

การผลิตสารมาตรฐาน Delta-9-tetrahydrocannabinol จากกัญชา

เมทินี หลิมศิริวงษ์*, อมร สหเมธาพัฒน์, นนธวัฒน์ พ่อเสือ, ปิติกาญจน์ กาญจนพาฤกษ์,
นวนิตย์ ธนสีลังกูร

สำนักยาและวัตถุเสพติด กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ ตำบลตลาดขวัญ อำเภอเมือง จังหวัดนนทบุรี 11000

* ผู้รับผิดชอบบทความ: maytinee.l@dmsc.mail.go.th

บทคัดย่อ

บทนำและวัตถุประสงค์: ตามนโยบายกัญชาของประเทศไทย ซึ่งอนุญาตให้มีการใช้ประโยชน์กัญชาทางการแพทย์ ส่งผลให้เกิดการผลิตและการวิจัยผลิตภัณฑ์จากกัญชาอย่างแพร่หลาย การควบคุมคุณภาพสารสกัดและผลิตภัณฑ์จากกัญชาให้มีมาตรฐาน ปลอดภัย และสอดคล้องกับกฎหมายนั้น จำเป็นต้องใช้สารมาตรฐาน Delta-9-tetrahydrocannabinol (delta-9-THC) มาเปรียบเทียบกับในการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญ สำนักยาและวัตถุเสพติด กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ จึงได้ดำเนินการผลิตสารมาตรฐานกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ delta-9-THC (delta-9-tetrahydrocannabinol DMSc reference standard) ขึ้นเพื่อรองรับนโยบายของประเทศและลดการนำเข้าสารมาตรฐานจากต่างประเทศที่มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง

วิธีการศึกษา: การสกัดและแยกสาร delta-9-THC จากช่อดอกของพืชกัญชาใช้เทคนิค supercritical fluid extraction (SFE) ด้วยสัดส่วนของ carbon dioxide และ ethanol ที่เหมาะสม จากนั้นนำสารสกัดมาแยกให้ได้ delta-9-THC ที่บริสุทธิ์สูงด้วย supercritical fluid chromatograph (SFC) ตรวจยืนยันเอกลักษณ์ของ delta-9-THC ด้วย IR spectroscopy, mass spectroscopy และ ¹H-NMR spectroscopy รวมถึงตรวจวิเคราะห์ความบริสุทธิ์ด้วย high performance liquid chromatography (HPLC) ก่อนนำไปผลิตเป็นสารมาตรฐานกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

ผลการศึกษา: การสกัดช่อดอกกัญชาด้วย SFE โดยใช้สัดส่วน carbon dioxide กับ ethanol 95:5 ทำให้ได้ cannabinoids-rich extract ซึ่งเมื่อนำมาแยกด้วย SFC จะได้ delta-9-THC ที่มีค่าความบริสุทธิ์เท่ากับร้อยละ 99.4 เมื่อคำนวณในสถานะปกติ และมีค่าร้อยละของผลผลิตเท่ากับ 0.6 เมื่อนำ delta-9-THC มาผลิตเป็นสารมาตรฐานกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ในรูปแบบสารละลายใน methanol ภายใต้มาตรฐานการผลิตวัสดุอ้างอิง ISO 17034:2016 สารมาตรฐานมีความคงสภาพเมื่อเก็บรักษาในอุณหภูมิ 2-8 °C เป็นเวลา 3 ปี มีความเป็นเนื้อเดียวกันตลอดรุ่นการผลิต และสามารถกำหนดความเข้มข้นมาตรฐานพร้อมค่าความไม่แน่นอนเท่ากับ 0.9303 ± 0.0792 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

อภิปรายผล: การสกัดและแยกสารโดยใช้ SFE และ SFC ภายใต้สภาวะที่ได้พัฒนาขึ้น สามารถแยกสาร delta-9-THC จาก cannabinoids อื่นได้อย่างเฉพาะเจาะจง และมีประสิทธิภาพในการแยกสารให้บริสุทธิ์ได้มากกว่าร้อยละ 99 โดยวิธีนี้มีผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมและสุขภาพน้อยกว่าการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์

ข้อสรุปและข้อเสนอแนะ: สารมาตรฐานที่ผลิตขึ้นนี้สามารถนำไปใช้ในการตรวจวิเคราะห์ปริมาณ delta-

9-THC ในพืช สารสกัด และผลิตภัณฑ์จากกัญชา เพื่อประกันคุณภาพผลิตภัณฑ์จากกัญชาทางการแพทย์ที่ผลิตและใช้ในประเทศ รวมถึงการใช้ในงานวิจัย การทดสอบฤทธิ์ ความเป็นพิษ และการกำหนดขนาดสารสำคัญในผลิตภัณฑ์เพื่อใช้ในการทางการแพทย์ในอนาคต

คำสำคัญ: delta-9-tetrahydrocannabinol, SFE, SFC, กัญชา, สารมาตรฐาน

Production of Delta-9-Tetrahydrocannabinol Reference Standard from *Cannabis sativa* L.

Maytinee Limsiriwong*, Amorn Sahamethapat, Nonthawat Phosua, Pitikan Kanjanapruk, Nawanit Thanaseelungkoon

Bureau of Drug and Narcotic, Department of Medical Sciences, Tiwanont Road, Talat Khwan Subdistrict, Mueang District, Nonthaburi 11000, Thailand

*Corresponding author: maytinee.l@dmsc.mail.go.th

Abstract

Introduction and Objectives: Thailand's cannabis policy, which permits the medical use of cannabis, has led to increased production and research of cannabis-derived products. Ensuring the quality control of cannabis extracts and products to meet safety standards and legal requirements necessitates the use of a standard substance, delta-9-tetrahydrocannabinol (delta-9-THC), for comparative analysis in quantifying active compounds. The Bureau of Drug and Narcotic, Department of Medical Sciences, has undertaken the production of delta-9-THC reference standard to support national policy and reduce the ongoing reliance on imported reference standards.

Methods: Delta-9-THC was extracted and isolated from the inflorescence of cannabis using supercritical fluid extraction (SFE) with a suitable ratio of carbon dioxide to ethanol. The resulting extract was further purified using supercritical fluid chromatography (SFC) to obtaining delta-9-THC. The identity of the compound was confirmed through IR spectroscopy, mass spectrometry, and ¹H-NMR spectroscopy, and purity was analyzed using high-performance liquid chromatography (HPLC) prior to its establishing as a Department of Medical Sciences reference standard.

