

## การพัฒนาวิธีวิเคราะห์และการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ หาปริมาณแคนนาบินอยด์ในช่อดอกกัญชาด้วยวิธีโครมาโทกราฟีของเหลว สมรรถนะสูง

ธนวัฒน์ ทองจีน\*, พีรธรรม เทียมเทียบรัตน์, สายัณห์ เรืองเขตร, สรเพชร มาสุต, ศักดิ์วิชัย อ่อนทอง,  
ศิริวรรณ ชัยสมบุรณ์พันธ์, อัสวชัย ช่วยพรหม

สถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ตำบลตลาดขวัญ อำเภอเมือง จังหวัดนนทบุรี 11000

\*ผู้รับผิดชอบบทความ: thanawat.t@dmssc.mail.go.th

### บทคัดย่อ

**บทนำและวัตถุประสงค์:** กัญชา (*Cannabis sativa* L.) ได้ถูกนำมาใช้ในการรักษาโรคตั้งแต่สมัยโบราณ สารสำคัญที่พบในกัญชา คือ เตตราไฮโดรแคนนาบินอยด์ ซึ่งเป็นสารที่ออกฤทธิ์ต่อจิตประสาท และสารที่ไม่ออกฤทธิ์ต่อจิตประสาท เช่น แคนนาบิไดโอดและแคนนาบินอยด์ ปัจจุบันกัญชาถูกนำมาใช้เป็นองค์ประกอบทางยาและผลิตภัณฑ์สุขภาพที่หลากหลาย อย่างไรก็ตามยังไม่มีวิธีการควบคุมคุณภาพสารที่พบในกัญชาอย่างเหมาะสม การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการพัฒนาวิธีการวิเคราะห์ปริมาณแคนนาบินอยด์ในช่อดอกกัญชาด้วยวิธีโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (Ultra High Performance Liquid Chromatography, UHPLC)

**วิธีการศึกษา:** แบ่งเป็น 3 ขั้นตอน ได้แก่ การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณสารแคนนาบิไดโอด แคนนาบินอยด์ และเตตราไฮโดรแคนนาบินอยด์ในช่อดอกกัญชาด้วยวิธีโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง การทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์และการวิเคราะห์ปริมาณสารแคนนาบิไดโอด แคนนาบินอยด์ และเตตราไฮโดรแคนนาบินอยด์ในช่อดอกกัญชา จำนวน 12 ตัวอย่าง

**ผลการศึกษา:** ผลการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ดังกล่าว พบว่ากราฟมาตรฐานของแคนนาบิไดโอด แคนนาบินอยด์ และเตตราไฮโดรแคนนาบินอยด์ มีลักษณะเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 1.05-104.90, 1.00-99.60 และ 1.00-99.90 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ เท่ากับ 0.999, ค่าร้อยละของการคืนกลับอยู่ในช่วง 98.99-100.39 ชี้แจงค่าของการตรวจพบของแคนนาบิไดโอด แคนนาบินอยด์ และเตตราไฮโดรแคนนาบินอยด์ มีค่าเท่ากับร้อยละ 0.612, 0.872 และ 0.320 โดยน้ำหนักแห้งของช่อดอกกัญชา (ไมโครกรัม/ไมโครกรัม) ตามลำดับ ในขณะที่ชี้แจงค่าของการวัดเชิงปริมาณมีค่าเท่ากับร้อยละ 2.041, 2.908 และ 1.066 โดยน้ำหนักแห้งของช่อดอกกัญชา (ไมโครกรัม/ไมโครกรัม) ตามลำดับ

**อภิปรายผล:** การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณสารแคนนาบิไดโอด แคนนาบินอยด์ และเตตราไฮโดรแคนนาบินอยด์ในวัตถุดิบช่อดอกกัญชาด้วยเครื่อง UHPLC ที่พัฒนาขึ้น สามารถใช้ตรวจสอบสารสกัดช่อดอกกัญชาแห้งที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล โดยวิธีรีฟลักซ์ ผลการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์พบว่าทุกค่าอยู่ในเกณฑ์ยอมรับได้ วิธีการวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นใช้เวลาในการวิเคราะห์น้อย วิธีการเตรียมวัตถุดิบเคลื่อนที่ง่าย สะดวก และรวดเร็ว

**ข้อสรุป:** วิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นนี้มีความเหมาะสม สามารถนำไปใช้เป็นวิธีตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารแคนนาบิไดโอล แคนนาบินอลและเตตราไฮโดรแคนนาบินอล ในวัตถุดิบช่อดอกกัญชาและสามารถนำไปสู่การกำหนดเกณฑ์ปริมาณสารสำคัญในช่อดอกกัญชาต่อไป

**คำสำคัญ:** กัญชา, แคนนาบิไดโอล, แคนนาบินอล, เตตราไฮโดรแคนนาบินอล, โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

## Development of Analytical Methods and Validation of Cannabinoid Quantification Methods in *Cannabis sativa* L. Flowers by Ultra High Performance Liquid Chromatography

Thanawat Thongchin,\* Peradhama Thiemthieprat, Sayan Ruengkhet, Sorrapetch Marsud, Sakwichai Ontong, Siriwan Chaisomboonpan, Aussavashai Shuayprom

Medicinal Plant Research Institute, Department of Medical Sciences, Talat Khwan Subdistrict, Mueang District, Nonthaburi 11000, Thailand

\*Corresponding author: [thanawat.t@dmsc.mail.go.th](mailto:thanawat.t@dmsc.mail.go.th)

### Abstract

**Introduction and Objective:** Cannabis (*Cannabis sativa* L.) has been used to treat several diseases since ancient time. Tetrahydrocannabinol (THC) is the major psychoactive compound and the other non-psychoactive ingredients are cannabidiol (CBD) and cannabinol (CBN). Cannabis has been used as an active ingredient of several drugs and products in the markets. However, the appropriate analytical methods for quality control of those compounds are still limited. This study aimed to develop analytical methods for quantification assessment of CBD, CBN and THC in cannabis flower samples using the Ultra-High Performance Liquid Chromatography (UHPLC) technique.

**Methods:** The study was divided into three steps: developing the UHPLC method for analyzing cannabidiol, cannabinol and tetrahydrocannabinol in cannabis flowers, testing the validity of the analysis method, and analyzing the quantity of cannabidiol, cannabinol and tetrahydrocannabinol in 12 cannabis flower samples.

**Results:** This method was validated by establishing the linearity for cannabidiol, cannabinol and tetrahydrocannabinol at the concentration range of 1.05–104.90, 1.00–99.60 and 1.00–99.90  $\mu\text{g/mL}$ , respectively, with a determination correlation coefficient ( $r$ ) of 0.999. The % recovery was in the range of 98.99–100.39%. The limit of detection of cannabidiol, cannabinol and tetrahydrocannabinol was 0.612, 0.872 and 0.320% w/w (calculated on the dry weight as *C. sativa* flowers,  $\mu\text{g}/\mu\text{g}$ ), respectively, while the limits of quantification were 2.041, 2.908, and 1.066% w/w (calculated on the dry weight as *C. sativa* flowers,  $\mu\text{g}/\mu\text{g}$ ), respectively.

**Discussion:** The method developed for analyzing cannabidiol, cannabinol and tetrahydrocannabinol in raw cannabis flowers using UHPLC involves the extraction of dried cannabis flowers with ethanol as the solvent through the reflux method. The validity test results for the analysis method all fell within acceptable limits. This developed analysis method requires less time for analysis and involves a simple, convenient, and rapid preparation of the mobile phase.

**Conclusion and Recommendation:** This recently developed method proves suitable for analyzing the levels of cannabidiol, cannabinol and tetrahydrocannabinol in cannabis flowers. It enables the establishment of accurate specifications for these compounds in cannabis flowers.

**Key words:** *Cannabis sativa* L., cannabidiol, cannabinol, tetrahydrocannabinol, Ultra-High Performance Liquid

## บทนำและวัตถุประสงค์

กัญชา มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Cannabis sativa* L. จัดอยู่ในวงศ์ Cannabaceae มีชื่อเรียกอื่น เช่น กัญชาจีน, คุนเช่า, ปาง, ยานอ, Hashish, Hemp, Indian hemp, Marijuana เป็นต้น จัดเป็นไม้ล้มลุก ต้นตั้งตรง ดอกตัวผู้และดอกตัวเมียแยกกัน อยู่คนละต้น มีขนที่มีสารเหนียว ลำต้นเป็นเหลี่ยมเล็ก น้อย ใบที่อยู่ใกล้โคนต้นออกเป็นคู่ตรงข้ามกัน ใบที่อยู่ไกลยอดเรียงแบบบันไดเวียน มีใบ 2 อัน เป็นรูปเส้น ด้ายติดอยู่โคน ก้านใบยาวประมาณ 0.5 เซนติเมตร ตั้งตรง ไม่ร่วงง่าย แผ่นใบเป็นแฉก 5-7 แฉก แต่ละแฉก เป็นรูปหอก ปลายแฉกแหลมเป็นติ่ง โคนแฉกแหลม ขอบหยัก ก้านใบมีขน ดอกตัวผู้ออกเป็นช่อตามง่าม ใบและยอด ดอกมีกลีบเพียงชั้นเดียว จำนวน 5 กลีบ ไม่ติดกัน กลีบรูปขอบขนาน ดอกตัวเมีย ออกเดี่ยว ตามง่ามใบและยอด แต่ละดอกมีใบประดับสีเขียว เข้ม คล้ายกาบและมีขนเป็นต่อมหุ้มอยู่ไม่มีกลีบดอก (Figure 1) ผลรูปไข่ หรือ รูปรี เกี้ยง มีใบประดับ หุ้มอยู่ 2 ใบ สรรพคุณของกัญชามีดังนี้ คือ ใบเป็นยา ชูกำลัง แก้อ่อนเพลีย เจริญอาหาร กระตุ้นประสาท ทำให้นอนหลับ ช่อดอกตัวเมีย ช่วยบำรุงประสาท แก้ปวดประสาท ทำให้เคลิ้มฝัน มีฤทธิ์เป็นยาระงับ ปวด เมล็ดเป็นยาชูกำลัง ทำให้ประจำเดือนมาปกติ ส่วนลำต้นมีสรรพคุณบำรุงประสาท<sup>[1]</sup> กัญชามีส่วนประกอบของสารเคมีมากกว่า 450 ชนิด โดยมากกว่า 60 ชนิดเป็นสารกลุ่มแคนนาบินอยด์ (cannabinoids) มีองค์ประกอบหลักคือ เตตราไฮโดรแคนนาบินอล (Tetrahydrocannabinol, THC) และสารชนิดอื่นในกลุ่มเดียวกัน เช่น แคนนาบินอล (Cannabinol, CBN), แคนนาบิไดโอล (Cannabidiol, CBD), แคนนาบิโครมิน (Cannabichromene, CBC), แคนนาบิเจอร์อล (Cannabigerol, CBG) เป็นต้น<sup>[2-3]</sup>

