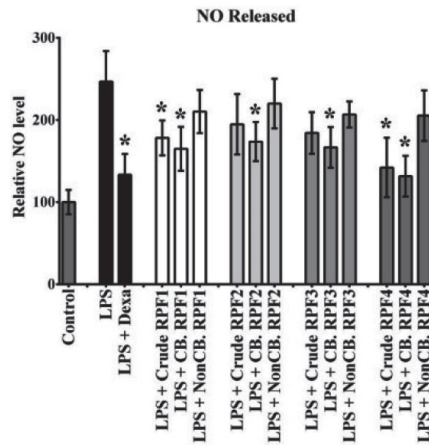
ตารางที่ 5 ค่า minimal inhibitory concentration (MIC) ค่า minimal bactericidal concentration (MBC) และค่า minimal fungicidal concentration (MFC) ของสารสกัดหยาบเมทานอลกัญชงพันธุ์ปลูกร PF1, PF3 และ PF4 (n = 3)

ตัวอย่าง/เชื้อ	RPF1		RPF3		RPF4	
	MIC ($\mu\text{g/mL}$)	MBC/MFC ($\mu\text{g/mL}$)	MIC ($\mu\text{g/mL}$)	MBC/MFC ($\mu\text{g/mL}$)	MIC ($\mu\text{g/mL}$)	MBC/MFC ($\mu\text{g/mL}$)
<i>S. aureus</i>	62.5	125	125	250	62.5	125
<i>S. epidermidis</i>	62.5	250	125	500	62.5	500
<i>B. subtilis</i>	250	500	250	500	250	500
<i>C. sporogenes</i>	-	-	0.9765	0.9765	0.9765	0.9765
<i>C. albicans</i>	-	-	-	-	250	500

หมายเหตุ: เครื่องหมาย “-” หมายถึง ไม่ได้ทำการทดสอบเนื่องจากไม่มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์

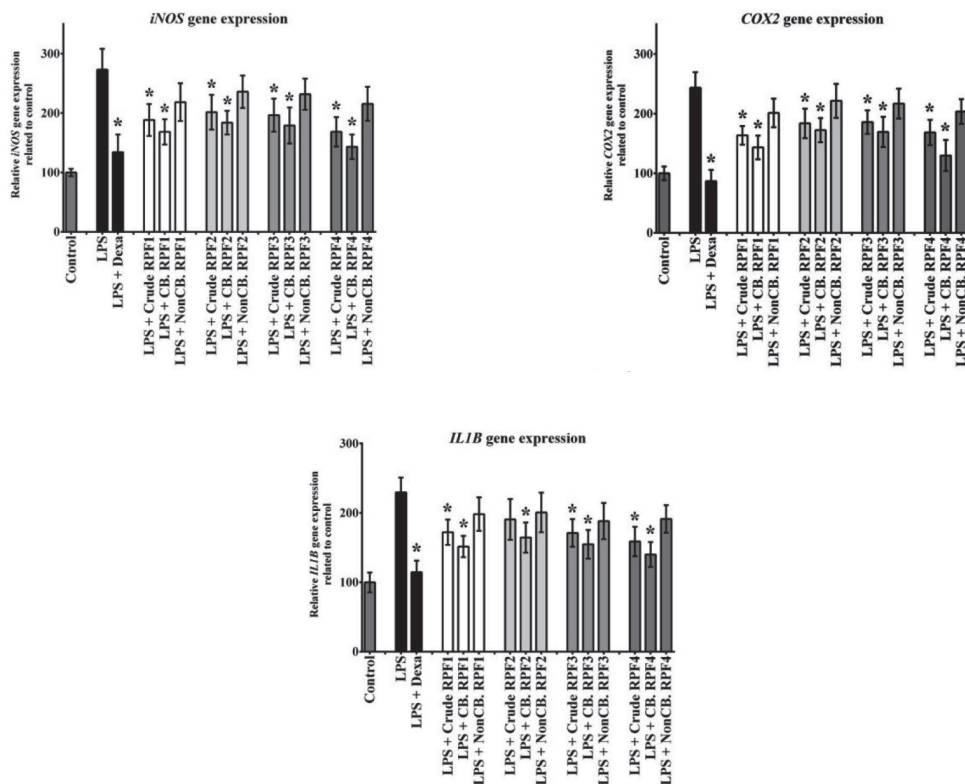


ภาพที่ 1 การศึกษาความเป็นพิษ (cytotoxicity test) ต่อเซลล์ Detroit-551 ของสารสกัดหยาบเมทานอลและสารสกัดแยกส่วนใบกัญชงพันธุ์ปลูกร PF1, PF2, PF3 และ PF4



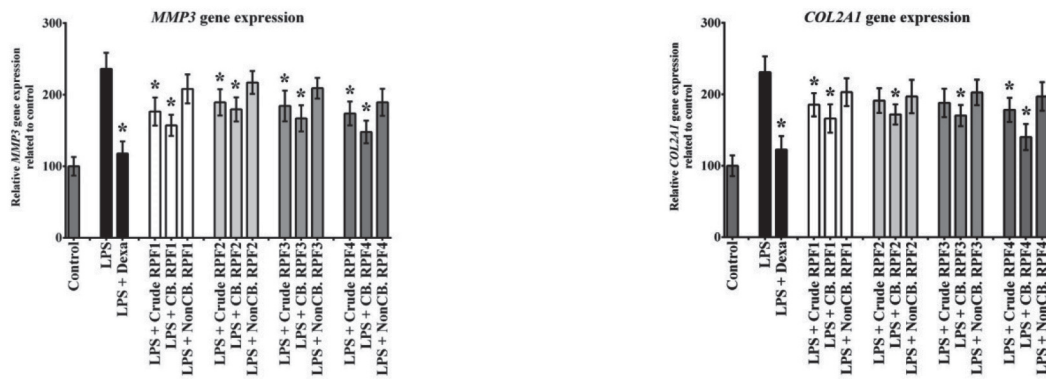
* = มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ถูกให้ LPS เพื่อให้เกิดการอักเสบระดับเซลล์
 LPS = lipopolysaccharide, Dexamethasone = dexamethasone
 CB = cannabinoid fraction, NonCB = non-cannabinoid fraction