Results: The application of SFE with a carbon dioxide to ethanol ratio of 95:5 suitably produced a cannabinoids-rich extract. Subsequent purification of cannabinoids-rich extract via SFC achieved delta-9-THC with 99.4% purity, calculated on the as is basis, obtaining a yield of 0.6%. The produced delta-9-THC reference substance, formulated in methanol solution, adhered to ISO 17034:2016 standards for reference material production. Stability assessments indicated that the substance maintained its integrity when stored at 2–8 °C over a three-year period. The homogeneity studies demonstrating uniformity throughout production batch. The certified concentration with associated uncertainty of the standard was determined to be 0.9303 ± 0.0792 mg/mL.

Discussion: The use of SFE and SFC under developed conditions enabled the selective isolation of delta-9-THC from other cannabinoids, achieving > 99% purity. This method presents minimal environmental and health impacts compared to traditional organic solvents.

Conclusion and Recommendations: The produced standard substance can be utilized for analyzing delta-9-THC amounts in cannabis plants, extracts, and products, ensuring the quality of domestically produced medical cannabis products. Furthermore, it serves as a resource for research, efficacy testing, toxicity assessment, and the determination of active ingredient dosages in future medical applications..

Key words: delta-9-tetrahydrocannabinol, SFE, SFC, *Cannabis sativa* L, reference standard

บทนำและวัตถุประสงค์

กัญชา *Cannabis sativa* L. ssp. indica เป็นพืชที่มีถิ่นกำเนิดอยู่ในทวีปเอเชียกลางและได้แพร่กระจายไปทั่วโลก^[1] เดิมถูกจัดเป็นยาเสพติดให้โทษในประเภท 5 ตามพระราชบัญญัติยาเสพติดให้โทษ พ.ศ. 2522^[2] มีสารสำคัญ ได้แก่ สาร delta-9-tetrahydrocannabinol (delta-9-THC) เป็นยาเสพติด (ยส.5) และสาร cannabidiol (CBD) เป็นวัตถุออกฤทธิ์ต่อจิตและประสาท (วจ.2) มีการใช้พืชกัญชาในตำรับยากัญชาทางการแพทย์แผนไทย (ส่วนที่ไม่เป็นยาเสพติดให้โทษ) ประกอบด้วยตำรับยา 17 ตำรับ เป็นตำรับยาจากตำรับยาแผนไทยของชาติ 12 ตำรับ แบ่งตามกลุ่มอาการได้ 7 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มอาการนอนไม่หลับ กลุ่มอาการทางเดินอาหาร กลุ่มอาการกล้ามเนื้อและกระดูก กลุ่มอาการทางระบบผิวหนัง กลุ่มอาการทางระบบทางเดินปัสสาวะ กลุ่มอาการในบริเวณช่องปาก และกลุ่มอื่น ๆ และเป็นตำรับยาที่ประยุกต์จากตำรับยาการแพทย์แผนไทย 5 ตำรับ^[3] ในปี พ.ศ. 2562 รัฐบาลได้มีนโยบายให้นำกัญชาไปใช้ในการแพทย์ จึงมีการออกพระราชบัญญัติยาเสพติดให้โทษ (ฉบับที่ 7) พ.ศ. 2562^[4] อนุญาตให้สามารถนำกัญชาไปใช้ในการแพทย์ได้โดยมีวัตถุประสงค์ให้มีการนำพืชกัญชาไปทำการวิจัยเพื่อศึกษาฤทธิ์ของสารสำคัญในกัญชา เพื่อนำไปใช้ในการแพทย์ทั้งแผนโบราณและแผนปัจจุบัน และเป็นการเปิดโอกาสให้ประชาชนสามารถนำพืชกัญชาไปใช้ประโยชน์ในการรักษาโรคตามตำรับแพทย์พื้นบ้านได้ รวมทั้งกำหนดกฎเกณฑ์การขอรับใบอนุญาตผลิต จำหน่ายหรือมีไว้ในครอบครองซึ่งยาเสพติดเพื่อใช้ในการแพทย์จากนโยบายและการอนุญาตดังกล่าวทำให้มีผู้ผลิตและวิจัยผลิตภัณฑ์จากกัญชาเพื่อใช้ในการแพทย์ออกมาเป็นจำนวนมาก เช่น น้ำมันกัญชา เป็นต้น

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์เป็นห้องปฏิบัติการตรวจพิสูจน์ของภาครัฐและเป็นหน่วยงานคุ้มครองผู้บริโภคจึงได้ดำเนินการควบคุมคุณภาพผลิตภัณฑ์กัญชา เพื่อให้เป็นไปตามกฎหมาย ผู้บริโภคมั่นใจในความปลอดภัยและคุณภาพผลิตภัณฑ์กัญชาที่ผลิตมาใช้ในการทางการแพทย์ ดำเนินการตรวจวิเคราะห์ปริมาณสาร delta-9-THC และสาร CBD ตามหลักเกณฑ์ที่คณะกรรมการควบคุมยาเสพติดให้โทษประกาศกำหนด โดยใช้วิธีวิเคราะห์มาตรฐานต่าง ๆ ซึ่งมีหลายวิธี ได้แก่ การตรวจพิสูจน์พืชกัญชาตาม UNODC^[5] การควบคุมคุณภาพผลิตภัณฑ์กัญชาตามตำรายาสมุนไพรของสหรัฐอเมริกาฉบับที่ 2014 (AHP2014)^[6] รวมทั้งวิธีวิเคราะห์มาตรฐานที่หน่วยงานภายในกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์พัฒนาขึ้น โดยเป็นการวิเคราะห์ด้วยวิธี High Performance Liquid Chromatography (HPLC) และวิธี Gas Chromatography (GC) ซึ่งต้องใช้สารมาตรฐาน delta-9-THC และ CBD เป็นตัวเปรียบเทียบเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณสารดังกล่าวในผลิตภัณฑ์ สารมาตรฐานทั้งสองชนิดนี้ต้องสั่งซื้อจากต่างประเทศซึ่งมีราคาค่อนข้างสูง ในแต่ละปีกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ต้องใช้งบประมาณในการซื้อสารมาตรฐานหลายล้านบาทและเพิ่มขึ้นตามปริมาณงานควบคุมคุณภาพผลิตภัณฑ์กัญชาที่มีแนวโน้มมีการใช้ในประเทศเพิ่มมากขึ้น ศูนย์สารมาตรฐานยาและวัตถุเสพติด สำนักยาและวัตถุเสพติด จึงมีแนวคิดในการผลิตสารมาตรฐานกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ delta-9-THC เพื่อลดงบประมาณการนำเข้าสารมาตรฐานจากต่างประเทศ โดยพัฒนาวิธีการสกัดสาร delta-9-THC จากช่อดอกของกัญชา ด้วยเครื่องสกัดสาร supercritical fluid extraction (SFE) แล้วนำสารสกัดที่ได้นั้นมาแยกและทำให้บริสุทธิ์โดยเครื่อง supercritical fluid