ช่อดอกกัญชาเป็นส่วนประกอบหนึ่งของกัญชา ที่มีสารสำคัญในกลุ่มแคนนาบินอยด์อยู่ โดยสารที่เป็นที่รู้จักกันดีนั้นคือ แคนนาบิไดโอล แคนนาบินอล และเตตราไฮโดรแคนนาบินอล ซึ่งเป็นสารที่ออกฤทธิ์ กระตุ้นระบบประสาท ฮอร์โมน และภูมิคุ้มกันต่าง ๆ ในการใช้ประโยชน์ของช่อดอกกัญชามักจะนำมาใช้เป็นส่วนประกอบการผลิตเป็นยาแผนโบราณในหลายตำรับ เช่น ยาอัคคิณวคณะ ยาคุชไสยาสน์ ยารชณีสถิตพาสาย ยาแก้โรคจิต ยาอัมฤตโอสถ ยาไพสาลี ยาโภยสาลี ยาทำลายพระสุเมรุ ยาทัพยาธิคุณ<sup>[4]</sup> สารแคนนาบิไดโอล และสารแคนนาบินอล มีลักษณะเป็นผงสีขาว สารเตตราไฮโดรแคนนาบินอล มีลักษณะเป็นของเหลวใส สารแคนนาบิไดโอล มีฤทธิ์บรรเทาอาการลมชัก ลดอาการวิตกกังวลทั้งในเด็กกลุ่มอาการออทิสติก หรือในผู้ป่วยที่มีประวัติการเสพยาเสพติด สารแคนนาบินอล มีฤทธิ์ต้านการอักเสบและลดความเจ็บปวด ส่วนสารเตตราไฮโดรแคนนาบินอล มีฤทธิ์แก้ปวด กระตุ้นความอยากอาหารและลดอาการคลื่นไส้จากการใช้เคมีบำบัด ช่วยปกป้องและกระตุ้นการสร้างเซลล์สมอง<sup>[5]</sup> สูตรโครงสร้างของแคนนาบิไดโอล แคนนาบินอล และเตตราไฮโดรแคนนาบินอล (Figure 2)

ปัจจุบัน การพัฒนาพืชสมุนไพรกัญชาเพื่อประโยชน์ทางการแพทย์ จำเป็นต้องมีการศึกษาการพัฒนาสารสกัด การแยกสารบริสุทธิ์และผลิตภัณฑ์จากกัญชา เพื่อให้เป็นพืชที่สามารถใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ได้อย่างเหมาะสม และในการนำช่อดอกกัญชามาเป็นองค์ประกอบในการปรุงตำรับยา ยังไม่มีข้อมูลปริมาณสารสำคัญ ในปี พ.ศ. 2555 มีรายงานการหาปริมาณสารแคนนาบิไดโอล แคนนาบินอล และเตตราไฮโดรแคนนาบินอลในกัญชาด้วยวิธี HPLC/UV<sup>[6]</sup> แต่เนื่องจากการวิเคราะห์ปริมาณ

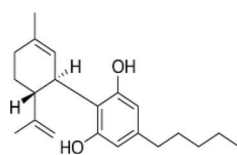
สารกลุ่มแคนนาบินอยด์ในกัญชาด้วยวิธี HPLC/UV จำนวน 1 ตัวอย่างนั้น ใช้เวลานาน คือ 22 นาที ทำให้สิ้นเปลืองวัสดุภาคเคลื่อนที่ (mobile phase) และต่อมาในปี พ.ศ. 2561 มีรายงานการหาปริมาณสารแคนนาบินอยด์ในกัญชาด้วยวิธี HPLC-DAD<sup>[7]</sup> และการวิเคราะห์ปริมาณสารกลุ่มแคนนาบินอยด์ในกัญชาด้วยวิธี HPLC-DAD นี้ใช้เวลานาน ถึง 50 นาที ซึ่งเป็นสาเหตุของการสิ้นเปลืองสารเคมีด้วยเช่นกัน

การศึกษาค้างนี้มีวัตถุประสงค์ในการพัฒนาวิธีวิเคราะห์สารแคนนาบิไดอล แคนนาบินอล และเตตราไฮโดรแคนนาบินอลในช่อดอกกัญชา และ

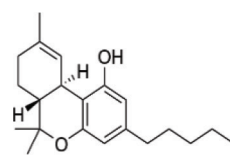
ทดสอบความถูกต้องของวิธีเพื่อให้ได้วิธีมาตรฐานของห้องปฏิบัติการที่มีความถูกต้องแม่นยำ สะดวก รวดเร็วและประหยัดสารเคมี เพื่อใช้ในการประเมินคุณภาพของกัญชา จำนวน 4 สายพันธุ์ ที่ปลูกในประเทศไทย รวมทั้งการหาปริมาณสารสำคัญที่อยู่ในช่อดอกกัญชาและสามารถนำช่อดอกกัญชาแต่ละสายพันธุ์ไปใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ได้อย่างเหมาะสม นอกจากนี้ยังสามารถใช้ในการวิจัยและพัฒนาตำรับยาและผลิตภัณฑ์จากสมุนไพรที่มีกัญชาเป็นส่วนผสม รวมถึงเป็นข้อมูลในการพัฒนาพันธุ์กัญชาเพื่อเพิ่มมูลค่าของช่อดอกกัญชาทางเศรษฐกิจต่อไป



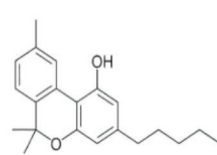
Figure 1 *Cannabis sativa* L. flowers



Cannabidiol (CBD)



Cannabinol (CBN)



Tetrahydrocannabinol (THC)

Figure 2 Chemical structure of cannabidiol, cannabinol and tetrahydrocannabinol

## ระเบียบวิธีศึกษา

### 1. วัสดุ

#### 1.1 ตัวอย่างสมุนไพร

ช่อดอกกัญชาสดถูกรวบรวมจากโครงการศึกษาการปลูกและขยายพันธุ์ต้นกัญชาภายใต้สภาพ

โรงเรือนแบบปิดของสถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ และมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี วิทยาเขตสกลนคร จำนวน 12 ตัวอย่าง คือ กัญชาพันธุ์ไทยจำนวน 4 สายพันธุ์ ได้แก่ ทางกระรอกภูพานเอสที1 (ST1) มีจำนวน 4 ตัวอย่าง,

ทางเลื่อสกลนครที่1 (TT1) มีจำนวน 5 ตัวอย่าง, ตะนาวศรีก้านขาวดับเบิลยูเอ1 (WA1) มีจำนวน 1 ตัวอย่าง และตะนาวศรีก้านแดงอาร์ดี1 (RD1) มีจำนวน 2 ตัวอย่าง ซึ่งมีอายุการปลูก 5 เดือน นำมาคัดแยกเอาเฉพาะช่อดอก นำมาล้างด้วยน้ำให้สะอาด ผึ่งให้แห้งที่อุณหภูมิห้องพอหมาด ๆ หั่นให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ และอบให้แห้งด้วยตู้อบร้อนไฟฟ้าที่อุณหภูมิ 45°C นาน 72 ชั่วโมง คัดเลือกเอาเมล็ดออกก่อนนำตัวอย่างที่แห้งแล้วไปบดเป็นผงหยาบ ผ่านร่อนที่มีขนาดช่อง 180 ไมโครเมตร แล้วเก็บสมุนไพรในขวดแก้วสีชาที่มีฝาปิดสนิท ปิดฉลากระบุชื่อสมุนไพร ปริมาณ และวันที่เตรียมตัวอย่าง เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องเพื่อนำมาศึกษาปริมาณสารสำคัญในขั้นตอนต่อไป

### 1.2 สารมาตรฐาน

สารมาตรฐานแคนนาบิไดอล ความบริสุทธิ์  $\geq 99.9\%$  (THC Pharm GmbH, Batch: S19-014)

สารมาตรฐานแคนนาบินอล ความบริสุทธิ์  $\geq 99.6\%$  (THC Pharm GmbH, Batch: DWO180.707-1)

สารมาตรฐานเตตราไฮโดรแคนนาบินอล ความบริสุทธิ์  $\geq 98.6\%$  (THC Pharm GmbH, Batch: DWO181.121-1)

### 1.3 สารเคมีและตัวทำละลาย

Methanol HPLC grade (RCI Labscan Limited, Thailand), acetonitrile HPLC grade (RCI Labscan Limited, Thailand), ethanol AR grade (RCI Labscan Limited, Thailand), hexane AR grade (Fisher Scientific, UK), ortho-phosphoric acid HPLC grade (RCI Labscan Limited, Thailand) และน้ำปราศจากไอออน (deionized water)

### 1.4 วัสดุวิทยาศาสตร์และเครื่องแก้ว

คอลัมน์ชนิด ARC-18, ขนาด  $4.6 \times 150$  มิลลิเมตร, ขนาดอนุภาค 2.7 ไมโครเมตร และ ARC-

8, ขนาด  $2.1 \times 100$  มิลลิเมตร, ขนาดอนุภาค 3.0 ไมโครเมตร (Restek), nylon filter syringe ขนาด 0.2 ไมโครเมตร, กระดาษกรองเบอร์ 4 (Whatman, UK), เครื่องแก้ว และ micro pipette

### 1.5 เครื่องมือ

เครื่อง Ultra High Performance Liquid Chromatography-DAD detector รุ่น 1290 Infinity II (Agilent), ตู้อบร้อนไฟฟ้ารุ่น UL-50 (Memmert), เครื่องบดป่น รุ่น RT 34 (ChyunTseh Industrial), เครื่องร่อน รุ่น AS 200 Basic (Retsch), แรงที่มีขนาดช่อง 180 ไมโครเมตร (Endocott), เครื่องระเหยสุญญากาศประกอบด้วย อ่างน้ำแบบควบคุมอุณหภูมิ รุ่น SB-1000 (Eyela) และ rotavapor รุ่น N-1000 (Eyela), เครื่องทำสุญญากาศรุ่น A-3S (Eyela) และเครื่องทำน้ำเย็นหมุนเวียน รุ่น CA-101 (Eyela) และเครื่องชั่งไฟฟ้า 4 ตำแหน่ง รุ่น XT 220A (Precisa)

## 2. วิธีการศึกษา

### 2.1 การพัฒนาวิธีวิเคราะห์และหาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์

#### 2.1.1 การเตรียมสารมาตรฐาน

เตรียมสารละลายมาตรฐานแคนนาบิไดอล แคนนาบินอล และเตตราไฮโดรแคนนาบินอล ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร นำสารละลายมาตรฐานที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (UHPLC)

#### 2.1.2 การเตรียมสารละลายตัวอย่าง

สกัดตัวอย่างช่อดอกกัญชาแห้ง น้ำหนัก 0.5 กรัม ด้วยเอทานอล (ethanol) ปริมาตร 40 มิลลิลิตร โดยวิธีรีฟลักซ์ (reflux) เป็นเวลา 30 นาที กรองและนำสารสกัดที่ได้มาระเหยแห้ง ละลายและปรับปริมาตรด้วยเมทานอล (methanol) จนครบ 100

