

การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณฟริเดลินในรากกัญชาด้วยวิธี เดนซิโตเมทรีโครมาโทกราฟีผิวบาง

ธนวัฒน์ ทองจีน*, พีรธรรม เทียมเทียบรัตน์, สายัณห์ เรืองเขตร, อัครชัย ช่วยพรหม

สถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ ตำบลตลาดขวัญ อำเภอเมือง นนทบุรี 11000

*ผู้รับผิดชอบบทความ: thanawat.thongchin898@gmail.com

บทคัดย่อ

บทนำและวัตถุประสงค์: ฟริเดลิน (friedelin) เป็นสารออกฤทธิ์ชนิดหนึ่งที่พบในรากกัญชา (*Cannabis sativa* L. roots) มีฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น ด้านออกซิเดชัน ด้านอักเสบ และบรรเทาอาการปวด สมุนไพรที่มีการใช้ประโยชน์ทั้งทางยาและผลิตภัณฑ์สุขภาพ แต่ยังไม่มีการควบคุมคุณภาพสมุนไพรชนิดนี้ การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณฟริเดลินในรากกัญชาด้วยวิธีเดนซิโตเมทรีโครมาโทกราฟีผิวบาง (thin layer chromatography densitometry, TLC densitometry)

วิธีการศึกษา: สรุปวิธีวิเคราะห์ได้ดังนี้ คือ นำสารละลายตัวอย่างรากกัญชาวิเคราะห์ด้วยเครื่องเดนซิโตเมทรีโครมาโทกราฟีผิวบาง (TLC densitometer) โดยใช้น้ำยาแยกที่ผสมด้วยโทลูอีนและคลอโรฟอร์มในอัตราส่วน 9:1 ตรวจสอบภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่น 366 นาโนเมตร หลังพ่นด้วยสารละลายวานิลลินในกรดซัลฟูริก

ผลการศึกษา: ผลการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ดังกล่าว พบว่ากราฟมาตรฐานของฟริเดลินมีลักษณะเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 25.99-831.60 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เท่ากับ 0.9990 ร้อยละของการคืนกลับของสารฟริเดลินอยู่ในช่วงร้อยละ 100.57-102.45 มีขีดจำกัดของการตรวจพบและขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ เท่ากับร้อยละ 0.006 และ 0.021 โดยน้ำหนักแห้งของรากกัญชา (ไมโครกรัม/ไมโครกรัม) ตามลำดับ ปริมาณฟริเดลินในรากกัญชามีค่าเฉลี่ยร้อยละ 0.025 โดยน้ำหนักแห้งของรากกัญชา (ไมโครกรัม/ไมโครกรัม)

อภิปรายผล: ในการสกัดรากกัญชานั้นจะเลือกใช้เฮกเซนเป็นตัวทำละลายเพราะเฮกเซนมีคุณสมบัติไม่มีขั้วสูงสามารถละลายสารฟริเดลินซึ่งเป็นสารที่มีคุณสมบัติไม่มีขั้วสูงเช่นกันออกมาจากรากกัญชาได้มากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับ การสกัดด้วยเอทานอล วิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นมาใหม่ ประหยัดวัสดุภาคเคลื่อนที่ และวัสดุภาคที่อยู่กับที่ที่ใช้คือแผ่น HPTLC ซึ่งมีราคาถูกกว่าเมื่อเทียบกับคอลัมน์ของวิธี GC-MS/FID ดังนั้นจึงเลือกใช้เครื่องเดนซิโตเมทรีโครมาโทกราฟีผิวบางในการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณฟริเดลินในรากกัญชา

ข้อสรุป: วิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นนี้มีความเหมาะสม สามารถนำไปใช้เป็นวิธีตรวจวิเคราะห์ปริมาณฟริเดลินในรากกัญชาและสามารถนำไปสู่การกำหนดเกณฑ์ปริมาณสารสำคัญในรากกัญชาต่อไป

คำสำคัญ: รากกัญชา, ฟริเดลิน, เดนซิโตเมทรีโครมาโทกราฟีผิวบาง

Development and Method Validation of Friedelin Contents in *Cannabis sativa* L. Roots Using Thin Layer Chromatography Densitometry

Thanawat Thongchin^{*}, Peradhama Thiemthieprat, Sayan Ruengkhet, Aussavashai Shuayprom

Medicinal Plant Research Institute, Department of Medical Sciences, Tiwanon Road, Talat Khwan, Mueang, Nonthaburi 11000, Thailand

^{*}Corresponding author: thanawat.thongchin898@gmail.com

Abstract

Introduction and Objective: Friedelin is an active ingredient present in *Cannabis sativa* L. roots and possesses antioxidant, anti-inflammatory and pain relief properties. Although cannabis is widely used in traditional medicine and as health products, there is no quality control method for it. The objective of this study was to develop an analytical method for determining the friedelin content in *C. sativa* roots using thin layer chromatography (TLC) densitometry.

Methods: A sample solution of *C. sativa* roots was injected into the TLC system. The solvent was a mixture of toluene and chloroform (9:1 ratio). After that, the plate was sprayed with vanillin-H₂SO₄ solution and detected with ultraviolet light (366 nm).

Results: This method was validated by establishing the linearity for friedelin concentrations ranging from 25.99 to 831.60 µg/mL with a determination correlation coefficient (r) of 0.9990. The % recovery was in the range of 100.57–102.45%. The limits of detection and quantitation were equal to 0.006% and 0.021% w/w (dry weight *C. sativa* roots, µg/µg), respectively. The average content of friedelin in *C. sativa* roots was 0.025% w/w (dry weight *C. sativa* roots, µg/µg).

Discussion: In extracting *C. sativa* roots, hexane was chosen as a solvent because it has high nonpolar properties; and it is able to dissolve more friedelin, a substance with nonpolar properties as well, from the *C. sativa* roots, compared to ethanol extraction. In the newly developed analytical method, the stationary cycle used was HPTLC plates, which were cheaper, compared to the columns of the GC-MS/FID method. Thus, a TLC dosimeter was used to develop the method for determining the amount of friedelin in *C. sativa* roots.

Conclusion and Recommendation: This newly developed method is suitable and can be used to analyze the content of friedelin in *C. sativa* roots; and the appropriate specification of friedelin content in *C. sativa* roots can be established.

Key words: *Cannabis sativa* L. roots, friedelin, thin layer chromatography densitometry

บทนำและวัตถุประสงค์

กัญชา มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Cannabis sativa* L. จัดอยู่ในวงศ์ Cannabaceae มีชื่อเรียกอื่น เช่น กัญชาจีน, คุณเข้า, ปาง, ยานอ, Hashish, Hemp, Indian hemp, Marijuana เป็นต้น^[1] รากกัญชาจะประกอบด้วยรากแก้ว และรากฝอยจำนวนมาก มีสี

ขาวอมเหลือง (Figure 1) สารออกฤทธิ์ในรากกัญชา ได้แก่ สารฟริเดลินเป็นสารประกอบที่พบมากในรากกัญชา มีสรรพคุณ แก้ปวด ลดไข้ ต้านอักเสบ มีสูตรโครงสร้าง (Figure 2) นอกจากนี้ยังพบสารกลุ่มเทอร์พีน (terpene) ชื่ออีพิฟริเดลานอล (epifriedelanol) มีสรรพคุณต้านและยับยั้งการโตของเนื้องอก



Figure 1 *Cannabis sativa* L. roots

สารกลุ่มโมโนเทอร์พีน (monoterpene) เช่น คาร์วอน (carvone) และไดไฮโดรคาร์วอน (dihydrocarvone) มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย ต้านเชื้อรา ต้านการอักเสบ ต้านมะเร็ง สารอะโทรปีน (atropine) มีฤทธิ์คลายกล้ามเนื้อตา และขยายหลอดลมในปอด^[2]

จากข้อมูลการศึกษาทางวิทยาศาสตร์ข้างต้น แสดงถึงฤทธิ์ทางชีวภาพของรากกัญชาที่น่าสนใจหลายชนิด มีศักยภาพสามารถนำไปพัฒนาต่อยอดเป็นผลิตภัณฑ์ยารักษาโรคหรือผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางได้ ทำให้ข้อมูลในการควบคุมคุณภาพทางเคมีของรากกัญชาเป็นสิ่งจำเป็น ปัจจุบันการพัฒนารากกัญชาเพื่อประโยชน์ทางการแพทย์ จำเป็นต้องมีการศึกษาการพัฒนาสารสกัด การแยกสารบริสุทธิ์ เพื่อให้เป็นพืชที่สามารถใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ได้อย่างเหมาะสม และในการนำรากกัญชามาเป็นองค์ประกอบในการปรุงตำรับยานั้น จำเป็นต้องมีข้อมูลปริมาณสารสำคัญ แต่ปัจจุบันข้อมูลดังกล่าวยังมีอยู่น้อย ในปีพ.ศ. 2560 มีรายงานการพัฒनावิธีวิเคราะห์ปริมาณฟริเดลินในสารสกัดและตำรับยาสมุนไพรมะค่าไก่ด้วยวิธี high performance thin layer