chromatograph (SFC) ให้ได้วัตถุดิบ delta-9-THC ที่มีปริมาณและบริสุทธิ์มากพอ จึงนำมาผลิตเป็นสารมาตรฐานกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ delta-9-THC ตามมาตรฐานการผลิตวัตถุอ้างอิง ISO 17034: 2016 การสกัดสารโดยใช้เทคนิค SFE^[7] เป็นการสกัดสารโดยใช้ก๊าซที่มีความเป็นขั้วต่ำ อยู่ในสถานะปิดที่อุณหภูมิและความดันในสภาวะวิกฤตยิ่งยวด (super-critical state) ก๊าซจะกลายเป็นตัวทำละลายที่อยู่ในสถานะของไหลวิกฤตยิ่งยวด (supercritical fluid) มีสถานะเป็นทั้งก๊าซและของเหลวแยกกันไม่ออก มีความสามารถในการแพร่กระจายของก๊าซและความสามารถในการละลายของของเหลว เมื่อผสมกับตัวทำละลายร่วม (co-solvent) ได้แก่ ตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีความเป็นขั้วสูงกว่า ในอัตราส่วนที่เหมาะสม จะทำให้สามารถกระจายตัวและแทรกซึมจึงสกัดสารออกจากพืชได้ดีกว่าตัวทำละลายในสภาวะปกติ ในการสกัดสารจากพืชกัญชาครั้งนี้ใช้ก๊าซ carbon dioxide และ ethanol เป็นตัวทำละลายร่วมในสัดส่วนและสภาวะที่เหมาะสมทำการสกัด ทำให้ได้สารสกัด cannabinoids-rich extract ที่มีสาร delta-9-THC ปริมาณสูงมีสารเจือปนอื่นๆ ในปริมาณน้อย จากนั้นจึงนำสารสกัดที่ได้มาแยกให้ได้ delta-9-THC ที่มี ความบริสุทธิ์สูงขึ้นด้วยเครื่อง SFC^[7] ซึ่งใช้หลักการ แยกสารผ่านคอลัมน์เช่นเดียวกับวิธี HPLC แต่ใช้ หลักการสารละลายตัวพาในการแยกสารเช่นเดียวกับเทคนิค SFE โดยใช้ก๊าซ carbon dioxide กับ acetonitrile และ isopropanol ภายใต้อุณหภูมิและความดันในสภาวะวิกฤตยิ่งยวด สามารถแยก สารหลายชนิดใน cannabinoids-rich extract ที่มีคุณสมบัติความไม่มีขั้วใกล้เคียงกันออกจากกันได้

ดี จนได้สาร delta-9-THC ที่มีความบริสุทธิ์สูงและมีปริมาณมากพอที่จะนำมาเป็นวัตถุดิบสำหรับการผลิตสารมาตรฐานได้

ระเบียบวิธีศึกษา

1. วัสดุ

พืชตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา ได้แก่ ช่อดอก กัญชา (herbarium specimen no. DMSC 5268) จากจังหวัดลำปาง สารมาตรฐานและสารเคมีที่ใช้ ได้แก่ สารมาตรฐาน Delta-9-THC solution (Lipomed AG reference standard, Switzerland) lot 135.1B78.0L2 ความเข้มข้น (certified concentration) 1.0250 mg/mL, สารมาตรฐาน CBD, (DMSc reference standard) control No. 02A64217 ความบริสุทธิ์ร้อยละ 99.38 เมื่อคำนวณสภาพปกติ (as is basis), สารมาตรฐาน cannabinol solution (CBN), (Supelco reference standard, USA) lot FE05052008 ความเข้มข้น (certified concentration) 1.000 mg/mL, สารมาตรฐาน tetrahydrocannabinolic acid (THCA), (Lipomed AG reference standard, Switzerland) lot 741.1B0.13 ความบริสุทธิ์ร้อยละ 97.946 เมื่อคำนวณสภาพปกติ (as is basis), acetonitrile HPLC grade (Fisher Chemicals, USA), methanol HPLC grade (Fisher Chemicals, USA), ethanol HPLC grade (Honeywell, USA), isopropanol HPLC grade (Honeywell, USA), formic acid AR grade (Carlo ERBA Reagents, UK), carbon dioxide: dip tube (food grade) และ water type 1

2. วิธีการศึกษา

การเตรียมพืชกัญชาเพื่อใช้ในการผลิตวัตถุดิบ delta-9-THC โดยนำช่อดอกกัญชา 1 กิโลกรัม อบแห้งที่ 60 °C แล้วนำมาสกัดด้วยเครื่องปั่นให้เป็นผงละเอียด ทำการตรวจเอกลักษณ์และหาปริมาณ delta-9-THC เพื่อยืนยันสารสำคัญที่พบในช่อดอก โดยใช้วิธี HPLC ซึ่งเป็นวิธีวิเคราะห์มาตรฐานที่ศูนย์สารมาตรฐานยาและวัตถุเสพติดพัฒนาขึ้น (วิธี HPLC-RSC) โดยใช้เครื่อง HPLC (High performance liquid chromatograph, UV/VIS detector, Empower 3, Waters, USA) นำผงช่อดอกที่ยืนยันสารสำคัญแล้วมาสกัดด้วยเครื่อง SFE (Supercritical fluid extraction 1000, Chromscope v.2, Waters, USA) ซึ่งมีขนาด 1 ลิตร ทนต่อความดันไม่เกิน 350 bar โดยใช้ผงช่อดอกครั้งละไม่เกิน 250 กรัม ทดสอบหาสัดส่วนของตัวทำละลายคือ carbon dioxide และ ethanol รวมทั้งอุณหภูมิและความดันในสภาวะต่าง ๆ เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัด (extraction condition) และเก็บสารสกัด (collection condition) ให้ได้สารสกัด cannabinoids-rich extract ที่มี delta-9-THC และ THCA ในปริมาณสูง และมีสารเจือปนอื่นๆ ในปริมาณต่ำ โดยเก็บสารสกัดที่ได้อย่างต่อเนื่องในภาชนะเก็บสาร (collection vessel) แล้วนำสารสกัด cannabinoids-rich extract ไปอบที่อุณหภูมิ 120 °C เป็นเวลา 45 นาที ทำการวิเคราะห์หาปริมาณ delta-9-THC และ THCA ในสารสกัดก่อนและหลังอบ