ภาพที่ 2 ผลของสารสกัดหยาบเมทานอลและสารสกัดแยกส่วนใบกัญชงพันธุ์ปลูก RPF1, RPF2, RPF3 และ RPF4 ต่อปริมาณ NO เมื่อเกิดการอักเสบในเซลล์ Raw 264.7



* = มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ถูกให้ LPS เพื่อให้เกิดการอักเสบระดับเซลล์
 LPS = lipopolysaccharide, Dexamethasone = dexamethasone
 CB = cannabinoid fraction, NonCB = non-cannabinoid fraction

ภาพที่ 3 ผลของสารสกัดหยาบเมทานอลและสารสกัดแยกส่วนใบกัญชงพันธุ์ปลูก RPF1, RPF2, RPF3 และ RPF4 ต่อการแสดงออกของยีน *iNOS*, *COX2* และ *IL1B* เมื่อเกิดการอักเสบ



- * = มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ถูกให้ LPS เพื่อให้เกิดการอักเสบระดับเซลล์
 LPS = lipopolysaccharide, Dexamethasone = dexamethasone
 CB = cannabinoid fraction, NonCB = non-cannabinoid fraction

ภาพที่ 4 ผลของสารสกัดหยาบเมทานอลและสารสกัดแยกส่วนใบกัญชงพันธุ์ปลูก RPF1, RPF2, RPF3 และ RPF4 ต่อการแสดงออกของยีน *MMP3* และ *COL2A1* เมื่อเกิดการอักเสบ

วิจารณ์

ปริมาณสารสำคัญในตัวอย่างใบกัญชง ซึ่งเป็นส่วนที่เหลือทิ้งและสารสกัดหยาบเมทานอลของใบกัญชงทั้ง 4 พันธุ์ปลูก ได้แก่ RPF1, RPF2, RPF3 และ RPF4 พบว่าสารสำคัญที่พบมาก ได้แก่ THC และ CBD โดยไม่พบ CBN ซึ่งเป็นสารสลายตัวของ THC ในทุกตัวอย่าง ในตัวอย่างใบพบว่ามีความเข้มข้น THC ในช่วง 0.01–0.04 %w/w และปริมาณ CBD ในช่วง 0.55–0.78 %w/w ส่วนสารสกัดหยาบเมทานอลมีปริมาณ THC ในช่วง 0.09–0.36 %w/w และปริมาณ CBD ในช่วง 3.45–6.64 %w/w ดังแสดงในตารางที่ 1 โดยมีอัตราส่วน CBD:THC เท่ากับ 35, 44, 29 และ 18 ตามลำดับ พบว่า RPF4 มีปริมาณ THC และ CBD มากกว่าพันธุ์ปลูกอื่น เช่นเดียวกับข้อมูลการขึ้นทะเบียนพันธุ์ของทั้ง 4 พันธุ์ปลูก เมื่อปี พ.ศ. 2554 RPF4 มี THC มากกว่าพันธุ์ปลูกอื่น อย่างไรก็ตามลักษณะทางกายภาพ ได้แก่ ลำต้น ใบ ดอก ไม่ต่างกัน ยกเว้นเมล็ดซึ่ง RPF3 มีเมล็ดขนาดใหญ่และมีน้ำหนักต่อ 1,000 เมล็ด มากกว่าพันธุ์ปลูกอื่น⁽³⁵⁾ เมื่อศึกษาองค์ประกอบทางเคมีในกัญชง ดังแสดงในตารางที่ 2 พบสาร terpenoids เฉพาะกลุ่ม sesquiterpenoids ที่มี molecular weight มากกว่าหรือเท่ากับ 204⁽³⁶⁾ ได้แก่

β -caryophyllene, humulene และ α -bisabolol สารกลุ่ม cannabinoids ได้แก่ cannabivarin (CBDV), tetrahydrocannabivarin (THCV), cannabichromene (CBC), CBD และ THC ซึ่งแต่ละพันธุ์ปลูกมีลักษณะองค์ประกอบที่แตกต่างกัน เช่น THCV พบเฉพาะใน RPF4 สอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ โดย RPF4 ได้รับการปรับปรุงพันธุ์มาจากพันธุ์ปลูก PU⁽²²⁾ อีกทั้งพบว่าปริมาณและชนิดของสารสำคัญที่พบในตัวอย่างกัญชงครั้งนี้มีน้อยกว่ามาก เนื่องจากการปรับปรุงพันธุ์ เพื่อลดปริมาณ THC ให้ต่ำมากๆ และเพิ่มปริมาณเส้นใยทำให้สารสำคัญอื่นๆ ลดลง ปริมาณ THC จะแปรผกผันกับลักษณะทางกายภาพของต้นกัญชง ได้แก่ ปริมาณเส้นใย ขนาดความสูงและขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของลำต้น⁽³⁷⁾ นอกจากนี้ใน cannabinoids fraction มีองค์ประกอบทางเคมีของสารในกลุ่ม terpenoids บางชนิด และ cannabinoids เช่นเดียวกับที่พบในสารสกัดหยาบเมทานอล ส่วน non-cannabinoids fraction พบมีสารกลุ่ม cannabinoids เช่น CBD และ THC เช่นกัน แต่มีปริมาณน้อยกว่าที่พบในสารสกัดหยาบเมทานอลและใน cannabinoids fraction อาจเนื่องจากสภาวะในการ