มิลลิลิตร โดยใช้ขวดแก้ววัดปริมาตร (volumetric flask) ปิเปตมา 1 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยเมทานอล จนครบ 25 มิลลิลิตร โดยใช้ขวดแก้ววัดปริมาตร กรองผ่าน nylon filter syringe นำสารละลายตัวอย่างที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

### **2.1.3 การเลือกชนิดของตัวทำละลายในการสกัด**

สกัดตัวอย่างช่อดอกกัญชาแห้ง น้ำหนัก 0.5 กรัม โดยใช้เอทานอล 40 มิลลิลิตร เปรียบเทียบกับเฮกเซน (hexane) 40 มิลลิลิตร ด้วยวิธีรีฟลักซ์ เป็นเวลา 30 นาที กรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 4 นำสารสกัดเอทานอล และสารสกัดเฮกเซน ไประเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ จากนั้นละลายและปรับปริมาตรด้วยเมทานอล จนครบ 100 มิลลิลิตร โดยใช้ขวดแก้ววัดปริมาตร ปิเปตมา 1 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยเมทานอล จนครบ 25 มิลลิลิตร โดยใช้ขวดแก้ววัดปริมาตร กรองผ่าน nylon filter syringe แล้วนำมาวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง เพื่อเปรียบเทียบความสามารถในการสกัดสารแคนนาบิไดออล แคนนาบินอล และเตตราไฮโดรแคนนาบินอล จากช่อดอกกัญชา

### **2.1.4 การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการสกัด**

สกัดตัวอย่างช่อดอกกัญชาแห้ง น้ำหนัก 0.5 กรัม ด้วยเอทานอล 40 มิลลิลิตร ด้วยวิธีรีฟลักซ์ เป็นเวลา 30, 60 และ 90 นาที กรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 4 นำสารละลายที่ได้ไประเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ จากนั้นละลายและปรับปริมาตรด้วยเมทานอล จนครบ 100 มิลลิลิตร โดยใช้ขวดแก้ววัดปริมาตร ปิเปตมา 1 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยเมทานอล จนครบ 25 มิลลิลิตร โดยใช้

ขวดแก้ววัดปริมาตร กรองผ่าน nylon filter syringe นำสารละลายตัวอย่างที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง เพื่อเปรียบเทียบผลของเวลาที่ใช้ในการสกัดสารแคนนาบิไดออล แคนนาบินอล และเตตราไฮโดรแคนนาบินอล

### **2.1.5 การเลือกใช้ความยาวคลื่นในการตรวจวิเคราะห์สารแคนนาบิไดออล แคนนาบินอล และเตตราไฮโดรแคนนาบินอล**

สกัดตัวอย่างช่อดอกกัญชาแห้ง น้ำหนัก 0.5 กรัม ด้วยเอทานอล ด้วยวิธีรีฟลักซ์ เป็นเวลา 60 นาที กรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 4 นำสารละลายที่ได้ไประเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ จากนั้นละลายและปรับปริมาตรด้วยเมทานอลจนครบ 100 มิลลิลิตร โดยใช้ขวดแก้ววัดปริมาตร ปิเปตมา 1 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยเมทานอล จนครบ 25 มิลลิลิตร โดยใช้ขวดแก้ววัดปริมาตร กรองผ่าน nylon filter syringe นำสารละลายตัวอย่างที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง วัดการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเล็ตของแคนนาบิไดออล แคนนาบินอล และเตตราไฮโดรแคนนาบินอล เพื่อดูความยาวคลื่นที่สารชนิดนี้สามารถดูดกลืนแสงสูงสุด ( $\lambda_{max}$ ) และวิเคราะห์สารละลายตัวอย่างช่อดอกกัญชาโดยใช้ DAD เพื่อเลือกความยาวคลื่นสำหรับการตรวจวัดแคนนาบิไดออล แคนนาบินอล และเตตราไฮโดรแคนนาบินอล โดยที่ไม่พบการซ้อนทับของ (peak, co-elute)

### **2.1.6 วัฏภาคคงที่ (stationary phase) และวัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase)**

**วัฏภาคคงที่** เปรียบเทียบผลของคอลัมน์ชนิดต่าง ๆ ที่แตกต่างกันในเรื่องชนิดอนุภาคภายในคอลัมน์ (ARC-18 และ ARC-8) ความยาวคอลัมน์ (150 และ 100 มิลลิเมตร) โดยพิจารณาเลือกคอลัมน์



จากลักษณะของ peak shape, peak symmetry และ retention time

**ภูมิภาคเคลื่อนที่** คือ ภาชนะและสัดส่วนของภูมิภาคเคลื่อนที่ เมื่อปรับเปลี่ยนองค์ประกอบของภูมิภาคเคลื่อนที่จากน้ำและอะซิโตนไทรล์ เป็น 0.1% ออร์โทฟอสฟอริกแอซิด (0.1% ortho-phosphoric acid) ในน้ำ และ 0.1% ออร์โทฟอสฟอริกแอซิดในอะซิโตนไทรล์ โดยพิจารณาจาก peak shape และ retention time ของแคนนาบิไดอล แคนนาบินอล และเตตราไฮโดรแคนนาบินอล ความสามารถในการแยกสิ่งเจือปน (impurity) จากพืชของแคนนาบิไดอล แคนนาบินอล และเตตราไฮโดรแคนนาบินอล ในสารละลายตัวอย่างช่อดอกกัญชาและความดันของระบบโครมาโทกราฟี

## 2.2 ความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (method validation)

ทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ปริมาณแคนนาบิไดอล แคนนาบินอล และเตตราไฮโดรแคนนาบินอล ในช่อดอกกัญชาที่พัฒนาขึ้นตามแนวปฏิบัติการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ทางเคมี โดยห้องปฏิบัติการเดี่ยว กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข<sup>[8]</sup>

### 2.2.1 การทดสอบความจำเพาะ (specificity)

ฉีดสารละลายสารมาตรฐานแคนนาบิไดอล แคนนาบินอล และเตตราไฮโดรแคนนาบินอล ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง เพื่อตรวจสอบการแยกสารแคนนาบิไดอล แคนนาบินอล และเตตราไฮโดรแคนนาบินอล ออกจากกันและออกจากการรบกวนของสารอื่น ซึ่งต้องมีค่า retention time แยกจากกันได้ดีและคำนวณ peak purity

### 2.2.2 การทดสอบความเป็นเส้นตรง (linearity) และช่วงการวิเคราะห์ (range)

เตรียมสารละลายสารมาตรฐานจำนวน 3 ชนิด ได้แก่ แคนนาบิไดอล แคนนาบินอล และเตตราไฮโดรแคนนาบินอล โดยชั่งสารมาตรฐาน น้ำหนัก 10, 25 และ 100 มิลลิกรัม ตามลำดับ ละลายและปรับปริมาตรด้วยเมทานอล จนครบ 10, 25 และ 50 มิลลิลิตร ด้วยขวดแก้ววัดปริมาตร ตามลำดับ จะได้ stock solution ของสารละลายสารมาตรฐานแคนนาบิไดอล แคนนาบินอล และเตตราไฮโดรแคนนาบินอล เข้มข้น 1,000, 1,000 และ 2,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ปิเปตสารละลายมาตรฐาน แคนนาบิไดอล แคนนาบินอล และเตตราไฮโดรแคนนาบินอล ปริมาตร 1,000, 1,000 และ 500 ไมโครลิตร ตามลำดับ ใส่ลงในขวดแก้ววัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยเมทานอล จากนั้นเจือจางให้ได้ 5 ระดับความเข้มข้น คือ 1, 10, 20, 50 และ 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร จะได้ 5 ระดับความเข้มข้นของสารละลายสารมาตรฐานแคนนาบิไดอล ดังนี้ 1.05, 10.49, 20.98, 52.45 และ 104.90 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร 5 ระดับความเข้มข้นของสารละลายสารมาตรฐานแคนนาบินอล ดังนี้ 1.00, 9.96, 19.92, 49.80 และ 99.60 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และ 5 ระดับความเข้มข้นของสารละลายสารมาตรฐานเตตราไฮโดรแคนนาบินอล ดังนี้ คือ 1.00, 9.99, 19.98, 49.95 และ 99.90 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ฉีดสารละลายสารมาตรฐาน แคนนาบิไดอล แคนนาบินอล และเตตราไฮโดรแคนนาบินอล ที่ 5 ระดับความเข้มข้น ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง นำค่าพื้นที่ใต้พีค (area under curve, AUC) และความเข้มข้นของสารละลายสารมาตรฐานแคนนาบิไดอล แคนนาบินอล และ

เตตราไฮโดรแคนนาบินอล ไปสร้างกราฟมาตรฐาน (calibration curve) และคำนวณค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient,  $r$ )

### 2.2.3 การทดสอบหาร้อยละของการคืนกลับ (% recovery) และความเที่ยง (precision)

เตรียม sample blank (sample blank คือ ตัวอย่างช่อดอกกัญชาที่นำมาสกัดและตรวจวิเคราะห์หาปริมาณแคนนาบิไดออล แคนนาบินอล และเตตราไฮโดรแคนนาบินอล แล้วมีปริมาณสารแคนนาบิไดออล แคนนาบินอล และเตตราไฮโดรแคนนาบินอล ในปริมาณต่ำ ๆ) โดย ชั่งตัวอย่างช่อดอกกัญชา 0.5 กรัม สกัดด้วยเอทานอล 40 มิลลิลิตร โดยวิธีรีฟลักซ์ เป็นเวลา 60 นาที กรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 4 นำสารละลายที่ได้ไประเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ จากนั้นละลายและปรับปริมาตรด้วยเมทานอล จนครบ 100 มิลลิลิตร โดยใช้ขวดแก้ววัดปริมาตร ปิเปตมา 1 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย

เมทานอล จนครบ 25 มิลลิลิตร โดยใช้ขวดแก้ววัดปริมาตร กรองผ่าน nylon filter syringe นำสารละลายตัวอย่างที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง จำนวน 6 ซ้ำ แล้วนำมาหาค่าเฉลี่ย (mean)

เตรียม spiked sample ลงใน sample blank โดยเติมสารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้น 3 ระดับ ระดับละ 3 ซ้ำ ฉีดซ้ำละ 2 ครั้ง โดย spiked สารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้นระดับต่ำ กลาง และสูง ลงไปใน sample blank 50, 100, 150% ตามลำดับ

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

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

เมื่อ  $C_1$  คือ ความเข้มข้นของสารใน spiked sample

$C_2$  คือ ความเข้มข้นของสารใน sample blank

$C_3$  คือ ความเข้มข้นของสารที่เติม

### การทดสอบความเที่ยง

Repeatability วิเคราะห์ปริมาณสารแคนนาบิไดออล แคนนาบินอล และเตตราไฮโดรแคนนาบินอล ในตัวอย่างช่อดอกกัญชา จำนวน 10 ซ้ำ ในวันเดียวกัน นำค่าพื้นที่ใต้พีคมาคำนวณปริมาณสารแคนนาบิไดออล แคนนาบินอล และเตตราไฮโดรแคนนาบินอล และคำนวณค่าร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (% RSD)