หลังจากนั้นทำการแยกสาร delta-9-THC จากสารสกัด cannabinoids-rich extract หลังอบ ให้เป็นสารเดี่ยวที่มีความบริสุทธิ์สูงขึ้นด้วยเครื่อง SFC (Supercritical fluid chromatograph, photodiode

array detector, Chromscope v.2, Waters, USA) โดยทดสอบหาสัดส่วนของตัวทำละลายและชนิดของตัวทำละลายร่วมที่เหมาะสมคือ carbon dioxide กับสารละลายอินทรีย์ต่าง ๆ ภายใต้สภาวะที่ทดสอบว่ามีความเหมาะสมสามารถแยก delta-9-THC ออกจากสารอื่นๆ ได้อย่างจำเพาะเจาะจง กำหนดให้เครื่องทำการเก็บเฉพาะพีค delta-9-THC อย่างต่อเนื่องในภาชนะเก็บสาร (collection vessel) ดำเนินการแยกสารซ้ำ ๆ อย่างต่อเนื่อง เพื่อให้ได้ delta-9-THC ที่มีความบริสุทธิ์มากกว่าร้อยละ 99 และมีปริมาณมากเพียงพอที่จะนำมาใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับการผลิตสารมาตรฐาน

ทำการตรวจสอบคุณสมบัติของ delta-9-THC ที่แยกได้โดยตรวจเอกลักษณ์ด้วยวิธี IR spectroscopy (Infrared spectrometer, Jasco, Japan) วิธี nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR spectrometer, Bruker, Germany) และวิธี UPLC ซึ่งเป็นวิธีวิเคราะห์มาตรฐานที่ศูนย์สารมาตรฐานยาและวัตถุเสพติดพัฒนาขึ้น (วิธี UPLC-ODa-RSC) ซึ่งใช้ detector ชนิด diode array ร่วมกับ single quadrupole mass spectrometer โดยใช้เครื่อง UPLC (Ultra-performance liquid chromatograph: H-class, diode array detector, ACQUITY ODa detector, Empower 3, Waters, USA) ใช้คอลัมน์ ACQUITY UPLC BEH C18 ขนาด 2.1 × 100 มิลลิเมตร อนุภาค 1.7 ไมโครเมตร (Waters, USA) และทดสอบความบริสุทธิ์โดยการวิเคราะห์หาปริมาณ delta-9-THC ด้วยวิธี HPLC-RSC ทั้งนี้การตรวจเอกลักษณ์และการหาปริมาณจะทำการเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน delta-9-THC

นำวัตถุดิบ delta-9-THC ที่ผลิตได้มาเตรียม

เป็นสารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แบ่งบรรจุลงในหลอดแก้วสีชาหลอดละ 1 มิลลิลิตรด้วยเครื่องบรรจุและปิดผนึกหลอดแก้วแบบอัตโนมัติ [ampule filling and sealing system (Ampulmatic-10), Bioscience, Inc., USA] ทดสอบความคงสภาพ (stability study) ของสารละลายมาตรฐาน delta-9-THC โดยแบ่งเก็บที่สภาวะต่าง ๆ ตาม ICH guideline^[8] ได้แก่ 40 °C ความชื้นสัมพัทธ์ที่ร้อยละ 75, 2-8 °C และ -20 °C สุ่มตัวอย่างในช่วงเวลาที่กำหนดพร้อมตรวจวิเคราะห์และประมวลผลด้วยวิธีทางสถิติ เพื่อกำหนดสภาวะการเก็บรักษาและอายุของสารละลายมาตรฐานที่ผลิตขึ้น แล้วทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกัน (homogeneity test) โดยทำการสุ่มตัวอย่าง (stratified random sampling) สารละลายมาตรฐานที่แบ่งบรรจุแล้วจำนวน 10 หลอด นำมาวิเคราะห์หลอดละ 2 ซ้ำ แล้วนำค่าที่ได้มาประมวลผลด้วยวิธีทางสถิติ ตาม ISO 33405: 2024^[9] แล้วจึงกำหนดค่าความเข้มข้น (certified concentration) ของสารละลายมาตรฐานที่ผลิตขึ้น โดยทำการวิเคราะห์ตัวอย่างด้วยนักวิเคราะห์ 3 คน คนละ 6 ตัวอย่าง นำค่าที่ได้มาประมวลผลทางสถิติ พร้อมคำนวณค่าความไม่แน่นอน (uncertainty) ตาม ISO 33405: 2024^[9] แล้วจัดทำ certificate of analysis (COA) กระบวนการผลิตสารมาตรฐานนี้ดำเนินการตามมาตรฐานการผลิตวัสดุอ้างอิง ISO 17034: 2016^[10] และเปิดให้บริการสารมาตรฐานที่ผลิตขึ้น