แยกส่วนด้วยวิธี flash chromatography ยังไม่เหมาะสม ทำให้การสกัดสารแยกส่วนไม่สมบูรณ์

จากการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดหยาบเมทานอล รวมทั้ง cannabinoids fraction และ non-cannabinoids fraction ของกัญชงทั้ง 4 พันธุ์ปลูก ดังแสดงในตารางที่ 3 พบว่า RPF4 มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีที่สุด ส่วน RPF1 RPF2 และ RPF3 มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระไม่แตกต่างกัน และพบว่าตัวอย่างแต่ละชนิดของกัญชงมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระแตกต่างกัน โดย cannabinoids fraction มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีที่สุดเมื่อทดสอบด้วย 3 วิธี โดยมีค่า Trolox equivalent antioxidant capacity เฉลี่ย ในช่วง 71.57–150.20 mg TE/g รองลงมา คือ สารสกัดหยาบเมทานอล มีค่าในช่วง 54.98–114.22 mg TE/g ส่วน non-cannabinoids fraction มีฤทธิ์น้อยที่สุด มีค่าในช่วง 49.69–94.23 mg TE/g ใน cannabinoid fraction ของกัญชง ประกอบด้วยสารสำคัญหลัก คือ CBD และ THC บ้างเล็กน้อย และสารประกอบ terpenophenolic อื่น ๆ รวมเรียกว่า phytocannabinoids ซึ่งออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระอย่างมีนัยสำคัญ โดยสามารถป้องกันการเกิดปฏิกิริยาทั้ง primary และ secondary oxidation สารสกัดด้วยตัวทำละลายจะมีฤทธิ์ดีกว่าสารสกัดด้วยน้ำ แต่ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมีความแตกต่างกันขึ้นกับพันธุ์ปลูก การปลูก และลักษณะองค์ประกอบสารสำคัญของสารสกัดที่ได้^(38,39)

ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียและเชื้อราในสารสกัดหยาบเมทานอลรวมทั้ง cannabinoids fraction และ non-cannabinoids fraction ของสารสกัดกัญชงทั้ง 4 พันธุ์ปลูก พบว่า cannabinoids fraction มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียได้ดีที่สุด เมื่อพิจารณาองค์ประกอบทางเคมี cannabinoids fraction มีสารสำคัญในกลุ่ม cannabinoids เช่น CBDV, CBD, CBC และ THC ไม่ต่างจากที่พบในสารสกัดหยาบ แต่มีสัดส่วนสูงกว่าทำให้มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียดีกว่า จากการทบทวนวรรณกรรม พบว่าโครงสร้างของ cannabinoids ที่มีโครงสร้างเป็น monoterpene moiety ร่วมกับมี pentyl side chain ได้แก่ CBG, CBD, CBC และ THC มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียดีที่สุด

โดยเฉพาะพันธุ์ปลูกที่มี THC สูง⁽⁴⁰⁾ จากผลการศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของ cannabinoids fraction ไม่ต่างจากสารสกัดหยาบเมทานอล การศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาเพื่อเพิ่มมูลค่าเพิ่มของส่วนเหลือทิ้งของกัญชง ดังนั้นเพื่อประหยัดต้นทุนของสารสกัดจึงทำการศึกษาทดสอบหาค่า MIC, MBC และ MFC โดยใช้สารสกัดหยาบเมทานอลและศึกษาเฉพาะพันธุ์ปลูก RPF1, RPF3 และ RPF4 เนื่องจากเมล็ดพันธุ์ปลูก RPF2 มีปริมาณน้อยไม่เพียงพอที่จะส่งเสริมให้เกษตรกรปลูก ทำให้ตัวอย่าง RPF2 ในงานวิจัยนี้มีปริมาณน้อยไม่เพียงพอต่อการศึกษา อีกทั้งเป็นการส่งเสริมเกษตรกรของมูลนิธิโครงการหลวงและสถาบันวิจัยและพัฒนาพื้นที่สูง (องค์การมหาชน) ให้สามารถปลูกกัญชงได้ทั่วไปและสามารถใช้ประโยชน์ได้ทั้งเส้นใยและเมล็ด แต่พันธุ์ปลูก RPF1 และ RPF4 มีข้อจำกัดคือ ต้องปลูกในพื้นที่ที่มีความสูงมากกว่า 1,200 เมตร จากระดับน้ำทะเลและมีอากาศค่อนข้างเย็น ปัจจุบัน RPF3 ได้รับการส่งเสริมให้เกษตรกรปลูกมากที่สุด เนื่องจากสามารถปลูกได้ในพื้นที่ราบทั่วไปที่มีอุณหภูมิสูงกว่าพื้นที่สูง ดังแสดงในตารางที่ 4 และ 5 จากการศึกษาพบว่าสารสกัดหยาบเมทานอลของทั้ง 3 พันธุ์ปลูก มีฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. aureus*, *S. epidermidis* และ *B. subtilis* โดยมีค่า MIC ในช่วง 62.5–250 µg/mL และค่า MBC ในช่วง 125–500 µg/mL โดยเฉพาะ RPF3 และ RPF4 มีฤทธิ์ต้านเชื้อ *C. sporogenes* ดีที่สุด โดยมีค่า MIC และ MBC อยู่ที่ 0.9765 µg/mL นอกจากนี้พบว่า RPF4 มีฤทธิ์ต้าน *C. albicans* ได้บ้าง โดยมีค่า MIC อยู่ที่ 250 µg/mL ค่า MFC อยู่ที่ 500 µg/mL และพบว่าฤทธิ์ของสารสกัดหยาบในการศึกษานี้ดีกว่าที่เคยศึกษาในสารสกัดหยาบเมทานอลของ *C. sativa* ที่สามารถต้านเชื้อ *S. aureus* และ *B. subtilis* มี MIC เท่ากับ 1.56 mg/mL⁽⁴¹⁾ แต่มีฤทธิ์น้อยกว่าที่มีในรายงานของ Martinenghi LD และคณะ⁽²¹⁾ ซึ่งศึกษาโดยการแยกสาร CBDA และ CBD จากสารสกัดกัญชงที่สกัดด้วยเอทานอลให้มีความบริสุทธิ์สูง สามารถต้านเชื้อ *S. aureus* และ *S. epidermidis* โดยมีค่า MIC ของสารสกัดอยู่ที่ 1–2 µg/mL แต่ไม่มีผลต่อแบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่