Intermediate precision วิเคราะห์ปริมาณสารแคนนาบิไดออล แคนนาบินอล และเตตราไฮโดรแคนนาบินอล ในตัวอย่างช่อดอกกัญชา เป็นเวลา 3 วัน วันละ 10 ซ้ำ นำค่าพื้นที่ใต้พีคมาคำนวณปริมาณสารแคนนาบิไดออล แคนนาบินอล และเตตราไฮโดรแคนนาบินอล และคำนวณค่าร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์



## 2.2.4 การทดสอบขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (limit of quantitation, LOQ)

คำนวณค่าประมาณของ LOQ จากกราฟมาตรฐาน ดังนี้

$$\text{LOQ } (\mu\text{g/mL}), \text{ ค่าประมาณ} = 10 \times \sigma/S$$

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

เตรียมสารละลายตัวอย่างช่อดอกกัญชา โดยชั่งตัวอย่างช่อดอกกัญชา 0.5 กรัม สกัดด้วยเอทานอลโดยวิธีฟลักซ์ เป็นเวลา 60 นาที กรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 4 นำสารละลายที่ได้ไประเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ จากนั้นละลายและปรับปริมาตรด้วยเมทานอล จนครบ 100 มิลลิลิตร โดยใช้

ขวดแก้ววัดปริมาตร กรองผ่าน nylon filter syringe เตรียมสารละลาย spiked sample ให้มีความเข้มข้นใกล้เคียงกับค่าประมาณของ LOD แล้วตรวจวิเคราะห์ปริมาณแคนนาบิไดออล แคนนาบินอล และเตตราไฮโดรแคนนาบินอล ใน spiked sample 6 ซ้ำ

## 2.2.5 การทดสอบขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (limit of quantitation, LOQ)

คำนวณค่าประมาณของ LOQ จาก calibration curve ดังนี้

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

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

เตรียมสารละลาย spiked sample ให้มีความเข้มข้นใกล้เคียงกับค่าประมาณของ LOQ แล้วตรวจวิเคราะห์ปริมาณแคนนาบิไดออล แคนนาบินอล และเตตราไฮโดรแคนนาบินอล ใน spiked sample 6 ซ้ำ คำนวณค่าร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์และร้อยละของการคืนกลับ

## 2.3 การวิเคราะห์ปริมาณแคนนาบิไดออล แคนนาบินอล และเตตราไฮโดรแคนนาบินอลในสารละลายตัวอย่างช่อดอกกัญชา

### 2.3.1 การเตรียมสารละลายตัวอย่างช่อดอกกัญชา

ซึ่งตัวอย่างช่อดอกกัญชา 0.5 กรัม สกัด

ด้วยเอทานอล ปริมาตร 40 มิลลิลิตร โดยวิธีฟลักซ์เป็นเวลา 60 นาที กรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 4 นำสารละลายที่ได้ไประเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ จากนั้นละลายและปรับปริมาตรด้วยเมทานอล จนครบ 100 มิลลิลิตร โดยใช้ขวดแก้ววัดปริมาตร ปิเปตมา 1 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยเมทานอล จนครบ 25 มิลลิลิตร โดยใช้ขวดแก้ววัดปริมาตร กรองผ่าน nylon filter syringe นำสารละลายตัวอย่างที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

วิเคราะห์ปริมาณแคนนาบิไดออล แคนนาบินอล และเตตราไฮโดรแคนนาบินอลในตัวอย่างช่อดอก

กัญชา จำนวน 12 ตัวอย่าง ด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้น โดยที่แต่ละตัวอย่างให้วิเคราะห์ 3 ซ้ำ แล้วนำมาหาค่าเฉลี่ยการคำนวณความเข้มข้นของสารแคนนา-

บิไดออล แคนนาบินอล และเตตราไฮโดรแคนนาบินอล ในตัวอย่างสารละลายช่อดอกกัญชา (ร้อยละโดยน้ำหนักของตัวอย่างช่อดอกกัญชา, % w/w)

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

เมื่อ  $C_0$  คือ ความเข้มข้นของสารที่วิเคราะห์ที่คำนวณได้จากกราฟมาตรฐาน

$C_s$  คือ ความเข้มข้นของสารที่วิเคราะห์เพื่อแปลงเป็นร้อยละโดยน้ำหนัก

## ผลการศึกษา

### 1. การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณแคนนาบิไดออล แคนนาบินอล และเตตราไฮโดรแคนนาบินอลในช่อดอกกัญชา

#### 1.1 การศึกษาหาสภาวะของระบบโครมาโทกราฟี

หลังจากนำสารละลายมาตรฐานของแคนนาบิไดออล แคนนาบินอล และเตตราไฮโดรแคนนาบินอล และสารละลายตัวอย่างช่อดอกกัญชาไปวิเคราะห์ด้วย

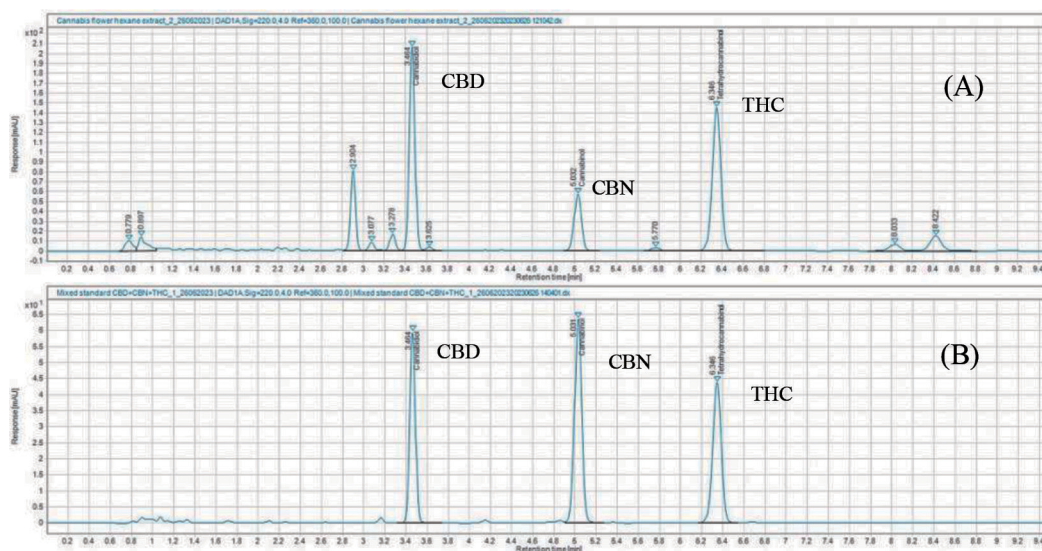
เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวประสิทธิภาพสูง พบว่า ได้สภาวะของระบบโครมาโทกราฟีที่เหมาะสมในการแยกสารแคนนาบิไดออล แคนนาบินอล และเตตราไฮโดรแคนนาบินอล (Table 1) โดยสัดส่วนของวัฏภาคเคลื่อนที่แบบ gradient program จะเริ่มที่เวลา นาทีที่ 0.0 ถึง นาทีที่ 8.5 ใช้ % A:% B (28:72), นาทีที่ 8.5 ถึง นาทีที่ 8.6 ใช้ % A:% B (5:95), นาทีที่ 8.6 ถึง นาทีที่ 9.5 ใช้ % A:% B (5:95), นาทีที่ 9.5 ถึง นาทีที่ 12.1 ใช้ % A:% B (28:72) และ นาทีที่ 12.1 ถึง นาทีที่ 15.0 ใช้ % A:% B (28:72) (Table 2, Figure 3)

**Table 1** Optimal chromatography conditions for separation of cannabidiol, cannabinol and tetrahydrocannabinol by UHPLC system

| Optimal conditions |                                                                                                          |
|--------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Stationary phase   | UHPLC column ARC-18; 4.6 × 150 mm, 2.7 μm                                                                |
| Column Temperature | 40 °C                                                                                                    |
| Mobile phase       | Gradient: 0.1 % ortho-phosphoric acid in deionized water and 0.1 % ortho-phosphoric acid in acetonitrile |
| Flow rate          | 1.5 mL/min                                                                                               |
| Detection          | DAD 220 nm                                                                                               |
| Injection volume   | 5 μL                                                                                                     |

Table 2 Gradient program

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



**Figure 3** Chromatograms of sample solution of *Cannabis sativa* L. flowers (A) and standard solution of cannabidiol, cannabinol and tetrahydrocannabinol (B)

การศึกษาชนิดของตัวทำละลายในการสกัดพบว่าเมื่อนำสารละลายที่ได้จากการสกัดช่อดอกกัญชาด้วยเอทานอลและเฮกเซน วิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ตัวอย่างละ 2 ชั่ว พบว่าสารสกัดช่อดอกกัญชาด้วยเอทานอล ให้ปริมาณสารเฉลี่ยของสารแคนนาบิไดออล แคนนาบิโนล และเตตราไฮโดรแคนนาบิโนล เท่ากับ 140.403,

13.759 และ 150.250 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (2.796, 0.274 และ 2.992% w/w) ตามลำดับ ซึ่งมากกว่าสารสกัดช่อดอกกัญชาด้วยเฮกเซน คือ มีค่าเท่ากับ 67.860, 11.962 และ 73.552 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (1.352, 0.238 และ 1.466% w/w) ตามลำดับ (Table 3)

**Table 3** The results showed cannabidiol, cannabinol and tetrahydrocannabinol contents in *Cannabis sativa* L. flowers ethanol extracts and hexane extracts

| Sample          | The concentration of CBD, CBN and THC are calculated from a linear equation of Calibration curve ( $\mu\text{g/mL}$ ) |        |         | Substances contents (% w/w) |       |       |
|-----------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|---------|-----------------------------|-------|-------|
|                 | CBD                                                                                                                   | CBN    | THC     | CBD                         | CBN   | THC   |
| Ethanol extract | 140.403                                                                                                               | 13.759 | 150.250 | 2.796                       | 0.274 | 2.992 |
| Hexane extracts | 67.860                                                                                                                | 11.962 | 73.552  | 1.352                       | 0.238 | 1.466 |

ดังนั้นในการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณแคนนาบิไดอล แคนนาบินอล และเตตราไฮโดรแคนนาบินอล ในช่อดอกกัญชา จึงเลือกใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลาย ในการสกัดช่อดอกกัญชา

## 1.2 การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการสกัด

การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการสกัด พบว่าสารละลายที่ได้จากการสกัดตัวอย่างช่อดอกกัญชา ซึ่งสกัดด้วยวิธีเดียวกันโดยการรียกกับเอทานอล แต่ระยะเวลาที่ใช้ในการสกัดแตกต่างกัน

เมื่อนำมาวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง พบว่าการสกัดด้วยระยะเวลา 30 นาที จะให้ปริมาณสารแคนนาบิไดอล แคนนาบินอล และเตตราไฮโดรแคนนาบินอล น้อยกว่าการสกัดด้วยระยะเวลา 60 และ 90 นาที ส่วนปริมาณสารแคนนาบิไดอล แคนนาบินอล และเตตราไฮโดรแคนนาบินอล ของการสกัดด้วยระยะเวลา 60 และ 90 นาที ไม่แตกต่างกัน (Table 4)