ผลการศึกษา

ช่อดอกกัญชา 1 กิโลกรัมนำมาอบแห้งบดละเอียด แล้วนำไปตรวจยืนยันเอกลักษณ์และหาปริมาณด้วยวิธี HPLC-RSC เทียบกับสารมาตรฐาน delta-9-THC ใช้คอลัมน์ Ascentis Express (Sigma-Aldrich, USA) C18 ขนาด 3.0 × 150 มิลลิเมตร บรรจุอนุภาคขนาด 2.7 ไมโครเมตร สารละลายตัวพา 0.1% formic acid ในน้ำ (A) : 0.1% formic acid ใน acetonitrile (B) ในอัตราส่วนเริ่มต้น 50:50 และปรับขึ้นไป 5:95 ในเวลา 8 นาที อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิคอลัมน์ 50 °C ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร ปริมาณการฉีด 10 ไมโครลิตร พบสาร delta-9-THC ในตัวอย่าง จากนั้นนำมาสกัดด้วยเครื่อง SFE โดยทำการทดสอบอัตราส่วนของตัวทำละลายร่วมที่เหมาะสมสำหรับสกัดและเก็บสาร delta-9-THC ที่ carbon dioxide ต่อ ethanol เท่ากับ 98:2, 95:5 และ 90:10 พบว่าอัตราส่วนที่ 95:5 มีความเหมาะสมสามารถสกัดพืชกัญชาได้สารสกัดมีลักษณะเหนียวข้นสีน้ำตาลเข้ม [Figure 1(a)] ได้เป็นสารสกัด cannabinoids-rich extract ปริมาณ 20 กรัมหรือคิดเป็นร้อยละ 6.7 ของน้ำหนักช่อดอกกัญชาแห้งที่นำมาสกัด รายละเอียดผลการทดสอบสภาวะการสกัดช่อดอกกัญชาด้วยเครื่อง SFE และสภาวะที่เหมาะสมของเครื่อง SFE (Table 1)

Table 1 SFE optimal condition for *Cannabis sativa* L. extraction

SFE condition			
Flow rate (ml/min)	100		
Run time (min)	45		
Vessel condition: temp/pressure (°C/bar)			
Extraction vessel	55/240		
Collection vessel 1	55/120		
Collection vessel 2	50/90		
Extraction ratio (CO ₂ : ethanol)	98:2	95:5	90:10
Cannabinoids extraction appearance	no extraction collected	dark brown viscous extraction	liquid-liked extraction
% yield of cannabinoids extraction	N/A	6.7	N/A
% of delta-9-THC and THCA in cannabinoids-rich extract	N/A	62.1 and 36.0	N/A
% of delta-9-THC and THCA in cannabinoids-rich extract after heated (delta-9-THC-rich extract)	N/A	82.2 and 2.5	N/A

เมื่อนำสารสกัด cannabinoids-rich extract ไปวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC-RSC คำนวณโดยวิธี area normalization ได้ปริมาณ delta-9-THC ร้อยละ 62.1 และ THCA ร้อยละ 36.0 โคโรมาโตแกรมของสารสกัด cannabinoids-rich extract [Figure 2(a)] และเมื่อนำสารสกัด cannabinoids-rich extract นี้ไปอบที่ 120 °C เป็นเวลา 45 นาที พบว่าสาร THCA ในสารสกัดเปลี่ยนเป็น delta-9-THC วิเคราะห์ได้ปริมาณ delta-9-THC



Figure 1 (a) Cannabinoids-rich extract from SFE extraction
(b) Delta-9-THC from SFC isolation, > 99% purity

ร้อยละ 82.2 และ THCA ร้อยละ 2.5 (สารสกัด delta-9-THC-rich extract) [Figure 2(b)]

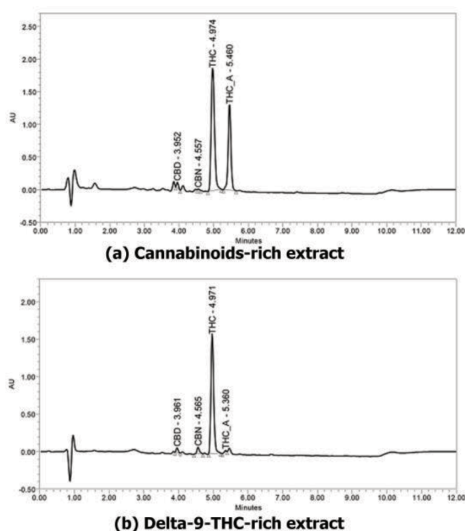


Figure 2 HPLC chromatogram of cannabinoids-rich extract from SFE extraction, CO₂ : ethanol (95:5)

นำสารสกัด delta-9-THC-rich extract มาแยกต่อให้ได้ delta-9-THC บริสุทธิ์ ใช้เครื่อง SFC โดยทดสอบชนิดของตัวทำละลายที่เหมาะสมกับร่วม carbon dioxide พบว่าตัวทำละลายร่วมระหว่าง carbon dioxide กับ ethanol, isopropanol และ methanol ไม่สามารถแยกสาร delta-9-THC ออกจากสารอื่นๆ ได้ [Figure 3(a)] เมื่อเพิ่ม acetonitrile เป็นตัวทำละลายร่วมกับ isopropanol อัตราส่วน 1:1

พบว่าสามารถแยกสาร delta-9-THC ออกจากสารอื่น ๆ ได้อย่างชัดเจน [Figure 3(b)] จึงทำการฉีดสารละลายของ delta-9-THC-rich extract ปริมาณการฉีดครั้งละ 30 ไมโครลิตร กำหนดให้เครื่องเก็บสารเฉพาะฟีด delta-9-THC ลงในภาชนะเก็บอย่างต่อเนื่อง รายละเอียดสภาวะเหมาะสมของเครื่อง SFC ที่ทดสอบได้ (Table 2)