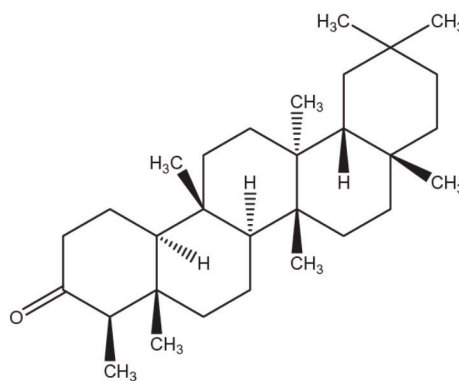


Figure 2 Chemical structure of Friedelin

chromatography (HPTLC)^[3] และในปีพ.ศ. 2564 มีรายงานการวิเคราะห์ฟริเดลินในสารสกัดรากกัญชาด้วยวิธี GC-MS/FID^[4]

การศึกษาค้นคว้านี้มีวัตถุประสงค์ที่จะพัฒनावิธีวิเคราะห์ปริมาณฟริเดลินในรากกัญชาด้วยวิธีเดนซิโตเมตรีโครมาโทกราฟีผิวบาง เพื่อใช้เป็นแนวทางในการประเมินคุณภาพวัตถุดิบของรากกัญชาที่พบในประเทศไทย และใช้ในการวิจัยและพัฒนาตำรับยาและผลิตภัณฑ์จากสมุนไพรที่มีรากกัญชาเป็นส่วนผสม เพื่อเพิ่มมูลค่าของรากกัญชาทางเศรษฐกิจต่อไป

ระเบียบวิธีศึกษา

1. วัสดุ

1.1 ตัวอย่างสมุนไพร

รากกัญชาพันธุ์ตะนาวศรีก้านแดงอาร์ดี1 (RD1) จำนวน 2 ตัวอย่าง (CANR1 และ CANR2) และพันธุ์ตะนาวศรีก้านขาวดับเบิ้ลยูเอ1 (WA1) จำนวน 2 ตัวอย่าง (CANW1 และ CANW2) ถูกรวบรวมจากโครงการศึกษาการปลูกและขยายพันธุ์ต้นกัญชากายใต้สภาพโรงเรือนแบบปิดของสถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ และมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี วิทยาเขตสกลนคร นำตัวอย่างรากกัญชาสดซึ่งมีอายุการปลูก 5 เดือน มาคัดแยกเอาเฉพาะราก นำมาล้างด้วยน้ำให้สะอาด ผึ่งให้แห้งที่อุณหภูมิห้องพอหมาดๆ หั่นให้เป็นชิ้นเล็กๆ และอบให้แห้งด้วยตู้อบร้อนไฟฟ้าที่อุณหภูมิ 45 °ซ นาน 72 ชั่วโมง นำตัวอย่างที่แห้งแล้วไปบดเป็นผงหยาบ ผ่านแร่งที่มีขนาดช่อง 180 ไมโครเมตร แล้วเก็บสมุนไพรในขวดแก้วสีชาที่มีฝาปิดสนิท ปิดฉลากระบุชื่อสมุนไพร ปริมาณ และวันที่เตรียมตัวอย่าง เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง เพื่อนำมาศึกษาปริมาณสารสำคัญในขั้นตอนต่อไป

1.2 สารมาตรฐาน

สารมาตรฐานพริเดลิน ความบริสุทธิ์ $\geq 99\%$ (EXTRASYNTHESSE, Batch: 05, ID: 0602/0)

1.3 สารเคมีและตัวทำละลาย

ethanol AR (RCI Labscan Limited, Thailand), methanol AR (RCI Labscan Limited, Thailand), ethyl acetate AR (Fisher Scientific, UK), hexane AR (RCI Labscan Limited, Thailand), chloroform AR (RCI Labscan Limited,

Thailand), formic acid (Merck, Germany), sulfuric acid (Labscan, Thailand), vanillin (Sigma-Aldrich), absolute ethanol (RCI Labscan Limited, Thailand) และน้ำกลั่น (distilled water)

สารละลายทดสอบวานิลลิน-กรดซัลฟูริก (vanillin-sulfuric acid) เตรียมโดยละลาย สารวานิลลิน จำนวน 3 กรัม ในเอ็บโซลูทเอทานอล (absolute ethanol) 100 มิลลิลิตร เติมกรดซัลฟูริก 0.5 มิลลิลิตร และผสมให้เข้ากัน^[5]

1.4 วัสดุวิทยาศาสตร์และเครื่องแก้ว

HPTLC Silica gel 60F254 Glass plate ขนาด 20 × 10 เซนติเมตร No.1056420001 (Merck, Germany), Nylon filter syringe ขนาด 0.2 ไมโครเมตร, กระดาษกรองเบอร์ 4 (Whatman, UK), เครื่องแก้ว และ micro pipette

1.5 เครื่องมือ

ตู้อบร้อนไฟฟ้ารุ่น UL-50 (memmert), เครื่องบดปั่น รุ่น RT 34 (ChyunTseh Industrial), เครื่องแรง รุ่น AS 200 Basic (Retsch), แร่งที่มีขนาดช่อง 180 ไมโครเมตร (Endocott), เครื่องระเหยสุญญากาศ ประกอบด้วย rotavapor รุ่น N-1000 (Eyela) และอ่างน้ำแบบควบคุมอุณหภูมิรุ่น SB-1000 (Eyela), เครื่องทำสุญญากาศรุ่น A-3S (Eyela) และเครื่องทำน้ำเย็นหมุนเวียน รุ่น CA-101 (Eyela), ชุดเครื่องเดนซิโตมิเตอร์โครมาโทกราฟีผิวบางประกอบด้วยเครื่องพ่นสารตัวอย่าง (Automatic TLC Sampler 4), เครื่องถ่ายภาพโครมาโตกราฟ (TLC Digital camera รุ่น TLC Visualizer 2) และเครื่องตรวจอ่านแผ่น TLC (TLC Scanner 3) ยี่ห้อ CAMAG และเครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง รุ่น XT 220A (Precisa)

2. วิธีการศึกษา

2.1 การศึกษาหาสภาวะของระบบโครมาโทกราฟี

2.1.1 การเตรียมสารมาตรฐาน

เตรียมสารละลายสารมาตรฐานฟริเดลิน ความเข้มข้น 800 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร นำสารละลายสารมาตรฐานที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องเดนซิโตมิเตอร์โครมาโทกราฟีผิวบาง

2.1.2 การศึกษาชนิดของตัวทำละลายในการสกัด

สกัดตัวอย่างรากกัญชา น้ำหนัก 2 กรัม โดยใช้เฮกเซน (hexane) 100 มิลลิลิตร เปรียบเทียบกับเอทานอล (ethanol) 100 มิลลิลิตร ด้วยวิธีรีฟลักซ์ (reflux) เป็นเวลา 60 นาที กรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 4 นำสารสกัดเฮกเซน และสารสกัดเอทานอล ไประเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ จากนั้นละลายและปรับปริมาตรด้วยคลอโรฟอร์ม (chloroform) จนครบ 5 มิลลิลิตร โดยใช้ขวดแก้ววัดปริมาตร (volumetric flask) แล้วนำมาวิเคราะห์ด้วยเครื่องเดนซิโตมิเตอร์โครมาโทกราฟีผิวบาง เพื่อเปรียบเทียบความสามารถในการสกัดสารฟริเดลินจากรากกัญชา โดยใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase) ที่มีสารละลายผสมของโทลูอีน (toluene) และคลอโรฟอร์ม ในอัตราส่วน 9:1 ตรวจสอบภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่น 366 นาโนเมตร หลังจากพ่นด้วยสารละลายทดสอบวานิลลิน-กรดซัลฟูริกและให้ความร้อน 110 °ซ นาน 5 นาที