**Table 4** The results showed cannabidiol, cannabinol and tetrahydrocannabinol contents were extracted with ethanol at 30, 60 and 90 minutes

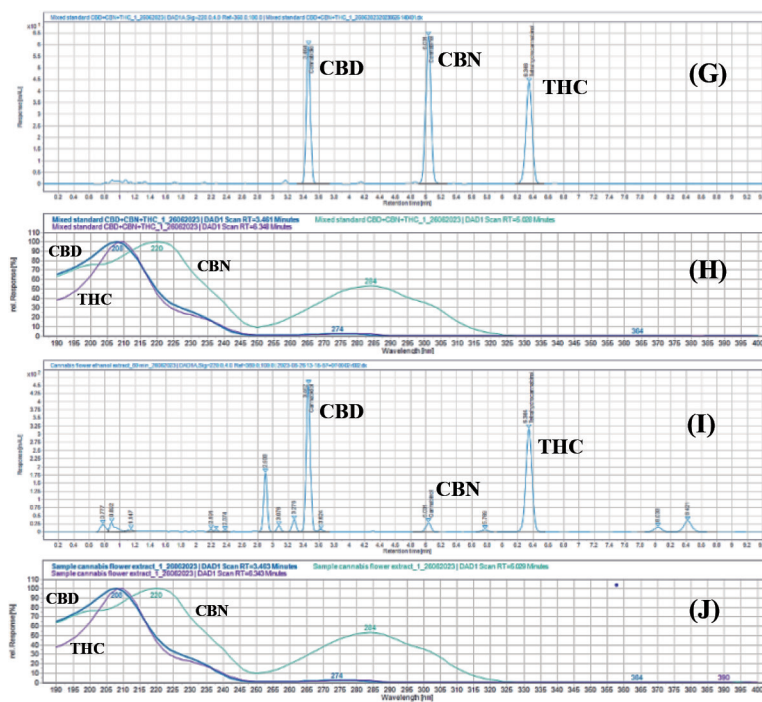
| Sample                   | Vial | The concentration of CBD, CBN and THC are calculated from a linear equation of Calibration curve ( $\mu\text{g/mL}$ ) |       |         | Substances contents (% w/w) |       |       |
|--------------------------|------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|---------|-----------------------------|-------|-------|
|                          |      | CBD                                                                                                                   | CBN   | THC     | CBD                         | CBN   | THC   |
| Ethanol extract (30 min) | 1    | 64.608                                                                                                                | 3.479 | 70.142  | 1.287                       | 0.069 | 1.397 |
| Ethanol extract (30 min) | 2    | 64.706                                                                                                                | 3.486 | 70.142  | 1.289                       | 0.069 | 1.397 |
| Ethanol extract (60 min) | 1    | 149.146                                                                                                               | 5.356 | 161.197 | 2.972                       | 0.107 | 3.212 |
| Ethanol extract (60 min) | 2    | 149.417                                                                                                               | 5.378 | 161.588 | 2.978                       | 0.107 | 3.220 |
| Ethanol extract (90 min) | 1    | 149.504                                                                                                               | 5.378 | 161.652 | 2.981                       | 0.107 | 3.223 |
| Ethanol extract (90 min) | 2    | 149.455                                                                                                               | 5.380 | 161.918 | 2.980                       | 0.107 | 3.228 |

ดังนั้นในการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณสารแคนนาบิไดอล แคนนาบินอล และเตตราไฮโดรแคนนาบินอลในช่อดอกกัญชา จึงเลือกใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลายในการสกัดและใช้เวลาในการสกัด 60 นาที

### 1.3 ความยาวคลื่นในการตรวจวัดสารแคนนาบิไดอล แคนนาบินอล และเตตราไฮโดรแคนนาบินอล

จากการศึกษาการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลตของแคนนาบิไดอล แคนนาบินอล และเตตราไฮโดร-

แคนนาบินอล พบว่า  $\lambda_{max}$  ของสารแคนนาบิไดอล และเตตราไฮโดรแคนนาบินอล มีค่าเท่ากับ 208 และ 274 นาโนเมตร ส่วน  $\lambda_{max}$  ของแคนนาบินอล มีค่าเท่ากับ 220 และ 284 นาโนเมตร และเมื่อวิเคราะห์สารละลายตัวอย่างช่อดอกกัญชาด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง โดยใช้ DAD เป็นเครื่องตรวจวัด ที่ความยาวคลื่น 220 นาโนเมตร ไม่พบการซ้อนทับของพีคของสารอื่น (Figure 4)



**Figure 4** UV spectrum of cannabidiol, cannabinol and tetrahydrocannabinol (H) in mixed standard solution of cannabidiol, cannabinol and tetrahydrocannabinol (G) compare with UV spectrum of cannabidiol, cannabinol and tetrahydrocannabinol (J) in *Cannabis sativa* L. flowers sample solution (I)

ดังนั้นในการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณสารแคนนาบิไดอล แคนนาบินอลและเตตราไฮโดรแคนนาบินอลในช่อดอกกัญชา จึงเลือกการตรวจวัดการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลต ที่ความยาวคลื่น 220 นาโนเมตร

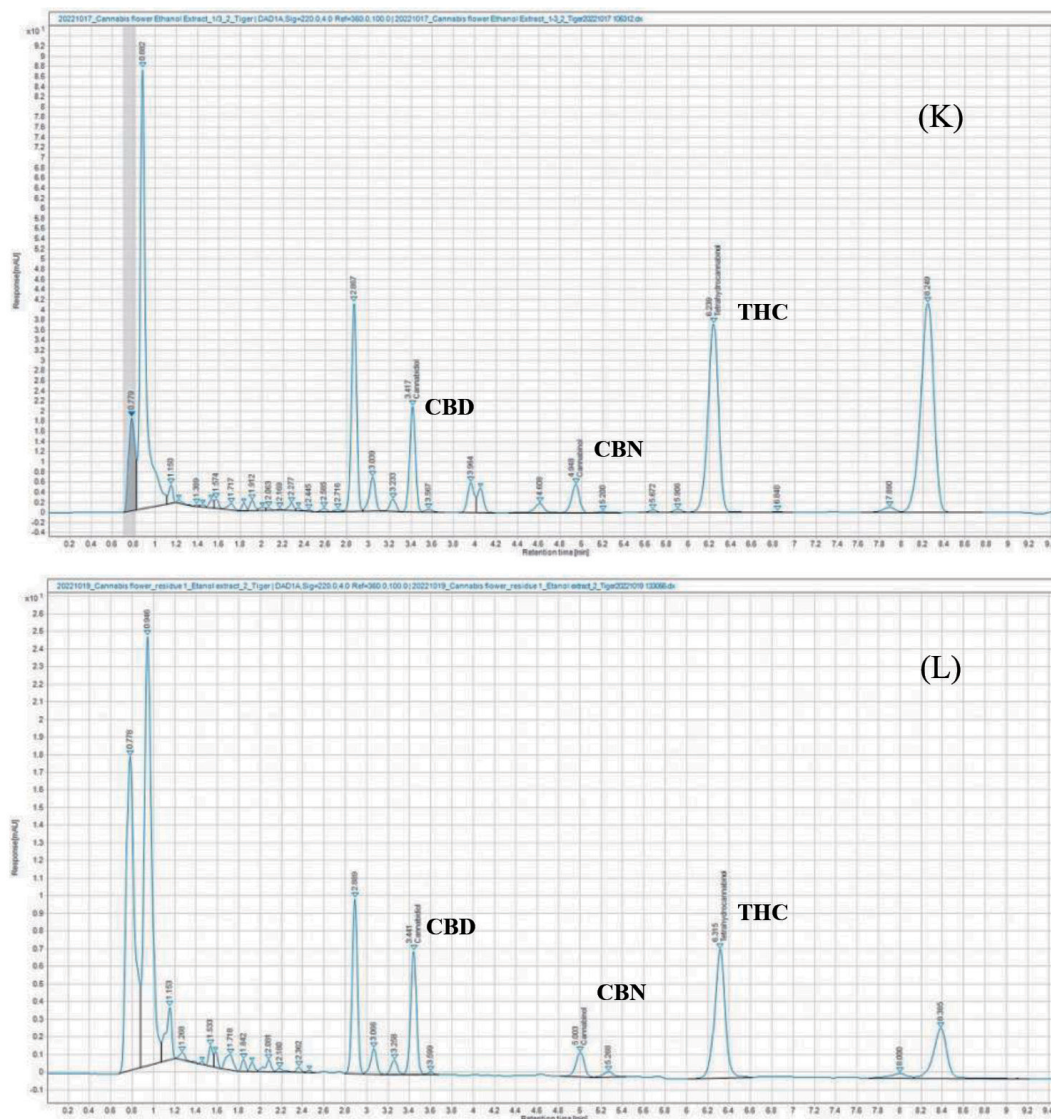
### 1.4 วัสดุภาคคงที่และวัสดุภาคเคลื่อนที่

วัสดุภาคคงที่ พบว่าเมื่อใช้ UHPLC column ชนิด ARC-18 (L), ขนาด  $4.6 \times 150$  มิลลิเมตร, ขนาดอนุภาค 2.7 ไมโครเมตร UHPLC chromatogram fingerprint ที่ได้ให้พีคของแคนนาบิไดอล แคนนา-



บินอล และเตตราไฮโดรแคนนาบินอล ที่ retention time 3.44, 5.00 และ 6.32 นาที ตามลำดับ ซึ่งมีการแยกจากสิ่งเจือปนอื่นอย่างชัดเจน แต่ UHPLC column ชนิด ARC-8 (K), ขนาด 2.1 × 100 มิลลิเมตร,

ขนาดอนุภาค 3.0 ไมโครเมตร ให้การแยกสารออกจากสิ่งเจือปนอื่นได้น้อยกว่า column ชนิด ARC-18 (Figure 5)