E. coli และ *Ps. aeruginosa* นอกจากนี้ น้ำมันหอมระเหยจากกัญชง ซึ่งมีสารสำคัญในกลุ่ม terpenes ได้แก่ monoterpenes และ sesquiterpenes มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อดื้อยาและเชื้อกลุ่มแบคทีเรียแกรมบวกส่วนใหญ่และแกรมลบบางส่วน เช่น *C. sporogenes*, *S. aureus* และ *S. epidermidis* ซึ่งพันธุ์ปลูกกัญชงที่แตกต่างกันให้ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียแตกต่างกัน⁽²⁰⁾ จากผลการศึกษาสารสกัดกัญชงมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียแกรมบวกและก่อให้เกิดโรคได้ดี โดยเฉพาะ *C. sporogenes* ที่พบค่า MIC ต่ำถึง 0.9765 µg/mL แสดงถึงฤทธิ์การต้านเชื้อที่ดีมาก และสารสกัดจากพืชที่ MIC น้อยกว่า 100 µg/mL ยังจัดว่ามีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย⁽⁴²⁾

ผลการศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดจากใบกัญชงต่อเซลล์ Detroit-551 พบว่าทุกพันธุ์ปลูกที่ความเข้มข้น 10 µg/mL เซลล์ยังคงมีชีวิตรอดมากกว่า 90% จึงเลือกใช้ความเข้มข้นนี้ในการศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบ โดยศึกษาในเซลล์ Raw 264.7 ซึ่งเป็น macrophage cell line ที่สามารถกระตุ้นกระบวนการอักเสบได้ง่ายและผลิต nitric oxide (NO) ออกมาในปริมาณสูง เมื่อใช้ LPS ความเข้มข้น 1 µg/mL สามารถกระตุ้นให้เซลล์เกิดการอักเสบได้โดยปริมาณ NO ที่เซลล์สร้างขึ้นเพิ่มขึ้นประมาณ 2.5 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม และ dexamethasone ซึ่งเป็นยาในกลุ่ม steroids ที่มีฤทธิ์ต้านการอักเสบ ความเข้มข้น 10^{-7} M ที่ใช้เป็น positive control สามารถลดระดับของ NO จากเซลล์ที่ถูกกระตุ้นทำให้การอักเสบกลับมาอยู่ในระดับปกติได้ สำหรับผลในการลดการอักเสบมีเพียง cannabinoids fraction ของสารสกัดใบกัญชง ทั้ง 4 พันธุ์ปลูก และสารสกัดหยาบเมทานอลของพันธุ์ปลูก RPF1 และ RPF4 เท่านั้น ที่สามารถลดการสร้าง NO อย่างมีนัยสำคัญ อาจเนื่องมาจากสารกลุ่ม cannabinoids และมีความสัมพันธ์กับ antioxidant properties ของสารสกัด เมื่อพิจารณากระบวนการอักเสบในระดับเซลล์ NO ถูกสร้างขึ้นจากการทำงานของเอนไซม์ iNOS ซึ่งถูกกระตุ้นให้มีการสร้างและทำงานมากขึ้นเมื่อเกิดการอักเสบ มีความเกี่ยวข้องกับการแสดงออกและการทำงานของเอนไซม์ COX-2 ที่ควบคุมกระบวนการสร้างสารกลุ่ม