2.1.3 การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการสกัด

สกัดตัวอย่างรากกัญชา น้ำหนัก 2 กรัม ด้วยเฮกเซน 100 มิลลิลิตร โดยวิธีรีฟลักซ์ เป็นเวลา 30, 60 และ 90 นาที กรองผ่านกระดาษกรองเบอร์

4 นำสารละลายที่ได้ไประเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ จากนั้นละลายและปรับปริมาตรด้วยคลอโรฟอร์ม จนครบ 5 มิลลิลิตร โดยใช้ขวดแก้ววัดปริมาตร นำสารละลายตัวอย่างที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องเดนซิโตมิเตอร์โครมาโทกราฟีผิวบาง เพื่อเปรียบเทียบผลของเวลาที่ใช้ในการสกัดสารฟริเดลิน โดยที่วัฏภาคเคลื่อนที่ และการตรวจหา (detection) เหมือนกับ ข้อ 2.1.2

2.1.4 การศึกษาชนิดและสัดส่วนของวัฏภาคเคลื่อนที่

การศึกษานิดและสัดส่วนของวัฏภาคเคลื่อนที่ โดยพิจารณาจากความสามารถในการแยกองค์ประกอบทางเคมีของสารในสารละลายตัวอย่างรากกัญชา และค่า R_F ที่เหมาะสมของฟริเดลิน ในสารละลายตัวอย่างรากกัญชา

เตรียมวัฏภาคเคลื่อนที่ โดยผสมโทลูอีนและคลอโรฟอร์ม ในอัตราส่วน 7:3, 9:1 และสารละลายผสมของคลอโรฟอร์มและเมทานอล ในอัตราส่วน 7:3 นำมาใส่ในแทงค์ (tank) ที่ว่างอย่างน้อย 1-2 ชั่วโมง เพื่อให้บรรยากาศในแทงค์อิ่มตัว

2.1.5 การตรวจหา

นำแผ่นเคลือบซิลิกาเจลไปพ่นด้วยสารละลายทดสอบวานิลลิน-กรดซัลฟูริก ให้ความร้อน 110 °ซ นาน 5 นาที แล้วตรวจสอบภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่น 366 นาโนเมตร

2.2 การทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์

ทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ปริมาณฟริเดลินในรากกัญชาที่พัฒนาขึ้นตามแนวปฏิบัติการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ทางเคมีโดยห้องปฏิบัติการเดียว กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข^[6]

2.2.1 การทดสอบความเป็นเส้นตรง (lin-

earity) และช่วงการวิเคราะห์ (range)

ซึ่งสารมาตรฐานพริเดลิน น้ำหนัก 10 มิลลิกรัม ละลายและปรับปริมาตรด้วยคลอโรฟอร์ม จนครบ 10 มิลลิลิตร ด้วยขวดแก้ววัดปริมาตร จะได้ stock solution ของสารละลายสารมาตรฐานพริเดลิน เข้มข้น 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร จากนั้นเจือจางให้ได้ 6 ระดับความเข้มข้น ตามลำดับ ใส่ลงในขวดแก้ววัดปริมาตร ขนาด 5 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยคลอโรฟอร์ม จะได้ 6 ระดับความเข้มข้น คือ 25.99, 51.98, 103.95, 207.90, 415.80 และ 831.60 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

นำสารละลายตัวอย่างสารสกัดและสารละลายสารมาตรฐานพริเดลิน มาหยดบนแผ่นเคลือบซิลิกาเจลในแนวระดับเดียวกัน ให้เป็นแถบ (band) ขนาด 6×0.45 มิลลิเมตร ด้วยเครื่องหยดสารตัวอย่าง โดยหยดสารละลายตัวอย่างสารสกัดจำนวน 1 แถบ ปริมาตร 15 ไมโครลิตร (วิเคราะห์ 3 ซ้ำ) และสารละลายสารมาตรฐาน 6 ระดับความเข้มข้น ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ตามลำดับ (ทุกระดับความเข้มข้นวิเคราะห์ 3 ซ้ำ) โดยให้ห่างจากขอบล่างประมาณ 1.5 เซนติเมตร และให้มีระยะห่างระหว่างสารละลายแต่ละชนิดไม่น้อยกว่า 0.5 เซนติเมตร จากนั้นนำแผ่นโครมาโทกราฟีผิวบางดังกล่าวมาจุ่มลงในแทงค์ ซึ่งอิมมัตด้วยวัฏภาคเคลื่อนที่ ซึ่งเป็นสารละลายผสมของโทลูอีนและคลอโรฟอร์มในอัตราส่วน 9:1 นำมาใส่ในแทงค์ ทิ้งไว้อย่างน้อย 1-2 ชั่วโมง ก่อนใช้ เพื่อให้บรรยากาศในแทงค์อิมมัต รอจนวัฏภาคเคลื่อนที่เป็นระยะทาง 8 เซนติเมตร จึงนำแผ่นโครมาโทกราฟีผิวบางออก ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องให้แห้ง แล้วจึงนำแผ่นเคลือบซิลิกาเจลไปพ่นด้วยสารละลายทดสอบวานิลลิน-กรดซัลฟูริก ให้ความร้อน 110°C นาน 5 นาที แล้วตรวจสอบภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตที่

ความยาวคลื่น 366 นาโนเมตร และนำมาอ่านแผ่นด้วยเครื่องตรวจอ่านแผ่นโครมาโทกราฟีผิวบาง นำค่าพื้นที่ใต้พีค (area under curve, AUC) ที่ได้มาสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ใต้พีคกับความเข้มข้นของสารละลายสารมาตรฐาน จะได้กราฟมาตรฐาน (standard curve) และค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient, r) จากนั้นทำการวิเคราะห์ปริมาณพริเดลิน ในสารละลายตัวอย่างสารสกัดรากกัญชาโดยนำค่าพื้นที่ใต้พีคที่ได้เทียบกับกราฟมาตรฐาน

2.2.2 การทดสอบหาค่าร้อยละของการคืนกลับ (% recovery) และความเที่ยง (precision)

เตรียม sample blank (sample blank คือ ตัวอย่างรากกัญชาที่นำมาสกัดและตรวจวิเคราะห์หาปริมาณพริเดลิน แล้วมีปริมาณสารพริเดลินในปริมาณต่ำ ๆ โดย ซึ่งตัวอย่างรากกัญชา 2 กรัม สกัดด้วยเฮกเซน โดยวิธีรีฟลักซ์ เป็นเวลา 60 นาที กรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 4 นำสารละลายที่ได้ไประเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ จากนั้นละลายและปรับปริมาตรด้วยคลอโรฟอร์ม จนครบ 5 มิลลิลิตร โดยใช้ขวดแก้ววัดปริมาตร นำสารละลายตัวอย่างที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องเดนซิโตมิเตอร์โครมาโทกราฟีผิวบาง จำนวน 6 ซ้ำ แล้วนำมาหาค่าเฉลี่ย (mean)

การเตรียม spiked sample ลงใน sample blank โดยเติมสารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้น 3 ระดับ ๆ ละ 3 ซ้ำ นิดซ้ำละ 2 ครั้ง โดยเตรียม spiked sample ให้มีความเข้มข้น 50, 100, 150%

เติมสารละลายสารมาตรฐานที่ความเข้มข้น 3 ระดับ ลงใน sample blank แล้ววิเคราะห์ sample blank (unspiked) จำนวน 6 ซ้ำ และวิเคราะห์ spiked sample ระดับละ 3 ซ้ำ จากนั้นคำนวณค่าร้อยละของการคืนกลับ

$$\% \text{recovery} = \frac{(C1 - C2) \times 100}{C3}$$

เมื่อ C1 คือ ความเข้มข้นของสารใน spiked sample

C2 คือ ความเข้มข้นของสารใน sample blank

C3 คือ ความเข้มข้นของสารที่เติม

การทดสอบความเที่ยง

repeatability วิเคราะห์ปริมาณสารฟิเดลิน ใน

ตัวอย่างรากกัญชา ซ้ำ 10 ครั้ง ในวันเดียวกัน คำนวณ ค่าร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD)

intermediate precision วิเคราะห์ปริมาณสาร ฟิเดลิน ในตัวอย่างรากกัญชา เป็นเวลา 3 วัน ๆ ละ 10 ซ้ำ คำนวณค่าร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์

2.2.3 การทดสอบขีดจำกัดของการตรวจ

พบ (Limit of Detection, LOD)