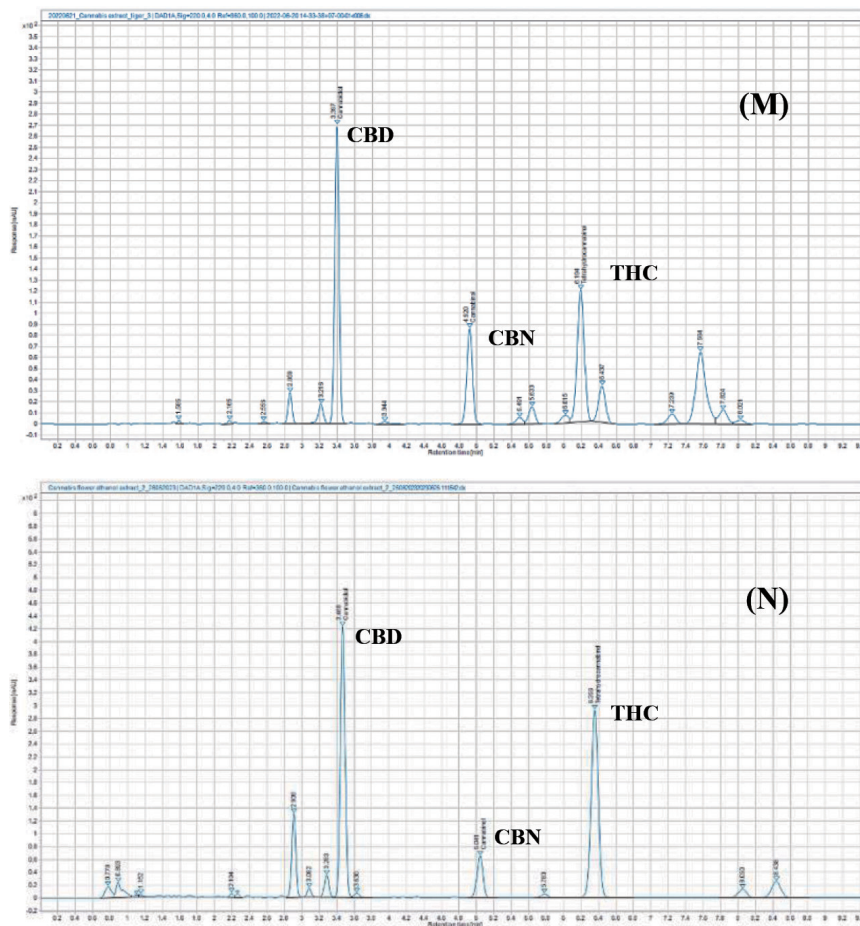


**Figure 5** The UHPLC chromatograms of the *Cannabis sativa* L. flowers sample solution using different stationary phases, where (K) represents the ARC-8 UHPLC column, and (L) represents the ARC-18 UHPLC column



วิฤภาคเคลื่อนที่พบว่าเมื่อปรับเปลี่ยนองค์ประกอบของวิฤภาคเคลื่อนที่จากน้ำและอะซิโตนไทรล์ (Figure 6M) เป็น 0.1% ออร์โทฟอสโฟริกแอซิด (0.1% ortho-phosphoric acid) ในน้ำ และ 0.1% ออร์โทฟอสโฟริกแอซิดในอะซิโตนไทรล์ (Figure 6N) retention time ของสารแคนนาบิไดอล แคนนา-

บินอล และเตตราไฮโดรแคนนาบินอล เปลี่ยนจาก 3.40, 4.92 และ 6.19 นาที เป็น 3.42, 5.00 และ 6.32 นาที จะได้ peak shape ของแคนนาบิไดอล แคนนาบินอล และเตตราไฮโดรแคนนาบินอลที่สมมาตร (symmetry) และแยกจากสิ่งเจือปนอื่นอย่างชัดเจน (Figure 6)



**Figure 6** Chromatographic fingerprint of the *Cannabis sativa* L. flowers sample solution was obtained using different mobile phases. (M) represents a mixture of water and acetonitrile, while (N) represents a combination of 0.1% ortho-phosphoric acid in water and 0.1% ortho-phosphoric acid in acetonitrile

ดังนั้นในการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณสาร แคนนาบิไดอล แคนนาบินอล และเตตราไฮโดรแคนนาบินอล ในช่อดอกกัญชาด้วยเครื่องโครมาโทกราฟี

ของเหลวสมรรถนะสูง จึงเลือกใช้ UHPLC column ชนิด ARC-18, ขนาด 4.6 × 150 มิลลิเมตร, ขนาดอนุภาค 2.7 ไมโครเมตร ใช้ 0.1%ออร์โทฟอสโฟริก

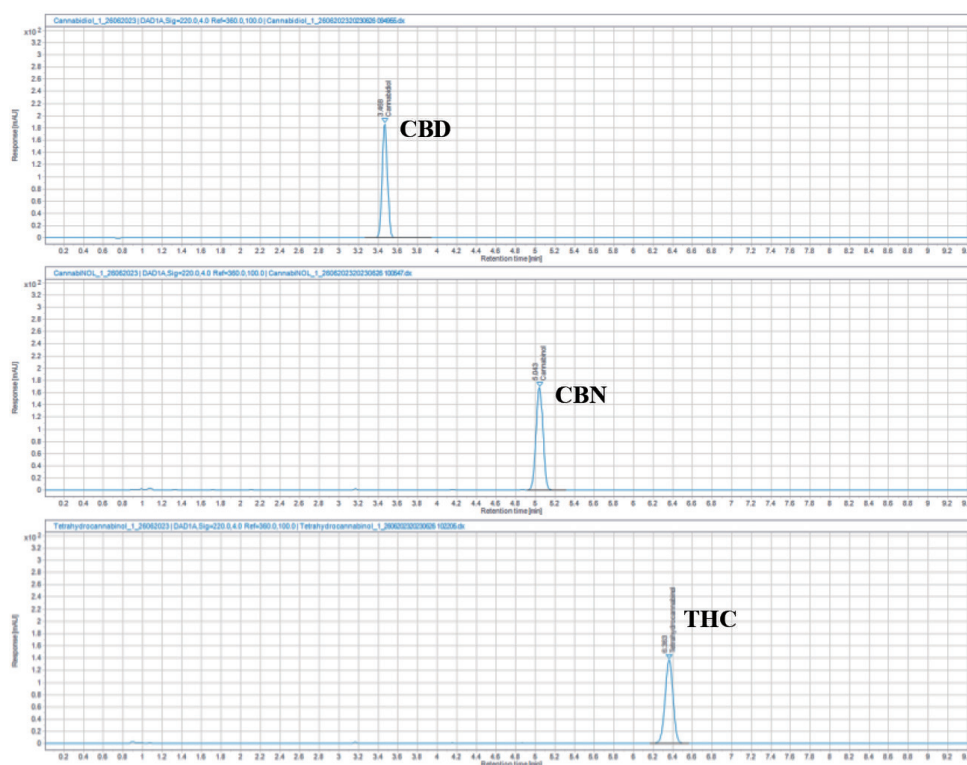
แอซิดในน้ำ และ 0.1% ออร์โทฟอสโฟริกแอซิดในอะซิโตนไทรล์เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ ตรวจวัดด้วย DAD ที่ความยาวคลื่น 220 นาโนเมตร

## 2. การทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (method validation)

### 2.1 การทดสอบความจำเพาะ (specificity)

จากการฉีดสารละลายสารมาตรฐาน พบว่าภาย

ใต้สภาวะ UHPLC ที่พัฒนาขึ้น สามารถแยกสารแคนนาบิไดออล แคนนาบินอล และเตตราไฮโดร-แคนนาบินอล ออกจากกันได้ และไม่มีการรบกวนของสารอื่น โดยมีค่า retention time เท่ากับ 3.46, 5.03 และ 6.34 นาที ตามลำดับ (Figure 7) และมีค่า peak purity ของสารละลายสารมาตรฐาน แคนนาบิไดออล แคนนาบินอล และเตตราไฮโดรแคนนาบินอล เท่ากับร้อยละ 96.74, 97.12 และ 96.44 ตามลำดับ



**Figure 7** Chromatographic fingerprint of standard solution of cannabidiol, cannabinol and tetrahydrocannabinol

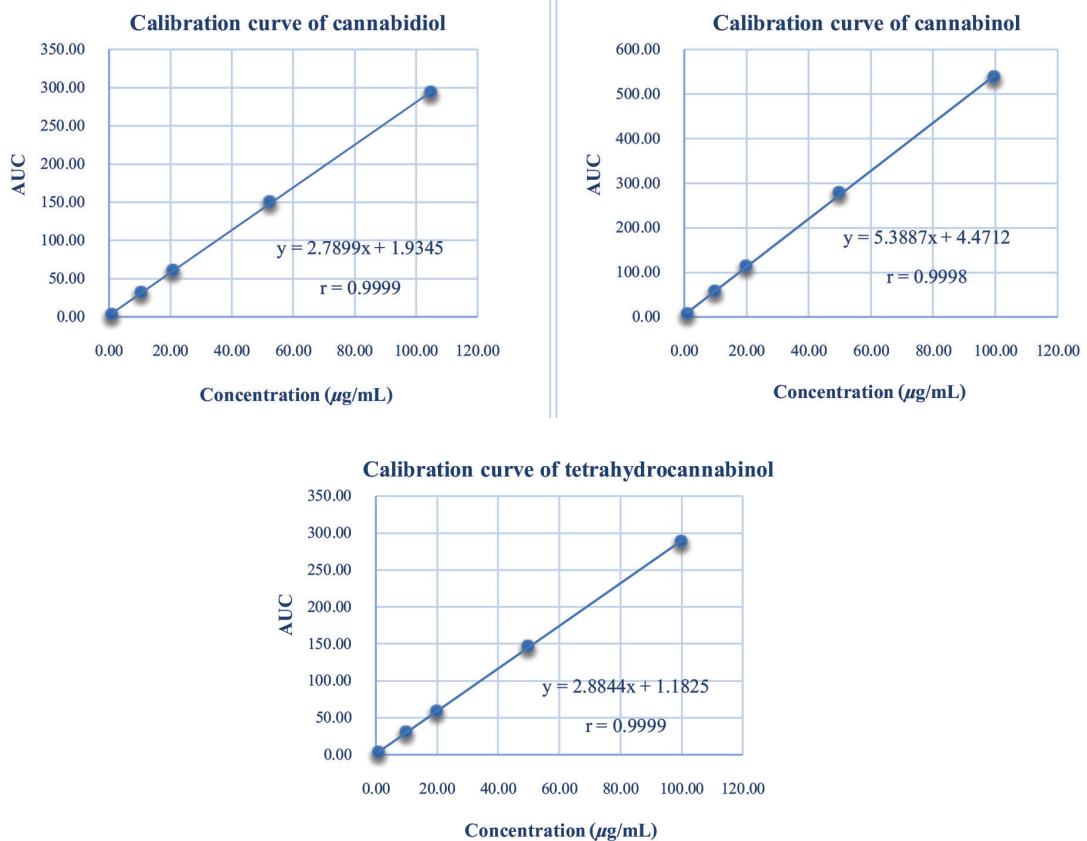
### 2.2 การทดสอบความเป็นเส้นตรงและช่วงการวิเคราะห์

จากกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของสารละลายสารมาตรฐานและพื้นที่ใต้พีค พบว่าความเข้มข้นของสารละลายสารมาตรฐานแคนนาบิไดออล

แคนนาบินอล และเตตราไฮโดรแคนนาบินอลกับพื้นที่ใต้พีคมีลักษณะเป็นเส้นตรง โดยสารมาตรฐานแคนนาบิไดออลมีลักษณะเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 1.05-104.90 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ เท่ากับ 0.9999 สารมาตรฐาน

แคนนาบินอล มีลักษณะเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 1.00-99.60 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ เท่ากับ 0.9998 และสารมาตรฐานเตตราไฮโดรแคนนาบินอลมีลักษณะเป็น

เส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 1.00-99.90 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ เท่ากับ 0.9999 (Figure 8)