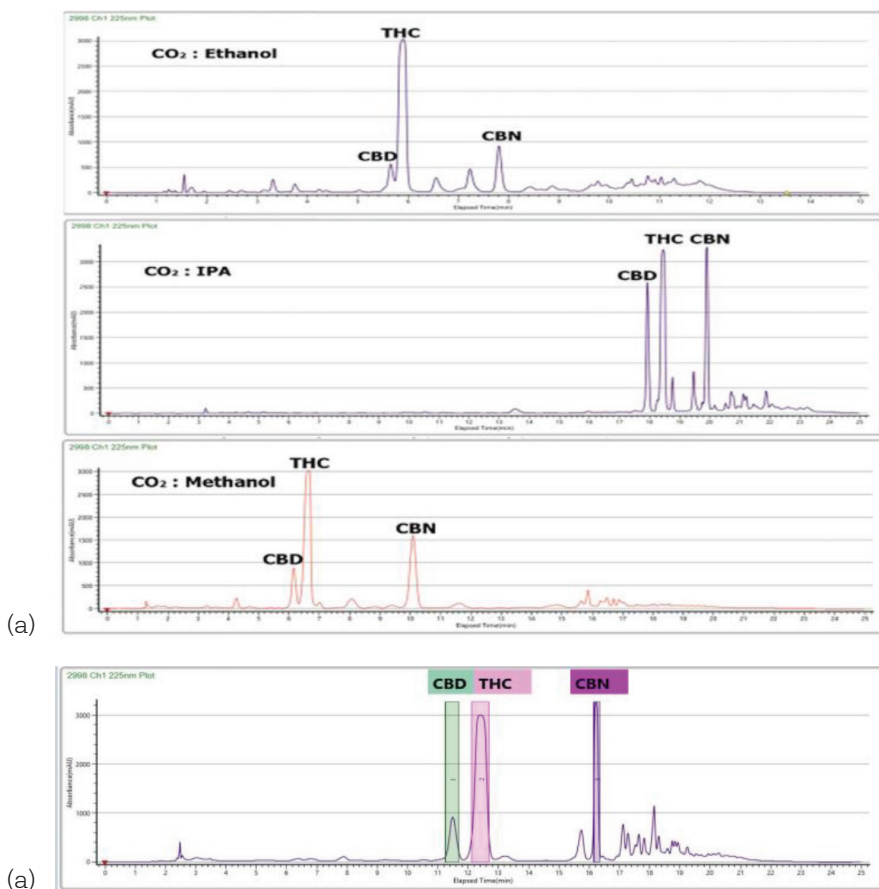


Figure 3 (a) SFC chromatogram of cannabinoids-rich extract with various co-solvent

(b) SFC chromatogram of cannabinoids-rich extract with acetonitrile: isopropanol (1:1) and carbon dioxide as co-solvent

Table 2 SFC condition for delta-9-THC isolation

SFC condition			
Column	Torus™ 2-PIC OBD 5, 10 × 250 mm., 5 µm.		
Mobile phase (gradient)	(A) CO ₂ : (B) acetonitrile : isopropyl alcohol = 1:1		
	Time (min)	A (%)	B (%)
	0.0	96.5	3.5
	13.0	95.3	4.7
	19.0	75.0	25.0
	21.0	75.0	25.0
	23.0	96.5	3.5
	25.0	96.5	3.5
Flow rate	14.0 ml/min		
Column temperature	50 °C		
Detection	UV 225 nm		
Injection volume	30 µl		
Run time	25 min		

ในการแยก delta-9-THC จาก delta-9-THC-rich extract ปริมาณ 20 กรัม ด้วยเครื่อง SFC ได้สาร delta-9-THC ซึ่งมีลักษณะเป็นของเหลวข้นหนืดสีน้ำตาลอมเหลือง (yellowish brown paste) [Figure 1(b)] ปริมาณ 1.5 กรัม คิดเป็นร้อยละ 7.5 ของน้ำหนักสารสกัด delta-9-THC-rich extract และเมื่อนำมาวิเคราะห์หาปริมาณ delta-9-THC ด้วยวิธี HPLC-RSC เทียบกับสารมาตรฐาน delta-9-THC พบว่ามีความบริสุทธิ์มากกว่าร้อยละ 99 ตรวจเอกลักษณ์สาร delta-9-THC ความบริสุทธิ์สูงที่แยกได้ด้วย IR

spectroscopy พบว่ามี IR spectrum ที่สอดคล้องกับสารมาตรฐาน delta-9-THC (Figure 4) และเมื่อวิเคราะห์โดยวิธี UPLC-QDa-RSC พบว่า UPLC chromatogram ของ delta-9-THC มี retention time เท่ากับ 2.538 นาที UV spectrum แสดงค่าการดูดกลืนคลื่นแสงสูงสุด ($\lambda_{\max}$) ที่ 209.8 นาโนเมตร และ mass spectrum LC-MS(ESI)(+) มีค่า $[M+H]^+$ m/z เท่ากับ 315.1 (Figure 5) ซึ่งสอดคล้องกับสารมาตรฐาน delta-9-THC

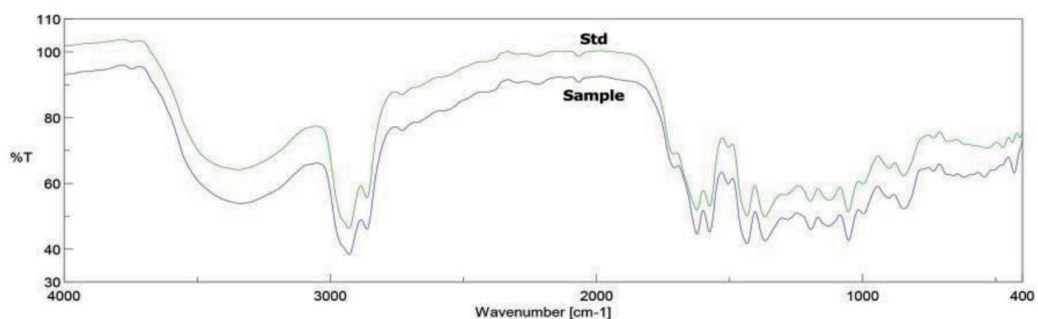


Figure 4 IR spectrum of standard delta-9-THC and high purity delta-9-THC, isolated from SFC