คำนวณค่าประมาณ (estimated) ของ

LOD จาก calibration curve

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

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

เตรียมสารละลายตัวอย่างรากกัญชา โดยซัง ตัวอย่างรากกัญชา 2 กรัม สกัดด้วยเฮกเซน โดย วิธีรีฟลักซ์ เป็นเวลา 60 นาที กรองผ่านกระดาษกรอง เบอร์ 4 นำสารละลายที่ได้ไประเหยแห้งด้วยเครื่อง ระเหยสุญญากาศ จากนั้นละลายและปรับปริมาตร ด้วยคลอโรฟอร์มจนครบ 5 มิลลิลิตร โดยใช้ขวด แก้ววัดปริมาตร

เตรียมสารละลาย spiked sample ให้มีความ เข้มข้นใกล้เคียงกับค่าประมาณของ LOD แล้วตรวจ วิเคราะห์ปริมาณฟิเดลินใน spiked sample 6 ซ้ำ

2.2.4 การทดสอบขีดจำกัดของการวัดเชิง

ปริมาณ (Limit of Quantitation, LOQ)

คำนวณค่าประมาณของ LOQ จาก cali- bration curve ดังนี้

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

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

เตรียมสารละลาย spiked sample ให้มี ความเข้มข้นใกล้เคียงกับค่าประมาณของ LOQ แล้ว ตรวจวิเคราะห์ปริมาณฟิเดลินใน spiked sample 6 ซ้ำ คำนวณค่าร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ และร้อยละของการคืนกลับ

2.2.5 การทดสอบความจำเพาะ (specificity)

หยดสารละลาย standard solution ความ เข้มข้น 831.60 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และสารละลาย

ตัวอย่างเพื่อตรวจสอบการแยกองค์ประกอบทางเคมี ของสารในสารละลายตัวอย่างรากกัญชา และค่า hRf ที่เหมาะสมของฟิเดลินในสารละลายตัวอย่างราก กัญชา

2.3 การวิเคราะห์ปริมาณฟิเดลินในราก

กัญชา

2.3.1 การเตรียมสารละลายตัวอย่างราก

กัญชา

สกัดตัวอย่างรากกัญชา (รากกัญชาของกัญชาพันธุ์
ตะนาวศรีก้านแดง ตัวอย่างที่ 1 และตัวอย่างที่ 2,
CANR1 และ CANR2, รากกัญชาพันธุ์ตะนาวศรี
ก้านขาว ตัวอย่างที่ 1 และตัวอย่างที่ 2, CANW1
และ CANW2) น้ำหนัก 2 กรัม ด้วยเฮกเซน ปริมาตร
100 มิลลิลิตร โดยวิธีฟลักซ์ เป็นเวลา 60 นาที กรอง
และนำสารสกัดที่ได้มาระเหยแห้ง ละลายและปรับ
ปริมาตรด้วยคลอโรฟอร์มจนครบ 5 มิลลิลิตร โดย
ใช้ขวดแก้ววัดปริมาตร นำสารละลายตัวอย่างที่ได้

ไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องเดนซิโตมิเตอร์โครมาโทกราฟี
ผิวบาง

วิเคราะห์ปริมาณฟริเดลินในตัวอย่างวัตถุดิบ
รากกัญชา จำนวน 4 ตัวอย่าง ด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้น
โดยที่แต่ละตัวอย่างให้วิเคราะห์ 3 ซ้ำ แล้วนำมาหาค่า
เฉลี่ย (mean)

การคำนวณความเข้มข้นของสารที่วิเคราะห์ใน
ตัวอย่างรากกัญชา (ร้อยละโดยน้ำหนักแห้งของราก
กัญชา, % w/w)

$$CS (\% \text{ w/w}) = \frac{C_0 (\mu\text{g/ml}) \times \text{ปริมาตรที่เตรียม (ml)} \times \text{ระดับเจือจาง} \times 100}{1,000,000 \times \text{น้ำหนักตัวอย่าง (g)}}$$

เมื่อ C_0 คือ ความเข้มข้นของสารที่วิเคราะห์ที่คำนวณได้จากกราฟมาตรฐาน

CS คือ ความเข้มข้นของสารที่วิเคราะห์เพื่อแปลงเป็นร้อยละโดยน้ำหนัก

ผลการศึกษา

1. การศึกษาหาสภาวะของระบบโครมาโทกราฟี

1.1 การศึกษาหาสภาวะของระบบโครมาโทกราฟี

การศึกษาหาสภาวะของระบบโครมาโทกราฟี

หลังจากนำสารละลายมาตรฐานของฟริเดลินและ
สารละลายตัวอย่างรากกัญชาไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง
เดนซิโตมิเตอร์โครมาโทกราฟีผิวบาง พบว่าอัตราส่วน
ส่วนผสมของตัวทำละลายที่ทำให้เกิดการแยกสารได้ดี
และเหมาะสมในการแยกสารฟริเดลิน คือ โทลูอีนและ
คลอโรฟอร์ม ในอัตราส่วน 9:1 (Figure 3)

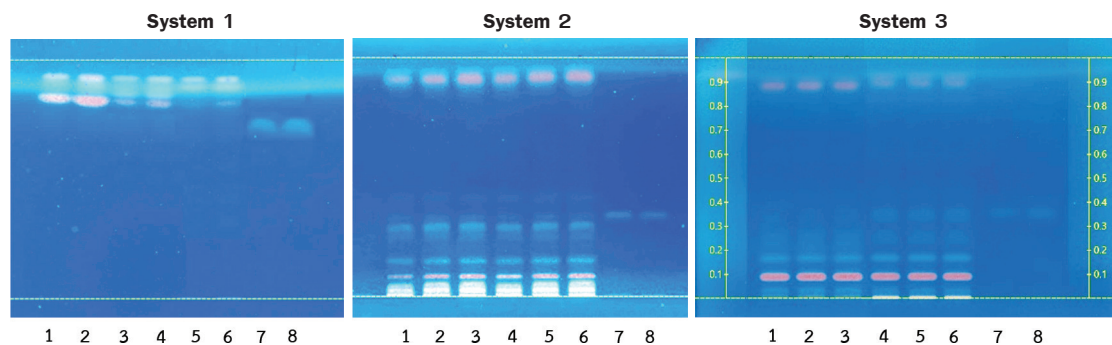


Figure 3 Chromatogram of *Cannabis sativa* L. roots sample solution (1, 2, 3, 4, 5 and 6) and standard solution of friedelin (7 and 8). Spray with vanillin-sulfuric acid, heat at 110 °C for 5 minutes and then examine under ultraviolet light 366 nm. Developing solvent system 1: Toluene and chloroform (7:3), system 2: Toluene and chloroform (9:1) and system 3: Chloroform and methanol (7:3).

1.2 การเลือกชนิดของตัวทำละลายในการสกัด

การศึกษาชนิดของตัวทำละลายในการสกัด ผลการศึกษาพบว่าเมื่อนำสารละลายที่ได้จากการสกัด รากกัญชาด้วยเฮกเซนและเอทานอล วิเคราะห์ด้วย เครื่องเดนซิโตมิเตอร์โครมาโทกราฟีผิวบาง ตัวอย่าง ละ 3 ซ้ำ พบแถบสารฟริเดลิน ที่ R_f เฉลี่ยเท่ากับ 39.7 และเมื่อนำมาอ่านแผ่นด้วยเครื่องตรวจอ่านแผ่น

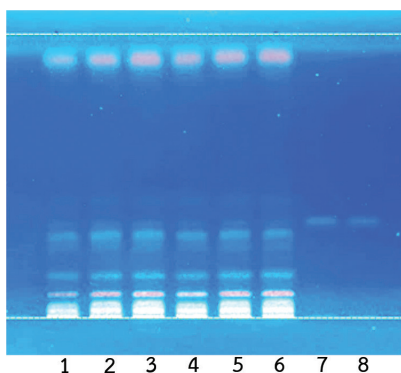


Figure 4 Chromatogram of friedelin extraction results in *Cannabis sativa* L. roots with hexane (1, 2 and 3), ethanol (4, 5 and 6) compare with standard solution of friedelin (7 and 8) were examined under ultraviolet light 366 nm

โครมาโทกราฟีผิวบาง ค่าพื้นที่ใต้พีคเฉลี่ยของสาร ฟริเดลินที่สกัดด้วยเฮกเซน มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.00255 และที่สกัดด้วยเอทานอล มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.00210 (Figure 4 and 5)

ดังนั้นในการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณฟริเด ลินในรากกัญชา จึงเลือกใช้เฮกเซนเป็นตัวทำละลาย ในการสกัดรากกัญชา