**Figure 8** The calibration curve of cannabidiol, cannabinol and tetrahydrocannabinol standard intensity against peak area under the curve (AUC) concentration range of 1.00–104.90 µg/mL

### 2.3 การทดสอบร้อยละของการคืนกลับและความเที่ยง

เมื่อเติมสารละลายมาตรฐานแคนนาบิไดอล แคนนาบินอล และเตตราไฮโดรแคนนาบินอลที่มีความเข้มข้นระดับต่าง ๆ ในช่วงการใช้งาน 3 ระดับ ลงใน sample blank วิเคราะห์ sample blank

จำนวน 6 ซ้ำ และวิเคราะห์ spiked sample ระดับละ 3 ซ้ำ แต่ละซ้ำ วิเคราะห์ 2 ครั้ง ตามลำดับ การเตรียม spiked sample ให้มีความเข้มข้น 50, 100, 150% ของความเข้มข้นของแคนนาบิไดอล แคนนาบินอลที่ spiked ลงไปใน sample blank สามารถคำนวณได้เท่ากับร้อยละ 9.09, 16.67 และ 23.08 โดยน้ำหนัก

ตามลำดับ และเตตราไฮโดรแคนนาบินอล จำนวน  
ได้เท่ากับร้อยละ 9.09, 16.72 และ 23.15 โดยน้ำหนัก  
ตามลำดับ

จากการวิเคราะห์ตัวอย่าง spiked sample พบ

ว่าร้อยละของการคืนกลับของสารแคนนาบิไดออล  
แคนนาบินอล และเตตราไฮโดรแคนนาบินอลอยู่ใน  
ช่วงร้อยละ 98.99-99.87, 99.22-100.25 และ 99.32-  
100.39 ตามลำดับ (Table 5)

**Table 5** Results of percentage recovery and repeatability

| Analyzed<br>substances | Sample blank |         | Spiked level |         | n = 6                     |       |        |
|------------------------|--------------|---------|--------------|---------|---------------------------|-------|--------|
|                        | (µg/mL)      | (% w/w) | (%)          | (% w/w) | % Recovery<br>Mean ± S.D. | % RSD | HORRAT |
| CBD                    | 6.62         | 3.30    | 50           | 9.09    | 99.06 ± 1.71              | 1.72  | 1.31   |
|                        |              |         | 100          | 16.67   | 99.87 ± 0.10              | 0.10  | 0.12   |
|                        |              |         | 150          | 23.08   | 98.99 ± 0.16              | 0.16  | 0.24   |
| CBN                    | 2.77         | 1.38    | 50           | 9.09    | 99.22 ± 1.46              | 1.48  | 1.12   |
|                        |              |         | 100          | 16.67   | 100.25 ± 0.46             | 0.46  | 0.55   |
|                        |              |         | 150          | 23.08   | 99.74 ± 0.39              | 0.39  | 0.59   |
| THC                    | 6.68         | 3.33    | 50           | 9.09    | 99.89 ± 1.16              | 1.16  | 0.88   |
|                        |              |         | 100          | 16.72   | 99.32 ± 0.78              | 0.79  | 0.93   |
|                        |              |         | 150          | 23.15   | 100.39 ± 0.82             | 0.81  | 1.23   |

%Recovery acceptance criteria according to AOAC Peer-verified methods program on policies and procedures, Arlington, VA, USA (1998) is 95–105% and precision, assessed by HORRAT (< 2)

### การทดสอบความเที่ยง (precision)

Repeatability วิเคราะห์ปริมาณสารแคนนา-  
บิไดออล แคนนาบินอล และเตตราไฮโดรแคนนา-  
บินอลในตัวอย่างช่อดอกกัญชา พบว่ามีค่าเบี่ยงเบน  
มาตรฐานสัมพัทธ์(% RSD) เท่ากับ 0.42, 0.51 และ 0.32  
ตามลำดับ (Table 6)

การทดสอบ intermediate precision, between-day  
วิเคราะห์ปริมาณสารแคนนาบิไดออล แคนนาบินอล  
และเตตราไฮโดรแคนนาบินอลในตัวอย่างช่อดอก  
กัญชา พบว่ามีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ เท่ากับ  
0.89, 0.55 และ 0.33 ตามลำดับ (Table 6)

**Table 6** Results of repeatability and intermediate precision between-day

| Analyzed substances | % RSD            | % RSD                                 |
|---------------------|------------------|---------------------------------------|
|                     | of Repeatability | of intermediate precision between-day |
| CBD                 | 0.42             | 0.89                                  |
| CBN                 | 0.51             | 0.55                                  |
| THC                 | 0.32             | 0.33                                  |

**การทดสอบขีดจำกัดของการตรวจพบ (limit of detection, LOD) :** พบว่า LOD ของการวิเคราะห์แคนนาบิไดอล แคนนาบินอล และเตตราไฮโดรแคนนาบินอลเท่ากับร้อยละ 0.612, 0.872 และ 0.320 โดยน้ำหนัก ตามลำดับ

**การทดสอบขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (limit of quantitation, LOQ) :** พบว่า LOQ ของ

การวิเคราะห์แคนนาบิไดอล แคนนาบินอล และเตตราไฮโดรแคนนาบินอล เท่ากับร้อยละ 2.041, 2.908 และ 1.066 โดยน้ำหนัก ตามลำดับ โดยมีค่าร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์เท่ากับ 1.27, 0.90 และ 1.02 ตามลำดับ และร้อยละของการคืนกลับอยู่ในช่วงร้อยละ 96.30-99.63, 97.82-99.95 และ 97.65-100.33 ตามลำดับ (Table 7)

**Table 7** Results of the limit of quantitation (LOQ)

| Analyzed substances | Spiked sample (µg/mL) | LOQ (% w/w) | n = 6      |                        |       |
|---------------------|-----------------------|-------------|------------|------------------------|-------|
|                     |                       |             | % Recovery | % Recovery Mean ± S.D. | % RSD |
| CBD                 | 0.37                  | 2.041       | 99.08      | 98.01 ± 1.25           | 1.27  |
|                     |                       |             | 96.30      |                        |       |
|                     |                       |             | 97.27      |                        |       |
|                     |                       |             | 98.38      |                        |       |
|                     |                       |             | 97.41      |                        |       |
|                     |                       |             | 99.63      |                        |       |
| CBN                 | 0.53                  | 2.908       | 99.95      | 98.75 ± 0.89           | 0.90  |
|                     |                       |             | 97.82      |                        |       |
|                     |                       |             | 98.34      |                        |       |
|                     |                       |             | 98.83      |                        |       |
|                     |                       |             | 99.64      |                        |       |
|                     |                       |             | 97.92      |                        |       |
| THC                 | 0.19                  | 1.066       | 98.54      | 99.14 ± 1.01           | 1.02  |
|                     |                       |             | 99.61      |                        |       |
|                     |                       |             | 98.72      |                        |       |
|                     |                       |             | 97.65      |                        |       |
|                     |                       |             | 99.97      |                        |       |
|                     |                       |             | 100.33     |                        |       |

**การวิเคราะห์ปริมาณแคนนาบิไดอล แคนนาบินอลและเตตราไฮโดรแคนนาบินอลในช่อดอกกัญชา**

ผลการวิเคราะห์ปริมาณแคนนาบิไดอล แคนนาบินอล และเตตราไฮโดรแคนนาบินอลในตัวอย่างช่อ

ดอกกัญชา จำนวน 12 ตัวอย่าง (Table 8) พบว่าช่อดอกกัญชาสายพันธุ์ตะนาวศรีก้านแดงอาร์ดี1 (RD1) ต้นที่ 1 ให้ปริมาณสารแคนนาบิไดอลสูงที่สุดเท่ากับ 118.847 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (ร้อยละ 59.03 โดยน้ำหนัก) และต้นที่ 4 ให้ปริมาณสารแคนนาบินอลสูงที่สุด

เท่ากับ 34.515 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (ร้อยละ 17.18 โดยน้ำหนัก) และช่อดอกกัญชาสายพันธุ์ทางเสื  
สกลนครที่ 1 (TT1) ต้นที่ 4 ให้ปริมาณสารเตตราไฮ-

โดรแคนนาบินอยด์สูงสุดเท่ากับ 199.907 ไมโครกรัม/  
มิลลิลิตร (ร้อยละ 49.73 โดยน้ำหนัก) (Table 8)

**Table 8** The results showed cannabidiol, cannabinol and tetrahydrocannabinol contents in dried *Cannabis sativa* L. flowers sample by Ultra High Performance Liquid Chromatography technique

| Sample | Breed        | Sample weight (g) | The concentration of CBD, CBN and THC are calculated from a linear equation of Calibration curve ( $\mu\text{g/mL}$ ) |        |         | Substances contents (% w/w) |       |       |
|--------|--------------|-------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|---------|-----------------------------|-------|-------|
|        |              |                   | CBD                                                                                                                   | CBN    | THC     | CBD                         | CBN   | THC   |
| 1      | RD1 (Tree 1) | 0.5013            | 118.847                                                                                                               | 3.151  | 39.283  | 59.03                       | < LOQ | 34.73 |
| 2      | RD1 (Tree 2) | 0.5006            | 50.331                                                                                                                | 3.732  | 162.249 | 25.14                       | < LOQ | 40.51 |
| 3      | ST1 (Tree 2) | 0.5034            | -                                                                                                                     | 6.045  | 144.474 | -                           | 3.00  | 35.87 |
| 4      | ST1 (Tree 3) | 0.5032            | -                                                                                                                     | 7.224  | 111.810 | -                           | 3.59  | 27.77 |
| 5      | ST1 (Tree 4) | 0.5024            | -                                                                                                                     | 34.515 | 165.174 | -                           | 17.18 | 41.10 |
| 6      | ST1 (Tree 5) | 0.5045            | -                                                                                                                     | 13.456 | 143.200 | -                           | 6.67  | 35.48 |
| 7      | TT1 (Tree 1) | 0.5033            | -                                                                                                                     | 18.958 | 162.325 | -                           | 9.42  | 40.32 |
| 8      | TT1 (Tree 2) | 0.5019            | -                                                                                                                     | 5.532  | 151.639 | -                           | < LOQ | 37.77 |
| 9      | TT1 (Tree 3) | 0.5045            | -                                                                                                                     | 3.984  | 191.314 | -                           | < LOQ | 47.40 |
| 10     | TT1 (Tree 4) | 0.5025            | -                                                                                                                     | 11.565 | 199.907 | -                           | 5.75  | 49.73 |
| 11     | TT1 (Tree 5) | 0.5035            | -                                                                                                                     | 11.321 | 147.553 | -                           | 5.62  | 36.63 |
| 12     | WA1          | 0.5036            | 35.735                                                                                                                | 10.793 | 58.351  | 17.74                       | 5.36  | 39.31 |