prostaglandin ซึ่งมีบทบาทสำคัญในกระบวนการอักเสบ เมื่อเกิดการอักเสบในระดับเซลล์จะมีการสร้างสาร cytokines เรียกว่า IL-1β ซึ่งมีหน้าที่ในการขยายสัญญาณการอักเสบระดับเซลล์ให้มากยิ่งขึ้นและมีบทบาทสำคัญที่สุดในกระบวนการอักเสบ จึงสามารถใช้การแสดงออกของเอนไซม์หรือยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์เหล่านี้เป็น biomarker เพื่อติดตามกระบวนการอักเสบในระดับเซลล์ได้ โดยทำการศึกษาการแสดงออกของยีน iNOS ซึ่งควบคุมการสร้างเอนไซม์ iNOS ยีน COX2 ซึ่งควบคุมการสร้างเอนไซม์ COX-2 และยีน IL1B ซึ่งควบคุมการสร้างสาร IL-1β ประกอบการตรวจวัดระดับ NO ที่ถูกผลิตขึ้น พบว่าผลการแสดงออกของยีนทั้ง 3 ตัว มีความสอดคล้องกับผลการศึกษา ระดับ NO โดย LPS มีผลกระตุ้นการแสดงออกของยีน iNOS COX2 และ IL1B อย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมและยา dexamethasone มีผลในการยับยั้งการแสดงออกของยีนทั้ง 3 ตัวได้ ผลของสารสกัดจากใบกัญชง พบว่ามีเพียงสารสกัดหยาบเมทานอล และ cannabinoids fraction ของสารสกัดจากใบกัญชงทั้ง 4 พันธุ์ปลูก เท่านั้น ที่มีผลในการลดการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ โดย cannabinoids fraction มีผลในการลดการแสดงออกของยีนมากกว่าเล็กน้อย และสารสกัดที่ได้จากพันธุ์ปลูก RPF4 มีประสิทธิภาพในการลดการแสดงออกของยีนทั้ง 3 ชนิด มากที่สุด แสดงให้เห็นว่าประสิทธิภาพในการลดการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบภายในเซลล์ Raw 264.7 อาจเป็นผลจากปริมาณและชนิดของสารกลุ่ม cannabinoids ที่เป็นองค์ประกอบอยู่ในสารสกัด

เซลล์ที่ใช้เป็นตัวแทนของเซลล์ผิวหนังในการศึกษาครั้งนี้ คือ เซลล์ Detroit-551 ซึ่งเป็นเซลล์ที่ไม่ได้มีการแสดงออกของยีน iNOS, COX2 และ IL1B ในระดับที่ชัดเจน รวมถึงไม่สามารถผลิต NO ในระดับที่สูงเมื่อถูกกระตุ้นให้เกิดการอักเสบ จึงเปลี่ยน biomarker เพื่อติดตามกระบวนการอักเสบในระดับเซลล์เป็นการติดตามยีน MMP3 ซึ่งกำหนดการสร้างเอนไซม์ matrix metalloproteinase-3 (MMP-3) ที่สลาย matrix ภายในเซลล์ผิวหนังเมื่อเกิดกระบวนการ

อักเสบและยีน *COL2A1* ที่ควบคุมการสร้าง collagen ชนิด 2A1 ซึ่งเป็นคอลลาเจนชนิดที่เซลล์สร้างขึ้นเมื่อเริ่มเกิดการอักเสบ โดยผลการทดสอบกระบวนการอักเสบในระดับเซลล์ เมื่อกระตุ้นด้วย LPS และให้ dexamethasone เพื่อลดการอักเสบ พบว่าไม่แตกต่างจากการศึกษาในเซลล์ Raw 264.7 โดยยีน *MMP3* และ *COL2A1* มีการแสดงออกที่สูงขึ้น เมื่อถูกกระตุ้นให้เกิดการอักเสบด้วย LPS และ dexamethasone มีความสามารถในการลดการแสดงออกของยีนทั้ง 2 ตัวอย่างมีนัยสำคัญ ประสิทธิภาพในการลดการอักเสบของสารสกัดจากใบกัญชง พบว่ามีเพียงสารสกัดหยาบเมทานอล และ cannabinoid fraction ของสารสกัดจากใบกัญชงทั้ง 4 พันธุ์ปลูกเท่านั้น ที่สามารถลดการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบทั้ง 2 ชนิด ได้อย่างมีนัยสำคัญ โดย cannabinoid fraction มีความสามารถในการลดการแสดงออกของยีนได้มากกว่าเล็กน้อยและสารสกัดที่ได้จากพันธุ์ปลูก RPF4 สามารถลดการแสดงออกของยีน *MMP3* และ *COL2A1* ได้ชัดเจนกว่าพันธุ์ปลูกอื่น ๆ และผลการศึกษาี้สอดคล้องกับผลการศึกษาใน Raw 264.7 สรุปได้ว่าความสามารถในการลดการอักเสบในระดับเซลล์ของสารสกัดจากใบกัญชงอาจมาจากสารกลุ่ม cannabinoids ที่เป็นองค์ประกอบของสารสกัด⁽⁴³⁾ เมื่อพิจารณาองค์ประกอบของสารกลุ่ม cannabinoids ได้สารที่พบเฉพาะในสารสกัดจากพันธุ์ปลูก RPF4 ซึ่งอาจมีผลทำให้มีประสิทธิภาพเหนือกว่าพันธุ์ปลูกอื่น ๆ ที่ใช้ในการศึกษา คือ THCV ซึ่งจากการศึกษาพบว่ามีเพียง RPF4 เท่านั้น ที่ตรวจพบ THCV อยู่ภายในองค์ประกอบ และจากการศึกษาก่อนหน้า พบว่าสาร THCV มีผลช่วยลดอาการอักเสบในหนูทดลอง⁽⁴⁴⁾ และมีประสิทธิภาพในการลดการสร้าง NO จากเซลล์ macrophage จากหนูเมื่อถูกกระตุ้นให้เกิดการอักเสบในระดับหลอดทดลอง⁽⁴⁵⁾ จึงเป็นที่น่าสนใจว่า THCV อาจมีส่วนสำคัญในการลดการอักเสบในเซลล์ผิวหนัง ซึ่งจำเป็นต้องมีการศึกษายืนยันต่อไปในอนาคต