1.3 การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการสกัด

การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการสกัด พบว่าสารละลายที่ได้จากการสกัดตัวอย่างรากกัญชา ซึ่งสกัดด้วยวิธีเดียวกันโดยการรีฟลักซ์กับเฮกเซน แต่ระยะเวลาที่ใช้ในการสกัดแตกต่างกัน เมื่อนำมา วิเคราะห์ด้วยเครื่องเดนซิโตมิเตอร์โครมาโทกราฟี ผิวบาง และนำมาอ่านแผ่นด้วยเครื่องตรวจอ่านแผ่น โครมาโทกราฟีผิวบางพบว่าค่าพื้นที่ใต้พีคของสาร ฟริเดลินจากการสกัดด้วยระยะเวลา 30 นาที มีค่า น้อยกว่าระยะเวลาสกัด 60 และ 90 นาที แต่ค่าพื้นที่ ใต้พีคของสารฟริเดลินจากการสกัดด้วยระยะเวลา 60 และ 90 นาที ไม่แตกต่างกัน (Figure 6 and Table 1)

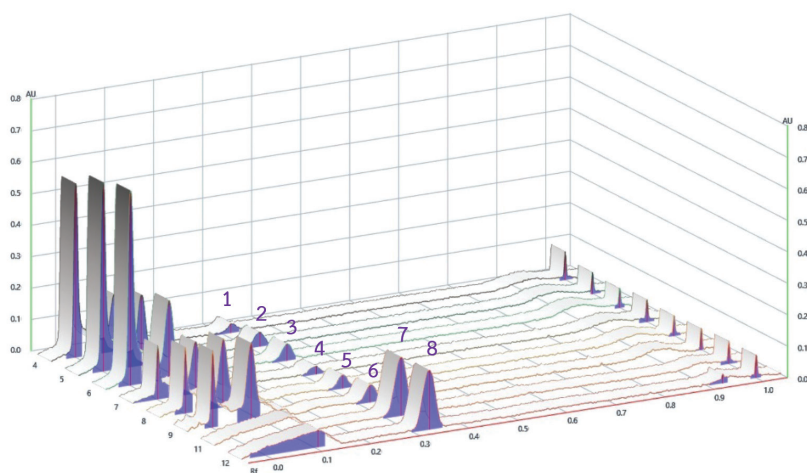


Figure 5 Densitogram of friedelin extraction results in *Cannabis sativa* L. roots with hexane (1, 2 and 3), ethanol (4, 5 and 6) compare with standard solution of friedelin (7 and 8) were examined under ultraviolet light 366 nm

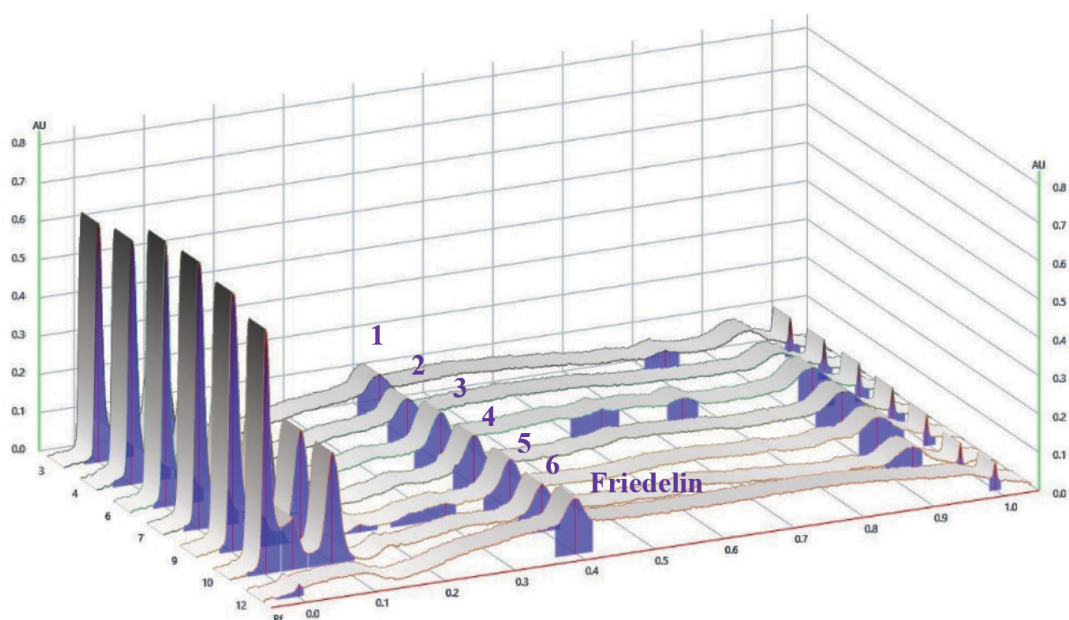


Figure 6 Effect of extraction time to extract friedelin from *Cannabis sativa* L. roots: 30 minutes (1 and 2), 60 minutes (3 and 4) and 90 minutes (5 and 6)

Table 1 Area under the peak of friedelin was extracted with hexane at 30, 60 and 90 minutes

No.	Sample	Vial	hR_f	Area peak
1	Hexane extract (30 นาที)	1	40.1	0.00133
2	Hexane extract (30 นาที)	2	39.3	0.00152
3	Hexane extract (60 นาที)	1	39.5	0.00254
4	Hexane extract (60 นาที)	2	39.3	0.00242
5	Hexane extract (90 นาที)	1	40.0	0.00255
6	Hexane extract (90 นาที)	2	39.7	0.00246

ดังนั้น ในการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณ ฟริเดลินในรากกัญชา จึงเลือกใช้เฮกเซนเป็นตัวทำละลายในการสกัดและใช้เวลาในการสกัด 60 นาที

ความยาวคลื่นในการตรวจวัดสารฟริเดลิน

จากการสังเกตลักษณะของโครมาโทแกรมพบ

ว่าพีคของสารสกัดเฮกเซนจากรากกัญชาซ้อนทับกันกับพีคของสารมาตรฐานฟริเดลินที่ hR_f เฉลี่ยเท่ากับ 39.7 และเมื่อใช้วิธีการตรวจวัด UV spectrum พีคที่ซ้อนทับกันนั้น พบว่าสารทั้งสองมีการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่นเดียวกัน (Figure 7)

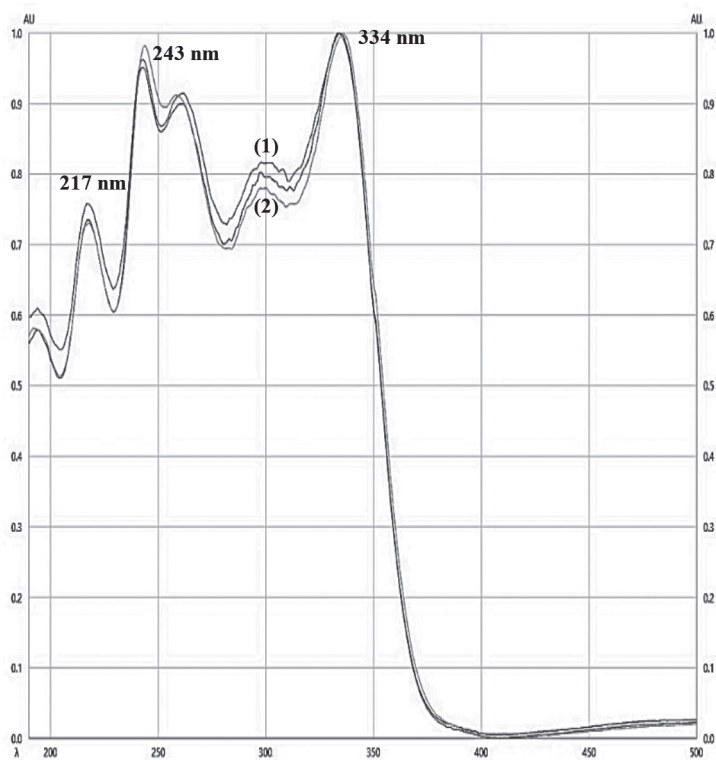


Figure 7 Ultraviolet spectrum of friedelin in *Cannabis sativa* L. roots sample solution (1) compare with standard solution of friedelin (2). Analyzed with thin layer chromatography densitometer. After spraying with vanillin-sulfuric acid test solution, heat to 110 °C for 5 minutes, then examine under ultraviolet light 366 nm and detect the plate with thin layer chromatography scanner.