## อภิปรายผล

กัญชาเป็นสมุนไพรที่มีศักยภาพเชิงพาณิชย์ และมีประโยชน์ทั้งเป็นยาและเป็นผลิตภัณฑ์สุขภาพ สามารถนำมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ เช่น ผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง มีรายงานการศึกษาทางวิทยาศาสตร์ทางด้านเคมี เภสัชวิทยาและพิษวิทยามากมายที่สนับสนุนการใช้ แต่การพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์นั้น ปัจจัยที่สำคัญที่ควรคำนึงถึงคือปัจจัยด้านคุณภาพของสมุนไพรเนื่องจากกัญชามีสารสำคัญกลุ่มแคนนาบินอยด์ คือ แคนนาบิไดออล แคนนา-

บินอยด์ และเตตราไฮโดรแคนนาบินอยด์ที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา ในการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณสารแคนนาบินอยด์ ในวัตถุดิบช่อดอกกัญชา พบว่าเมื่อนำตัวอย่างเข้าสู่ระบบโครมาโทกราฟีของเครื่อง Ultra High Performance Liquid Chromatography (UHPLC) ใช้คอลัมน์ชนิด ARC-18, ขนาด 4.6 × 150 มิลลิเมตร, ขนาดอนุภาค 2.7 ไมโครเมตร และใช้ 0.1% ออร์โทฟอสโฟริกแอซิดในน้ำ และ 0.1% ออร์โทฟอสโฟริกแอซิดในอะซิโตนไทรล์ เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ ตรวจวัดด้วย DAD ที่ความยาวคลื่น 220



นาโนเมตร จะปรากฏพีคของแคนนาบิไดอล แคนนาบิโนล และเตตราไฮโดรแคนนาบิโนลที่ retention time เท่ากับ 3.46, 5.03 และ 6.34 นาที ตามลำดับ ผลการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ดังกล่าว พบว่า calibration curve มีความเป็นเส้นตรง โดยสารมาตรฐานแคนนาบิไดอลมีลักษณะเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 1.05-104.90 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ เท่ากับ 0.9999 สารมาตรฐานแคนนาบิโนลมีลักษณะเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 1.00-99.60 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ เท่ากับ 0.9997 และสารมาตรฐานเตตราไฮโดรแคนนาบิโนลมีลักษณะเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 1.00-99.90 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ เท่ากับ 0.9999 ค่าร้อยละของการคืนกลับอยู่ในช่วง 95-105% ค่า HORRAT < 2 ชี้วัดจำกัดของการตรวจพบของการวิเคราะห์แคนนาบิไดอล แคนนาบิโนล และเตตราไฮโดรแคนนาบิโนลเท่ากับร้อยละ 0.612, 0.872 และ 0.320 โดยน้ำหนัก ตามลำดับ ชี้วัดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณของการวิเคราะห์แคนนาบิไดอล แคนนาบิโนล และเตตราไฮโดรแคนนาบิโนลเท่ากับร้อยละ 2.041, 2.908 และ 1.066 โดยน้ำหนัก ตามลำดับ โดยมีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ เท่ากับ 1.27, 0.90 และ 1.02 ตามลำดับ และร้อยละของการคืนกลับอยู่ในช่วงร้อยละ 95-105% ปริมาณสารแคนนาบิไดอล แคนนาบิโนล และเตตราไฮโดรแคนนาบิโนลในตัวอย่างวัตถุดิบช่อดอกกัญชา จำนวน 12 ตัวอย่าง สามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นแต่ยังไม่สามารถสรุปปริมาณที่ชัดเจนได้ เนื่องจากตัวอย่างน้อยเกินไปในการศึกษานี้ได้ตรวจปริมาณสารแคนนาบิโนอยด์ของตัวอย่างช่อดอกกัญชาของกัญชาพันธุ์ไทย 4 สายพันธุ์ ซึ่งปริมาณของแคนนาบิโนลจะแปรผันตามปริมาณสารเตตรา-

ไฮโดรแคนนาบิโนลที่สูงขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยที่พบว่าสารแคนนาบิโนลจะเป็นผลผลิตที่ได้จากสารเตตราไฮโดรแคนนาบิโนลในช่วงของการ decarboxylation ระหว่างการอบแห้งผ่านความร้อน ซึ่งถ้าหากมีปริมาณเตตราไฮโดรแคนนาบิโนลที่สูง ปริมาณของแคนนาบิโนล จะสูงไปด้วย<sup>[9-10]</sup> ส่วนปริมาณสารแคนนาบิไดอล พบมากเพียง 2 สายพันธุ์ คือ ตะนาวศรีก้านขาวดับเบิลยูเอ1 และตะนาวศรีก้านแดงอาร์ดี1 จากข้อมูลสามารถนำช่อดอกกัญชาพันธุ์ไทยในแต่ละพันธุ์ไปใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ได้อย่างเหมาะสม รวมถึงเป็นข้อมูลในการพัฒนาพันธุ์กัญชาเพื่อเพิ่มมูลค่าของกัญชาทางเศรษฐกิจต่อไป

UHPLC เป็น High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ที่มีการพัฒนาเพื่อให้มีประสิทธิภาพการแยกสาร ความไวในการแยกสารที่ดีขึ้น ใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ที่น้อยลง และลดระยะเวลาในการตรวจวิเคราะห์ เมื่อนำวิธีวิเคราะห์ปริมาณสารแคนนาบิไดอล แคนนาบิโนล และเตตราไฮโดรแคนนาบิโนล ในช่อดอกกัญชาด้วยวิธี UHPLC ที่พัฒนาขึ้นมาใหม่เปรียบเทียบกับ การหาปริมาณสารแคนนาบิไดอล แคนนาบิโนล และเตตราไฮโดรแคนนาบิโนลในกัญชาด้วยวิธี HPLC/UV<sup>[6]</sup> และวิธี HPLC-DAD<sup>[7]</sup> พบว่าวิธี HPLC/UV ใช้เวลาวิเคราะห์ตัวอย่างกัญชาต่อ 1 ตัวอย่าง นาน 22 นาที ใช้ flow rate 1.5 มิลลิลิตร/นาที และวิธี HPLC-DAD ใช้เวลาวิเคราะห์ตัวอย่างกัญชาต่อ 1 ตัวอย่าง นาน 50 นาที ใช้ flow rate 1.0 มิลลิลิตร/นาที ทำให้สิ้นเปลืองวัฏภาคเคลื่อนที่ ส่วนวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นมาใหม่ใช้เวลาวิเคราะห์ตัวอย่างกัญชาต่อ 1 ตัวอย่าง นาน 10 นาที ใช้ flow rate 1.5 มิลลิลิตร/นาที ซึ่งรวดเร็วและประหยัดวัฏภาคเคลื่อนที่ ดังนั้นจึงเลือกใช้เครื่อง UHPLC ในการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณแคนนา-

บิตอล แคนนาบิโนล และเตตราไฮโดรแคนนาบิโนล ในช่อดอกกัญชา และจากการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ปริมาณแคนนาบิตอล แคนนาบิโนล และเตตราไฮโดรแคนนาบิโนล ที่พัฒนาขึ้น พบว่า ค่าร้อยละของการคืนกลับจากการวิเคราะห์ spiked sample อยู่ในเกณฑ์ยอมรับ (95-105%) ซึ่งแสดงถึงความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ และค่า HORRAT อยู่ในเกณฑ์ยอมรับ (< 2) ซึ่งแสดงถึงความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้น วิธีดังกล่าวจึงมีความเหมาะสม สามารถนำไปใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณสารแคนนาบิตอล แคนนาบิโนล และเตตราไฮโดรแคนนาบิโนล เพื่อใช้ควบคุมปริมาณสารของช่อดอกกัญชาต่อไปได้ ในเบื้องต้นสามารถนำวิธีที่พัฒนาขึ้นนี้ตรวจวิเคราะห์วัตถุดิบจากแหล่งปลูกต่าง ๆ เพื่อให้มีข้อมูลหลากหลายเป็นประโยชน์ต่อการพัฒนาคุณภาพพันธุ์ไทยต่อไป

### ข้อสรุป

การศึกษานี้ได้พัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์ปริมาณแคนนาบิโนลในช่อดอกกัญชาด้วยวิธี UHPLC และทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ ผลการศึกษาพบว่าวิธีที่พัฒนาขึ้น มีความถูกต้อง แม่นยำ สะดวก รวดเร็ว และประหยัดสารเคมีที่ใช้ในวัฏภาคเคลื่อนที่ จึงสามารถนำวิธีที่ได้มาตรวจสอบปริมาณแคนนาบิโนลในตัวอย่ช่อดอกกัญชาไทย 4 สายพันธุ์ ทำให้ได้ข้อมูลซึ่งเป็นประโยชน์ต่อการพัฒนาพันธุ์กัญชา และผลิตภัณฑ์ผสมกัญชาต่อไป

### กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ที่สนับสนุนงบประมาณในการศึกษานี้ ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ห้องปฏิบัติการพิษวิทยาพิษ

และเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการวิจัยเพื่อแยกสารสำคัญจากสมุนไพรทุกท่าน ที่ทำให้การศึกษานี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

### References

1. Boonyaprapat N, Chokchaicharoenporn O. Medicinal plants indigenous to Thailand. Bangkok: Prachachon; 1999. 3(1): p. 693. (in Thai)
2. Mechoulam R, Hanuš LO, Pertwee R, Howlett AC. Early phytocannabinoid chemistry to endocannabinoids and beyond. *Nature Reviews Neuroscience*. 2014;15:757.
3. Velasco G, Sánchez C, Guzmán M. Towards the use of cannabinoids as antitumour agents. *Nature Reviews Cancer*. 2012;12:436.
4. Office for the Management of Cannabis and Kratom in Thai Traditional Medicine. Infographic 16 recipes of traditional Thai medicine containing cannabis [Internet]. 2021; [cited 2021 July 2]; [1 screen]. Available from: <https://ockt.dtam.moph.go.th/index.php/cannabis-formula/200-infographic-16>
5. Radapong S, Suppajariyawat P, Phadungkit M. Pharmacological and toxicological effects of cannabis. *The Bulletin of the Department of Medical Sciences*. 2021;63(1):221-4. (in Thai)
6. Veniero G, Lucia D, Fiorenza F, Rino F, Elisa S, Giovanna T. Determination of primary active constituents in cannabis preparations by high-resolution gas chromatography/flame ionization detection and high-performance liquid chromatography/UV detection. *Analytica Chimica Acta*. 2002;468:245-54.
7. Laura A. Ciolino, Tracy L. Ranieri, Allison M. Taylor. Commercial cannabis consumer products part 2: HPLC-DAD quantitative analysis of cannabis cannabinoids. *Forensic Science International*. 2018;289:438-47.
8. Department of Medical Science. Practical guidelines for testing the accuracy of chemical analysis methods in the single laboratory setting. Nonthaburi: Department of Medical Science; 2006.
9. Hazekamp A, Fieschedick JT, Llano Díez M, Lubbe A, Ruhaak RL. Chemistry of cannabis. *Comprehensive Natural Products II*. 2010;3:1033-84.
10. Russo EB, Marcu J. Chapter Three - Cannabis Pharmacology: The Usual Suspects and a Few Promising Leads. *Advances in Pharmacology*. 2017; 80: 67-134.