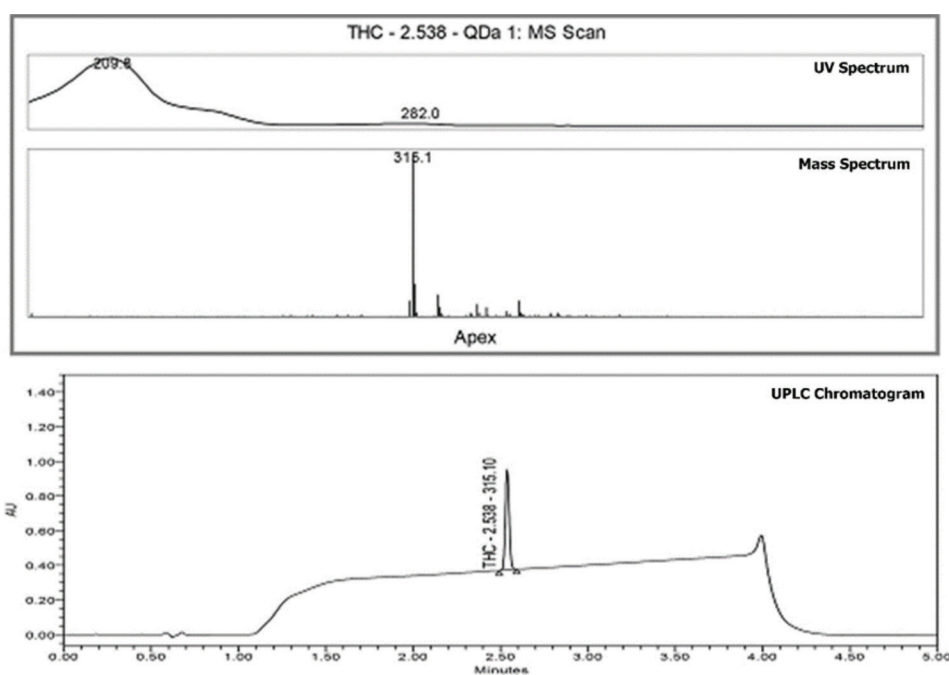


Figure 5 UV spectrum, mass spectrum and UPLC chromatogram of high purity delta-9-THC, isolated from SFC

นอกจากนี้ได้ทำการตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง $^1\text{H-NMR}$ ให้ผลดังนี้ $^1\text{H-NMR}$ (MeOD, 300 MHz) δ (ppm): 6.43 (1H, s, H-2), 6.16 (1H, s, H-5'), 6.08 (1H, s, H-3'), 3.15 (1H, d, H-1), 2.40 (2H, t, H-1''), 2.13 (2H, brs, H-4, H-5), 1.92 (1H, m, H-6), 1.64 (3H, s, H-(3-Me)), 1.55 (2H, m, H-2''), 1.44

(3H, m, H-(8-Me)), 1.32 (4H, m, H-3'', H-4''), 1.04 (3H, s, H-(9-Me)), 1.90 (3H, m, H-5''). (Figure 6) ซึ่งสามารถพิสูจน์โครงสร้างของสารจากค่าเคมีคอล ชิฟต์และสัญญาณของโปรตอนบนคาร์บอน พบว่า สอดคล้องกับโครงสร้างโมเลกุลของ delta-9-THC

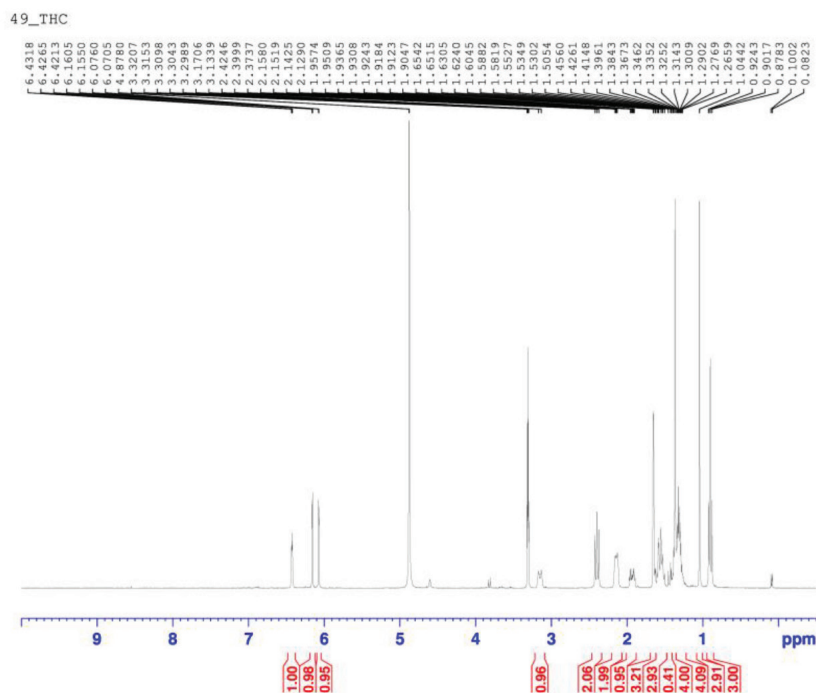


Figure 6 ^1H -NMR spectrum of high purity delta-9-THC, isolated from SFC

จากการประมวลผลการตรวจเอกลักษณ์สารสำคัญด้วย FT-IR, NMR และ UPLC-mass spectroscopy สามารถยืนยันได้ว่าเป็นสาร delta-9-THC โดยมีโครงสร้างโมเลกุล (Figure 7) มีสูตรโมเลกุล $\text{C}_{21}\text{H}_{30}\text{O}_2$ และมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 314.5

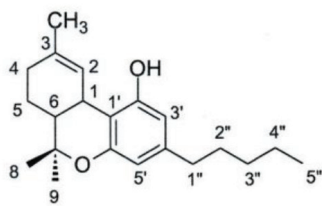


Figure 7 Delta-9-THC

เมื่อพบว่าวัตถุดิบ delta-9-THC ที่แยกได้มีคุณสมบัติเหมาะสม โดยผ่านการตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์ มีความบริสุทธิ์สูงและมีปริมาณมากเพียงพอต่อการนำมาผลิตเป็นสารมาตรฐาน จึงนำวัตถุดิบ

ดังกล่าวมาเตรียมเป็นสารละลายมาตรฐาน delta-9-THC ที่มีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรใน methanol ทำการแบ่งบรรจุลงในหลอดแก้วสีชาหลอดละ 1 มิลลิลิตรภายใต้ก๊าซไนโตรเจน เมื่อทำการวิเคราะห์ตัวอย่างที่สุ่มมาได้เมื่อเก็บที่สภาวะต่าง ๆ ทุก 1 เดือนเป็นเวลา 12 เดือน ด้วยวิธี HPLC-RSC โดยเทียบกับสารมาตรฐาน delta-9-THC (Figure 8) พบว่าที่สภาวะ 2-8°C และ -20°C ค่าความเข้มข้นของตัวอย่างยังคงสภาพ แต่ที่สภาวะ 40°C ปริมาณ delta-9-THC ลดลงร้อยละ 15 ในเดือนที่ 3 เมื่อประมวลผลด้วยสถิติ (regression statistics: trend analysis) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%^[11] จึงมีการกำหนดให้สารละลายมาตรฐานมีอายุ 3 ปีนับตั้งแต่วันที่ผลิตเมื่อเก็บรักษาตัวอย่างภายใต้ 2-8°C นอกจากนี้ยังได้เก็บตัวอย่างเพื่อทดสอบผลความคงสภาพระยะยาว (long-term stability) เป็นเวลา 3