ดังนั้น ในการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณฟริเดลิน ในรากกัญชา จึงเลือกตรวจวัดการดูดกลืนแสง อัลตราไวโอเล็ตที่มีความยาวคลื่น 366 นาโนเมตร

1.4 การศึกษาชนิดและสัดส่วนของภูมิภาคเคลื่อนที่

พบว่าสัดส่วนของภูมิภาคเคลื่อนที่ ที่ทำให้การแยกองค์ประกอบทางเคมีของสารและค่า R_f ที่เหมาะสมของฟริเดลินในสารละลายตัวอย่างรากกัญชา คือ สารละลายผสมของโทลูอินและคลอโรฟอร์มในอัตราส่วน 9:1 เมื่อเปรียบเทียบกับสัดส่วนสารละลายผสมของโทลูอินและคลอโรฟอร์มในอัตราส่วน 7:3 และสารละลายผสมของคลอโรฟอร์มและเมทานอล

ในอัตราส่วน 7:3 (Figure 3)

2. การทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์

2.1 การทดสอบความเป็นเส้นตรงและช่วงการวิเคราะห์

จากกราฟมาตรฐาน (calibration curve) ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานและพื้นที่ใต้พีค พบว่าความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานฟริเดลินกับพื้นที่ใต้พีคมีลักษณะเป็นเส้นตรง ในช่วงความเข้มข้น 25.99-831.60 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) เท่ากับ 0.9990 (Figure 8 and 9)

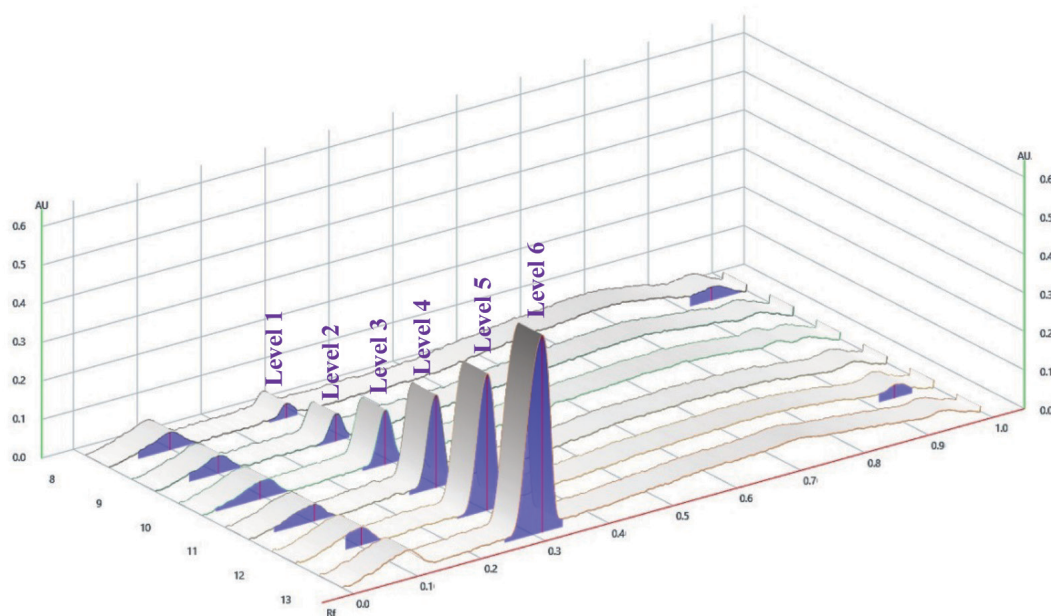


Figure 8 Densitogram of standard solution of friedelin concentration range of 25.99–831.60 $\mu\text{g/mL}$

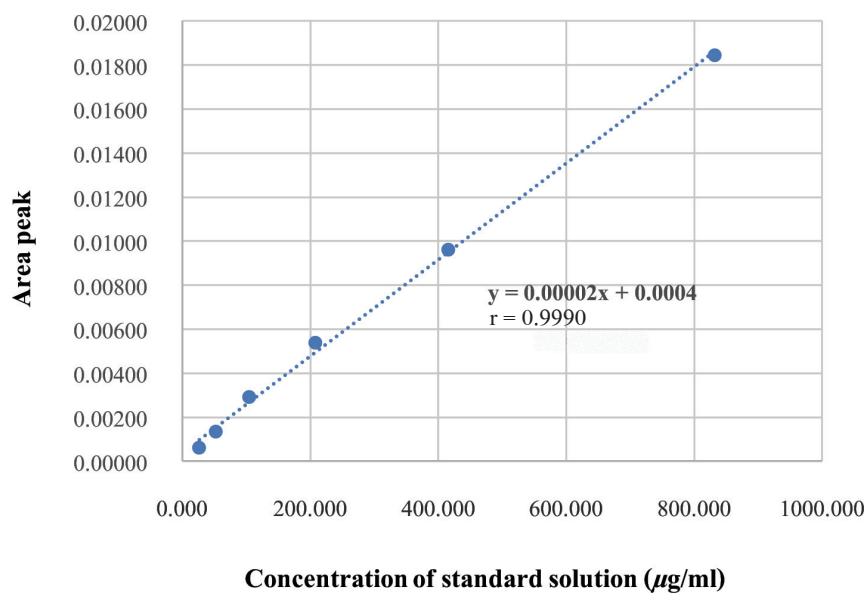


Figure 9 Calibration curve of friedelin concentration range of 25.99–831.60 $\mu\text{g/mL}$

2.2 การทดสอบร้อยละของการคืนกลับและความเที่ยง

เมื่อเติมสารละลายสารมาตรฐานฟริเดลินที่ความเข้มข้นระดับต่างๆ 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% ความเข้มข้นของฟริเดลินที่คำนวณได้เท่ากับร้อยละ 35.71, 52.63 และ 62.50 โดยน้ำหนัก ตามลำดับ

การคำนวณ

sample blank ที่วิเคราะห์ได้ มีปริมาณความเข้มข้นของฟริเดลินเฉลี่ย 21.60 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (แทนค่าพื้นที่ใต้พีคของฟริเดลินที่ค่า y จากสมการเส้นตรง $y = 0.00002x + 0.0004$ จะได้ค่า x คือ ปริมาณความเข้มข้นของฟริเดลินที่คำนวณได้)

ความเข้มข้นของฟริเดลินใน sample blank (%w/w) โดยน้ำหนักแห้งของรากกัญชา เท่ากับ $(21.60 \mu\text{g/mL}) \times (5 \text{ mL}) \times 1 \times 100 / \text{น้ำหนักรากกัญชา}$

$$\% \text{recovery} = \frac{(C1 - C2) \times 100}{C3}$$

ที่ระดับความเข้มข้นต่ำ

C1 คือ ความเข้มข้นของสารใน spiked sample

เท่ากับ 30.862 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

C2 คือ ความเข้มข้นของสารใน sample blank

เท่ากับ 21.600 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

C3 คือ ความเข้มข้นของสารที่เติม เท่ากับ 9.281 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

$$\% \text{recovery} = (30.862 - 21.600) \times 100 / 9.281 = 99.79$$

เมื่อวิเคราะห์ระดับละ 3 ซ้ำ คัดซ้ำละ 2 ครั้ง จะได้

$$\% \text{recovery} = 101.43 \pm 2.54 \text{ และ } \% \text{RSD} = 2.51$$

ในขณะเดียวกันการคำนวณร้อยละของการคืนกลับที่ระดับความเข้มข้นระดับกลางและระดับสูง จะคำนวณเหมือนกันกับระดับความเข้มข้นต่ำ แต่จะต่างกันเฉพาะค่า C1 และ C3

จากการวิเคราะห์ตัวอย่าง spiked sample พบว่าร้อยละของการคืนกลับของสารฟริเดลิน อยู่ในช่วง 100.57-102.45% (Table 2)

การทดสอบความเที่ยง

Repeatability วิเคราะห์ปริมาณสารฟริเดลินในตัวอย่างรากกัญชา พบว่ามีค่าร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ เท่ากับ 1.77 (Table 3)

Intermediate precision, between-day วิเคราะห์ปริมาณสารฟริเดลินในตัวอย่างรากกัญชา พบว่ามีค่าร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ เท่ากับ 1.93 (Table 3)

Table 2 Results of percentage recovery and repeatability

Analyzed substances	Sample blank		Spiked level		n = 6	
	($\mu\text{g/mL}$)	(%w/w)	(%)	(%w/w)	%Recovery mean $\pm$ SD	%RSD
Friedelin	21.60	0.005	50	35.71	101.43 $\pm$ 2.54	2.51
			100	52.63	102.45 $\pm$ 1.14	1.11
			150	62.50	100.57 $\pm$ 1.58	1.58