สรุป

การศึกษาสารสกัดหยาบเมทานอลและสารสกัดแยกส่วนจากใบกัญชงไทยที่เป็นส่วนเหลือทิ้งของกัญชงที่ขึ้นทะเบียนพันธุ์ เพื่อใช้ประโยชน์จากเส้นใย ได้แก่ พันธุ์ปลูก RPF1, RPF2, RPF3 และ RPF4 พบว่า cannabinoids fraction ของ RPF4 มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา ได้แก่ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย และฤทธิ์ต้านอักเสบ โดยสามารถลดการอักเสบในระดับเซลล์รวมถึงเซลล์ผิวหนังได้ดีที่สุด เพื่อเป็นการเพิ่มมูลค่าเพิ่มของส่วนเหลือทิ้งของกัญชง และเพื่อประหยัดต้นทุนของสารสกัดจึงสนใจฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาเฉพาะในสารสกัดหยาบ จากผลการศึกษาสารสกัดหยาบเมทานอลของ RPF3 ซึ่งเป็นพันธุ์ปลูกที่เกษตรกรปลูกมากที่สุด มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียค่อนข้างดีต่อ *C. sporogenes*, *S. aureus* และ *S. epidermidis* และมีฤทธิ์ต้านอักเสบ โดยสามารถลดการสร้าง nitric oxide (NO) จากเซลล์ที่ถูกกระตุ้นให้เกิดการอักเสบ สามารถยับยั้งการเพิ่มขึ้นของยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบ ได้แก่ *iNOS*, *COX2* และ *IL1B* นอกจากนี้สามารถลดการแสดงออกของยีน *MMP3* และ *COL2A1* เมื่อเกิดการอักเสบในระดับเซลล์ของเซลล์ผิวหนังได้ ซึ่งข้อมูลการศึกษาในครั้งนี้มีประโยชน์ต่อการศึกษาเพิ่มเติมด้านการทดสอบความเป็นพิษและประสิทธิผลของฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาข้างต้นในสัตว์ทดลอง เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์สมุนไพร เช่น ผลิตภัณฑ์สมุนไพรที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ต้านจุลินทรีย์และต้านอักเสบ เพื่อเพิ่มมูลค่าของใบกัญชงที่เหลือจากการนำไปใช้ประโยชน์ทางเศรษฐกิจอื่น ๆ ได้หลากหลายมากยิ่งขึ้น

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ สำหรับการสนับสนุนงบประมาณการวิจัย ขอขอบคุณคณะแพทยศาสตร์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ สำหรับการสนับสนุนครุภัณฑ์ในการวิจัย ขอขอบคุณสถาบันวิจัยและพัฒนา

พื้นที่สูง (องค์การมหาชน) สำหรับการสนับสนุนตัวอย่าง ใบกัญชง และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่กลุ่มงานยา ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 1 เชียงใหม่ ทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือในการทำงานวิจัยเป็นอย่างดี

เอกสารอ้างอิง

- Johnson R. Defining hemp: a fact sheet. Congressional Research Service. [online]. 2019; [cited 2022 Oct 23]; [12 screens]. Available from: URL: <https://crsreports.congress.gov/product/pdf/R/R44742>.
- Clarke RC, Watson DP. Cannabis and natural Cannabis medicine. In: ElSohly MA, editor. Marijuana and the Cannabinoids. New Jersey: Humana Press; 2007. p. 1-16.
- Brenneisen R. Chemistry and analysis of phytocannabinoids and other Cannabis constituents. In: ElSohly MA, editor. Marijuana and the Cannabinoids. New Jersey: Humana Press; 2007. p. 17-49.
- Department of Justice Parliamentary Counsel's Office. Industrial Hemp Amendment Act 2018 No.15 of 2018. [online]. 2018; [cited 2022 Oct 23]; [8 screens]. Available from: URL: https://www.legislation.wa.gov.au/legislation/statutes.nsf/RedirectURL?OpenAgent&query=mrdoc_41245.pdf.
- ประกาศคณะกรรมการควบคุมยาเสพติดให้โทษ เรื่อง กำหนดลักษณะกัญชง (Hemp) พ.ศ. 2562. ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 136 ตอนพิเศษ 264 ง (วันที่ 24 ตุลาคม 2562). หน้า 7.
- Dabrowska A, Green VR, Johnson R, Sacco LN. FDA regulation of cannabidiol (CBD) consumer products: overview and considerations for Congress. Congressional Research Service. [online]. 2020; [cited 2022 Oct 23]; [33 screens]. Available from: URL: <https://crsreports.congress.gov/product/pdf/R/R46189>.
- Stott CG, Guy GW. Cannabinoids for the pharmaceutical industry. Euphytica 2004; 140: 83-93.
- Pertwee RG. Cannabinoids and multiple sclerosis. Pharmacol Ther 2002; 95: 165-74.
- Baker D, Pryce G, Giovannoni G, Thompson AJ. The therapeutic potential of cannabis. Lancet Neurol 2003; 2: 291-8.
- Russo E, Guy GW. A tale of two cannabinoids: the therapeutic rationale for combining tetrahydrocannabinol and cannabidiol. Med Hypotheses 2006; 66: 234-46.
- Borgelt LM, Franson KL, Nussbaum AM, Wang GS. The pharmacologic and clinical effects of medical cannabis. Pharmacotherapy 2013; 33(2): 195-209.
- Svíženská I, Dubový P, Sulcová A. Cannabinoid receptors 1 and 2 (CB1 and CB2), their distribution, ligands and functional involvement in nervous system structures--a short review. Pharmacol Biochem Behav 2008; 90: 501-11.
- Fukuda S, Kohsaka H, Takayasu A, Yokoyama W, Miyabe C, Miyabe Y, et al. Cannabinoid receptor 2 as a potential therapeutic target in rheumatoid arthritis. BMC Musculoskelet Disord 2014; 15: 275. (10 pages).
- Wilkinson JD, Williamson EM. Cannabinoids inhibit human keratinocyte proliferation through a non-CB1/CB2 mechanism and have a potential therapeutic value in the treatment of psoriasis. J Dermatol Sci 2007; 45: 87-92.
- Zheng D, Bode AM, Zhao Q, Cho YY, Zhu F, Ma WY, et al. The cannabinoid receptors are required for ultraviolet-induced inflammation and skin cancer development. Cancer Res 2008; 68(10): 3992-8.
- Lastres-Becker I, Molina-Holgado F, Ramos JA, Mechoulam R, Fernández-Ruiz J. Cannabinoids provide neuroprotection against 6-hy-