%Recovery acceptance criteria according to AOAC Peer-verified methods program on policies and procedures, Arlington, VA, USA (1998) is 95-105%

Table 3 Results of repeatability and intermediate precision between-day

Analyzed substances	%RSD of repeatability	%RSD of intermediate precision between-day
Friedelin	1.77	1.93

2.3 การทดสอบขีดจำกัดของการตรวจพบ	error/slope
การคำนวณ	standard error = 0.000188
คำนวณค่าประมาณของ LOD จาก calibration curve	slope = 0.000022
LOD ($\mu\text{g/mL}$), ค่าประมาณ = $3 \times \text{standard error}$	LOD ($\mu\text{g/mL}$), ค่าประมาณ = $(3 \times 0.000188)/0.000022 = 25.636 \mu\text{g/mL}$
LOD (%w/w), ค่าประมาณ = $\frac{\text{LOD } (\mu\text{g/mL}) \times \text{ปริมาตรที่เตรียม (mL)} \times \text{ระดับเจือจาง} \times 100}{1,000,000 \times \text{น้ำหนักตัวอย่าง } (\mu\text{g})}$	
	$= (25.636 \times 5) \times 1 \times 100/1,000,000/2.0043 = 0.006$
พบว่า LOD ของการวิเคราะห์ฟรีเดลิน เท่ากับ ร้อยละ 0.006 โดยน้ำหนักแห้งของรากกัญชา	LOQ ($\mu\text{g/mL}$), ค่าประมาณ = $10 \times \text{standard error/slope}$
2.4 การทดสอบขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ	standard error = 0.000188
การคำนวณ	slope = 0.000022
คำนวณค่าประมาณของ LOQ จาก calibration curve	LOQ ($\mu\text{g/mL}$), ค่าประมาณ = $(10 \times 0.000188)/0.000022 = 85.455 \mu\text{g/mL}$
LOQ (%w/w), ค่าประมาณ = $\frac{\text{LOD } (\mu\text{g/mL}) \times \text{ปริมาตรที่เตรียม (mL)} \times \text{ระดับเจือจาง} \times 100}{1,000,000 \times \text{น้ำหนักตัวอย่าง } (\mu\text{g})}$	
	$= (85.455 \times 5) \times 1 \times 100/1,000,000/2.0043 = 0.021$
%recovery = $\frac{(C1 - C2) \times 100}{C3}$	
ที่ความเข้มข้นของ LOQ เท่ากับ 85.455 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร	C2 คือ ความเข้มข้นของสารใน sample blank เท่ากับ 21.600 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร
C1 คือ ความเข้มข้นของสารใน spiked sample เท่ากับ 65.612 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร	C3 คือ ความเข้มข้นของสารที่เติม เท่ากับ 44.976 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

$\% \text{recovery} = (65.612 - 21.600) \times 100 / 44.976$
 $= 97.86$

เมื่อวิเคราะห์ปริมาณฟริเดลินใน spiked sample 6 ซ้ำ การคำนวณร้อยละของการคืนกลับ ที่เหลืออีก 5 ครั้ง จะคำนวณเหมือนกันกับครั้งแรก แต่จะต่างกันเฉพาะค่า C1 และ C3

เมื่อวิเคราะห์ 6 ซ้ำ จะได้ $\% \text{recovery} = 100.40$

± 1.90 และ $\% \text{RSD} = 1.89$

พบว่า LOQ ของการวิเคราะห์ฟริเดลินเท่ากับ ร้อยละ 0.021 โดยน้ำหนักแห้งของรากกัญชา โดยมีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ เท่ากับ 1.89 และ ร้อยละของการคืนกลับอยู่ในช่วงร้อยละ 97.86-102.94 (Table 4)

Table 4 Results of Limit of Quantitation

Analyzed substances	Spiked sample ($\mu\text{g/ml}$)	LOQ (% w/w)	n = 6		
			% Recovery	% Recovery mean $\pm$ SD	% RSD
Friedelin	21.60	0.021	97.86	100.40 $\pm$ 1.90	1.89
			99.89		
			102.94		
			101.92		
			98.87		
			100.91		

2.5 การทดสอบความจำเพาะ

จากการหดยาสารละลายสารมาตรฐานฟริเดลิน และสารละลายตัวอย่างรากกัญชา พบว่าภายใต้สภาวะโครมาโทกราฟีผิวบางที่พัฒนาขึ้น สามารถแยกสาร

ฟริเดลินและองค์ประกอบทางเคมีของสารในสารละลายตัวอย่างรากกัญชาออกจากกันได้ โดยมีค่า hR_f เหลือเท่ากับ 39.7 (Figure 10)

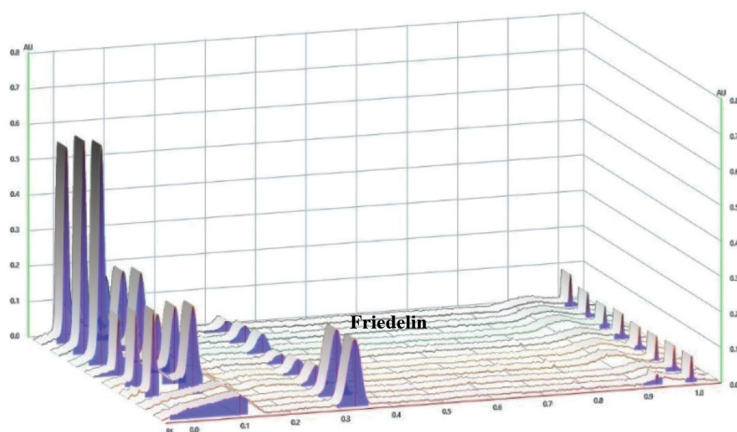


Figure 10 Densitogram of *Cannabis sativa* L. roots sample solution compared with standard solution of friedelin

3. การวิเคราะห์ปริมาณฟริเดลินเป็นร้อยละโดยน้ำหนักแห้งของรากกัญชา

ผลการวิเคราะห์ปริมาณฟริเดลินในตัวอย่างวัตถุดิบรากกัญชา CANR1, CANR2, CANW1 และ

CANW2 พบว่าปริมาณฟริเดลิน มีค่าเฉลี่ยร้อยละ 0.025 โดยน้ำหนักแห้งของรากกัญชา (ไมโครกรัม/ไมโครกรัม) (Table 5)

Table 5 The results showed friedelin contents in dried *Cannabis sativa* L. roots by thin layer chromatography densitometry

Sample	Sample code	Sample weight (g)	The concentration of friedelin is calculated from a linear equation of Calibration curve ($\mu\text{g/mL}$)	Friedelin content (% w/w)
1	CANR1	2.0043	115.756	0.029
2	CANR2	2.0042	90.608	0.023
3	CANW1	2.0055	104.325	0.026
4	CANW2	2.0057	87.560	0.022
mean				0.025

อภิปรายผล

รากกัญชาเป็นสมุนไพรที่มีศักยภาพเชิงพาณิชย์และมีประโยชน์ทั้งเป็นยาและเป็นผลิตภัณฑ์สุขภาพ แต่ยังไม่มียุทธศาสตร์การควบคุมคุณภาพสมุนไพรชนิดนี้มีรายงานการศึกษาทางวิทยาศาสตร์ทางด้านเคมีเภสัชวิทยาและพิษวิทยามากมายที่สนับสนุนการใช้ แต่การพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์นั้น ปัจจัยที่สำคัญที่ควรคำนึงถึงคือ ปัจจัยด้านคุณภาพของสมุนไพรเนื่องจากสารออกฤทธิ์ในรากกัญชา ได้แก่ สารฟริเดลิน เป็นสารประกอบที่พบมากในรากกัญชา การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณฟริเดลินในรากกัญชาด้วยวิธีเดนซิโตเมตรีโครมาโทกราฟีผิวบาง ซึ่งสามารถสรุปวิธีวิเคราะห์ได้ดังนี้ คือ นำมาวิเคราะห์ด้วยเครื่องเดนซิโตเมตรีโครมาโทกราฟีผิวบาง พบว่าอัตราส่วนส่วนผสมของตัวทำละลาย