- droxydopamine toxicity *in vivo* and *in vitro*: relevance to Parkinson's disease. *Neurobiol Dis* 2005; 19: 96-107.
17. Mechoulam R, Sumariwalla PF, Feldmann M, Gallily R. Cannabinoids in models of chronic inflammatory conditions. *Phytochem Rev* 2005; 4: 11-8.
 18. Gaffal E, Cron M, Glodde N, Bald T, Kuner R, Zimmer A, et al. Cannabinoid 1 receptors in keratinocytes modulate proinflammatory chemokine secretion and attenuate contact allergic inflammation. *J Immunol* 2013; 190(10): 4929-36.
 19. Albanesi C. Keratinocytes in allergic skin diseases. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2010; 10: 452-6.
 20. Nissen L, Zatta A, Stefanini I, Grandi S, Sgorbati B, Biavati B, et al. Characterization and antimicrobial activity of essential oils of industrial hemp varieties (*Cannabis sativa* L.). *Fitoterapia* 2010; 81(5): 413-9.
 21. Martinenghi LD, Jonsson R, Lund T, Jenssen H. Isolation, purification, and antimicrobial characterization of cannabidiolic acid and cannabidiol from *Cannabis sativa* L. *Biomolecules* 2020; 10: 900. (16 pages).
 22. Duangnin N, Klangjorhor J, Tipparat P, Pinmanee S, Phitak T, Pothacharoen P, et al. Anti-inflammatory effect of methanol extracts of hemp leaf in IL-1 β -induced synovitis. *Trop J Pharm Res* 2017; 16(7): 1553-63.
 23. Meyer M, Müller AK, Yang J, Sulcova J, Werner S. The role of chronic inflammation in cutaneous fibrosis: fibroblast growth factor receptor deficiency in keratinocytes as an example. *J Invest Dermatol Symp Proc* 2011; 15: 48-52.
 24. Tipparat P. Factors affecting cannabinoid contents for classification of hemp (*Cannabis sativa* L.) in Northern Thailand [dissertation]. Chiang Mai: Graduate school, Chiang Mai University; 2014.
 25. Fishedick JT, Hazekamp A, Erkelens T, Choi YH, Verpoorte R. Metabolic fingerprinting of *Cannabis sativa* L., cannabinoids and terpenoids for chemotaxonomic and drug standardization purposes. *Phytochemistry* 2010; 71: 2058-73.
 26. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorisation assay. *Free Radical Biol Med* 1999; 26: 1231-7.
 27. Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm Wiss u Technol* 1995; 28: 25-30.
 28. Benzei IFF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the Frap assay. *Anal Biochem* 1996; 239: 70-6.
 29. Hudzicki J. Kirby-Bauer disk diffusion susceptibility test protocol. American Society for Microbiology [online]. 2009; [cited 2022 Feb 1]; [23 screens]. Available from: URL: <https://asm.org/getattachment/2594ce26-bd44-47f6-8287-0657aa9185ad/Kirby-Bauer-Disk-Diffusion-Susceptibility-Test-Protocol-pdf>.
 30. Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol* 1966; 45: 493-6.
 31. M07-A9: Method for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard. 9th ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2012.



32. Murakami A, Miyamoto M, Ohigashi H. Zerumbone, an anti-inflammatory phytochemical, induces expression of proinflammatory cytokine genes in human colon adenocarcinoma cell lines. *Biofactors* 2004; 21(1-4): 95-101.
33. Yoon WJ, Ham YM, Kim SS, Yoo BS, Moon JY, Baik JS, et.al. Suppression of pro-inflammatory cytokines, *iNOS* and *COX-2* expression by brown algae *Sargassum micracanthum* in RAW 264.7 macrophages. *EurAsia J BioSci* 2009; 3: 130-43.
34. Phitak T, Pothacharoen P, Settakorn J, Poompomol W, Caterson B, Kongtawelert P. Chondroprotective and anti-inflammatory effects of sesamin. *Phytochemistry* 2012; 80: 77-88.
35. สิริดา ปันมณี. ขึ้นทะเบียนพันธุ์กัญชง (Hemp) สำคัญอย่างไร?. [ออนไลน์]. 2564; [สืบค้น 14 พ.ค. 2566]; [5 หน้า]. เข้าถึงได้ที่: URL: <https://www.hrdi.or.th/Articles/Detail/1482>.
36. Hillig KW. A chemotaxonomic analysis of terpenoid variation in *Cannabis*. *Biochem Systemat Ecol* 2004; 32: 875-91.
37. Tipparat P, Kunkaew W, Julsrigival S, Pinmanee S, Natakankitkul S. Classification of cannabis plants grown in Northern Thailand using physico-chemical properties. *J Nat Sci Res* 2014; 4(4): 46-54.
38. Cásedas G, Moliner C, Maggi F, Mazzara E, López V. Evolution of two different *Cannabis sativa* L. extracts as antioxidant and neuroprotective agents. *Front Pharmacol*. [online]. 2022; [cited 2022 Nov 8]; [11 screens]. Available from: URL: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphar.2022.1009868/pdf>.
39. Cantele C, Bertolino M, Bakro F, Giordano M, Jedryczka M, Cardenia V. Antioxidant effects of hemp (*Cannabis sativa* L.) inflorescence extract in stripped linseed oil. Antioxidants. [online]. 2020; [cited 2022 Nov 8]; [18 screens]. Available from: URL: <https://www.mdpi.com/2076-3921/9/11/1131/pdf?version=1605515769>.
40. Appendino G, Gibbons S, Giana A, Pagani A, Grassi G, Stavri M, et.al. Antibacterial cannabinoids from *Cannabis sativa*: a structure-activity study. *J Nat Prod* 2008; 71: 1427-30.
41. Kaur S, Sharma C, Chaudhry S, Aman R. Antimicrobial potential of three common weeds of kurukshetra: an *in vitro* study. *Res J Microbiol* 2015; 10(6): 280-7.
42. Ríos JL, Recio MC. Medicinal plants and antimicrobial activity. *J Ethnopharmacol* 2005; 100: 80-4.
43. Anil SM, Peeri H, Kolti H. Medical cannabis activity against inflammation: active compounds and modes of action. *Front Pharmacol*. [online]. 2022; [cited 2022 Nov 8]; [9 screens]. Available from: URL: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphar.2022.908198/pdf>.
44. Bolognini D, Costa B, Maione S, Comelli F, Marini P, Di Marzo V, et al. The plant cannabinoid Δ^9 -tetrahydrocannabivarin can decrease signs of inflammation and inflammatory pain in mice. *Br J Pharmacol*. [online]. 2010; [cited 2022 Nov 8]; [11 screens]. Available from: URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2931567/pdf/bph0160-0677.pdf>.
45. Romano B, Pagano E, Orlando P, Capasso R, Cassio MG, Pertwee R, et al. Pure Δ^9 -tetrahydrocannabivarin and a *Cannabis sativa* extract with high content in Δ^9 -tetrahydrocannabivarin inhibit nitrite production in murine peritoneal macrophages. *Pharmacol Res* 2016; 113: 199-208.

Anti-inflammatory Activity on Skin Cells, Antibacterial and Antifungal Activities of Methanolic Thai Hemp Leaves Extracts

Prapatsorn Tipparat¹, Prachya Kongtawelert², Natthachai Duangnil¹, Sarinya Julsrigivan¹, Patcharin Juntranimit¹, and Sarita Pinmanee³

¹Regional Medical Sciences Center 1 Chiang Mai, Department of Medical Sciences, Chiang Mai, 50180

²Faculty of Medicine, Chiang Mai University, Chiang Mai, 50200

³Highland Research and Development Institute (Public Organization), Chiang Mai, 50200

ABSTRACT Since The Thai government has a policy for promoting hemp (*Cannabis sativa* L. subsp. *sativa*) as an economic crop for fiber. Therefore, the utilizing feasibility of hemp leaves, a by-product of post-harvest hemp fiber production, would be considered in order to create added value to the business. The purpose of this research was to investigate the pharmacological effects of leaves extracts of four cultivars of Thai hemp, RPF1–4, including antioxidant, antibacterial, antifungal, and anti-inflammatory activities. The results revealed that the cannabinoid fraction of RPF4 possessed the highest antioxidant activities presenting as Trolox equivalent antioxidant capacity in the range of 88.02–180.84 mg/g. The extracts from RPF3 and RPF4 cultivars had antimicrobial activities against gram-positive bacteria and fungi (*Candida albicans*), but had no inhibitory effect on gram-negative bacteria. The methanolic crude extracts of RPF3 and RPF4 cultivars had the highest activities against *Clostridium sporogenes* with the minimal inhibitory concentration (MIC) of 976.5 ng/mL. Concerning the anti-inflammatory activity of hemp leaves extracts, it was found that methanolic crude extracts and cannabinoid fraction of all cultivars could suppress nitric oxide (NO) production in the inflammatory process, significantly reduce the pro-inflammatory genes, including iNOS, COX2, and IL-1B, and lower MMP3 and COL2A1 gene expression. Of those, the RPF4 extract had cannabinoids in a rather high amount and tetrahydrocannabinol (THCV) that exerted the highest anti-inflammatory activity comparable to dexamethasone. The study results are beneficial for using hemp leaves from post-harvest fiber production as herbal products. However, in vivo studies of toxicity and efficacy of those pharmacological activities should be further performed.

Keywords: Anti-inflammatory, Antibacterial, Antifungal, Antioxidant, Thai hemp leaves extracts