โทลูอินและคลอโรฟอร์มในอัตราส่วน 7:3 นั้น แยกองค์ประกอบทางเคมีของสารในสารละลายตัวอย่างรากกัญชาได้ไม่ดี แต่เมื่อเปลี่ยนอัตราส่วนเป็น 9:1 แล้วจะทำให้เกิดการแยกสารได้ดีกว่าและเหมาะสมในการแยกสารฟริเดลิน สำหรับส่วนผสมของตัวทำละลายคลอโรฟอร์มและเมทานอลในอัตราส่วน 7:3 แม้ว่าจะแยกองค์ประกอบทางเคมีของสารได้ดีในช่วงแรกแต่เมื่อถึงช่วงที่แยกสารฟริเดลินนั้นจะแยกได้ไม่ดีเพราะแถบของสารฟริเดลินที่แยกได้มีลักษณะเป็นแถบหนา

ในการสกัดรากกัญชานั้นจะเลือกใช้เฮกเซนเป็นตัวทำละลายเพราะเฮกเซนมีคุณสมบัติไม่มีขั้วสูงสามารถละลายสารฟริเดลินซึ่งมีคุณสมบัติไม่มีขั้วสูงเช่นกันออกมาจากรากกัญชาได้มากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดด้วยเอทานอล การตรวจหา

จะใช้สารละลายทดสอบวานิลลิน-กรดซัลฟูริก เพราะสารละลายทดสอบนี้สามารถตรวจหาสารกลุ่มไตรเทอร์พีนอยด์ (triterpenoid) ได้ และสารพรีเดลินเป็นสารกลุ่มไตรเทอร์พีนอยด์ด้วย ส่วนผลการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ดังกล่าว พบว่า calibration curve ของสารมาตรฐานพรีเดลินมีลักษณะเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 1.07-106.89 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) เท่ากับ 0.9990 ค่าร้อยละของการคืนกลับอยู่ในช่วง 100.57-102.45% LOD และ LOQ เท่ากับร้อยละ 0.006 และ 0.021 โดยน้ำหนักแห้งของรากกัญชา (ไมโครกรัม/ไมโครกรัม) ตามลำดับ ปริมาณสารพรีเดลินในตัวอย่างวัตถุดิบรากกัญชา CANR1, CANR2, CANW1 และ CANW2 มีค่าเฉลี่ยร้อยละ 0.025 โดยน้ำหนักแห้งของรากกัญชา (ไมโครกรัม/ไมโครกรัม) วิธีเดนซิโตเมตรีโครมาโทกราฟีผิวบางที่มีการพัฒนาเพื่อให้มีประสิทธิภาพการแยกสาร ความไวในการแยกสารที่ดีขึ้น ใช้ภูมิภาคเคลื่อนที่น้อยลงไม่ยุ่งยากในการตรวจวิเคราะห์ จากการศึกษานี้ เมื่อเพิ่มปริมาณของสารละลายตัวอย่างรากกัญชาที่หยดลงไปในบนแผ่นโครมาโทกราฟีผิวบางให้มากขึ้น หลังจากพ่นด้วยสารละลายทดสอบวานิลลิน-กรดซัลฟูริก ให้ความร้อน 110 °ซ นาน 5 นาที แล้วตรวจสอบภายใต้แสงสีขาว พบว่าแถบสารที่ปรากฏยังแสดงสีไม่ชัดเจน การศึกษานี้จึงตรวจสอบภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต ที่ความยาวคลื่น 366 นาโนเมตร และนำมาอ่านแผ่นด้วยเครื่องตรวจอ่านแผ่นโครมาโทกราฟีผิวบาง เพื่อนำค่าพื้นที่ใต้พีคมาใช้ในการเปรียบเทียบและการคำนวณ เมื่อนำวิธีวิเคราะห์ปริมาณพรีเดลินในรากกัญชาด้วยวิธีเดนซิโตเมตรีโครมาโทกราฟีผิวบางที่พัฒนาขึ้นมาใหม่เปรียบเทียบกับ การหาปริมาณสารพรีเดลินในสารสกัดและตำรับยาสมุนไพรมะค่าไค้

ด้วยวิธี HPTLC^[3] และเปรียบเทียบกับ การวิเคราะห์พรีเดลินในรากกัญชาด้วยวิธี GC-MS/FID^[4] พบว่าการหาปริมาณสารพรีเดลินด้วยวิธี HPTLC นี้จะแยกสารพรีเดลินออกจากกันได้ และไม่มี การรบกวนของสารอื่นในตัวอย่าง แต่ลักษณะของแถบค่อนข้างกว้างไป วิธีวิเคราะห์ปริมาณพรีเดลินที่พัฒนาขึ้นมาใหม่นั้น มีการแยกองค์ประกอบทางเคมีที่ชัดเจน โดยสังเกตได้จากแถบสารพรีเดลินแยกออกจากกันได้ และไม่มี การรบกวนของแถบสารอื่นในตัวอย่าง นอกจากนี้ลักษณะของแถบสารพรีเดลินที่แยกจะแคบกว่า ทำให้การวิเคราะห์ด้วยวิธีนี้ให้ความถูกต้องแม่นยำกว่า ส่วนการวิเคราะห์สารพรีเดลินในสารสกัดรากกัญชาด้วยวิธี GC-MS/FID นั้น ต้องใช้ภูมิภาคเคลื่อนที่ คือ แก๊สตัวพา (carrier gas) และภูมิภาคที่อยู่กับที่ คือ column ที่มีราคาแพง ทำให้ต้องเสียค่าใช้จ่ายสูงในการตรวจวิเคราะห์ ส่วนวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นมาใหม่ ประหยัดตัวภูมิภาคเคลื่อนที่ และภูมิภาคที่อยู่กับที่ ที่ใช้คือแผ่น HPTLC ซึ่งมีราคาถูกกว่า เมื่อเทียบกับคอลัมน์ของวิธี GC-MS/FID ดังนั้นจึงเลือกใช้เครื่องเดนซิโตเมตรีโครมาโทกราฟีผิวบาง ในการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณพรีเดลินในรากกัญชา จากการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ปริมาณพรีเดลินที่พัฒนาขึ้น พบว่าร้อยละของการคืนกลับจากการวิเคราะห์ spiked sample อยู่ในเกณฑ์ยอมรับ (95-105%) ซึ่งแสดงถึงความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้น วิธีดังกล่าวจึงมีความเหมาะสม สามารถนำไปใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณพรีเดลิน เพื่อการควบคุมคุณภาพของวัตถุดิบรากกัญชาต่อไปได้

ข้อสรุป

การศึกษานี้ได้พัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์ปริมาณพรีเดลินในรากกัญชาด้วยวิธีเดนซิโตเมตรี-

โครมาโทกราฟีผิวบางและทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ ผลการศึกษาพบว่าวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นนี้มีความเหมาะสม สามารถนำไปใช้เป็นวิธีตรวจวิเคราะห์ปริมาณฟริเดลินในรากกัญชา ซึ่งเป็นประโยชน์ในการควบคุมคุณภาพของรากกัญชา หรือพัฒนาใช้กับการควบคุมคุณภาพสมุนไพรอื่นที่มีสารฟริเดลินเป็นสารสำคัญ และสามารถนำไปสู่การกำหนดเกณฑ์ปริมาณสารสำคัญในรากกัญชาต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ที่สนับสนุนงบประมาณในการศึกษานี้ ห้องปฏิบัติการฟิสิกส์และเคมี และเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการวิจัยเพื่อแยกสารสำคัญจากสมุนไพรทุกท่าน ที่ทำให้การศึกษานี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

References

1. Boonyaprapat N, Chokchaicharoenporn O. Medicinal plants indigenous to Thailand. Bangkok: Prachachon; 1996. 1(1): p. 169. (in Thai)
2. Ryz NR, Remillard DJ, Russo EB. Cannabis roots: A traditional therapy with future potential for treating inflammation and pain. Cannabis Cannabinoid Res. 2017;2(1):210-6.
3. Abhimanyu KK, Ravindra CS, Avanapu RS. A validated HPTLC method for the quantification of friedelin in *Putranjiva roxburghii* Wall extracts and in polyherbal formulations. Bulletin of Faculty of Pharmacy, Cairo University. 2017;55(1):79-84.
4. Kornpointner C, Martinez AS, Marinovic S, Haselmair-Gosch C, Jamnik P, Schroder K, Lofke C, Halbwirth H. Chemical composition and antioxidant potential of *Cannabis sativa* L. roots. Industrial Crops and Products. 2021;165:113422.
5. Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health. Thai Herbal Pharmacopoeia 2018. Bangkok: Keawjawjom Printing & Publishing SuanSunandhaRajabhat University; 2018.
6. Department of Medical Sciences. A practical guide for single laboratory method validation of chemical methods. Nonthaburi: Department of Medical Sciences; 2006. (in Thai)