ปี พบว่าให้ผลการทดสอบความคงสภาพสอดคล้องกัน ผลความคงสภาพ (Figure 9) นอกจากนี้ยังพบว่าสารละลายมาตรฐานนี้มีความเป็นเนื้อเดียวกันตลอดทั้งรุ่นการผลิต (homogeneity test) เมื่อประมวลผลด้วยสถิติ Cochran's test: within sample variation และ one-way ANOVA: between-bottle homogeneity ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%^[9] ทำการกำหนดค่าความเข้มข้นมาตรฐาน (certified concentration) พร้อมคำนวณค่าความไม่แน่นอน (uncertainty) แล้วจัดทำ COA สารมาตรฐานกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

delta-9-tetrahydrocannabinol solution ผลิตตามระบบคุณภาพการจัดทำมาตรฐานอ้างอิง ISO 17034: 2016^[10] และเปิดให้บริการเป็นรุ่นการผลิตแรก ตั้งแต่วันที่ 1 เมษายน 2565 มีค่าความบริสุทธิ์ของวัตถุดิบ delta-9-THC เท่ากับร้อยละ 99.38 เมื่อคำนวณในสภาวะปกติและสามารถให้ค่ากำหนดเป็นความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน THC (certified concentration) เท่ากับ 0.9303 ± 0.0792 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน delta-9-THC (Lipomed®)

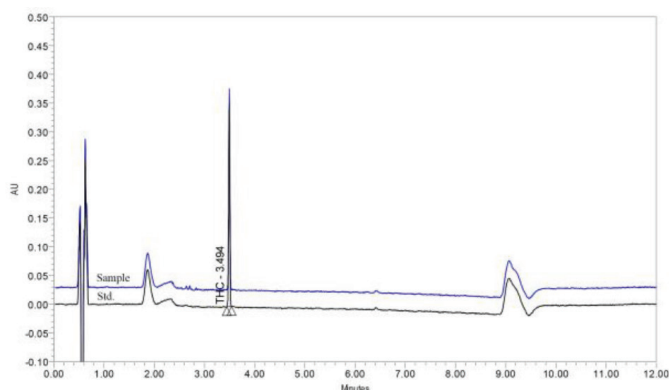


Figure 8 HPLC chromatogram of delta-9-THC in standard solution and DMSc solution

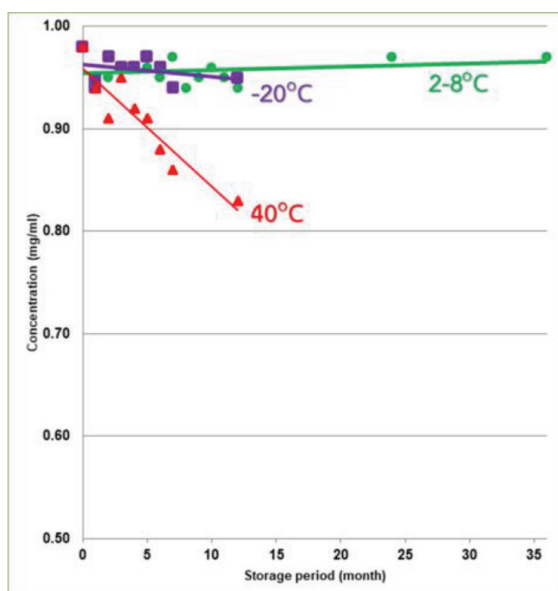


Figure 9 Stability testing data of delta-9-THC DMSc solution

อภิปรายผล

วิธีการสกัดสาร delta-9-THC จากช่อดอกของกัญชามีหลายวิธี^[12] เช่น การหมัก (maceration), การไหลซึม (percolation), การสกัดด้วย soxhlet extractor ซึ่งมักเป็นวิธีการสกัดที่ใช้เวลานาน ใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ในปริมาณมากและเมื่อสกัดเสร็จต้องนำสารสกัดไประเหยตัวทำละลายอินทรีย์ก่อนนำไปแยกต่อ สำหรับเทคนิคการสกัดด้วย SFE เป็นการนำคุณสมบัติของก๊าซที่อยู่ในสภาวะเป็นของไหลวิกฤตยิ่งยวด (supercritical fluid) กับตัวทำละลายรวมมาใช้ในการสกัด ทำให้ตัวทำละลายกระจายและแทรกซึมได้ดีจึงทำให้การสกัดมีประสิทธิภาพกว่าตัวทำละลายในสภาวะปกติ^[13] เมื่อปรับอุณหภูมิและความดันหลังการสกัด จะทำให้ carbon dioxide เปลี่ยนเป็นก๊าซที่ระเหยออกไปจากสารสกัดได้ง่าย ช่วยลดขั้นตอนในการระเหยแห้งตัวทำละลายออกจากสารสกัด รวมถึงไม่ต้องใช้ความร้อนในการระเหยแห้ง^[12] จึงเหมาะสมต่อการสกัดสารที่ไม่ทนความร้อน นอกจากนี้ยังใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ในปริมาณน้อยช่วยลดมลภาวะจากตัวทำละลายอินทรีย์และลดอันตรายที่เกิดจากตัวทำละลายอินทรีย์ต่อสุขภาพ

การสกัดด้วยเทคนิค SFE นี้ การเปลี่ยนแปลงสัดส่วนของตัวทำละลายรวม ethanol ตั้งแต่ 0-10% พบว่านอกจากการใช้ ethanol จะช่วยให้สามารถสกัด delta-9-THC ออกมาได้ดีกว่าการใช้ carbon dioxide อย่างเดียวแล้ว ยังพบว่าที่สัดส่วนของ ethanol เท่ากับ 5-10% ยังช่วยให้สามารถสกัดสาร delta-9-THC ได้ดีขึ้น เนื่องจาก carbon dioxide เป็นสารไม่มีขั้ว การเติม ethanol ซึ่งเป็นสารที่มีขั้วในสัดส่วนที่เหมาะสม จะช่วยให้สกัด delta-9-THC ได้ปริมาณผลผลิตที่สูงขึ้น^[13-14] ซึ่งสอดคล้องกับผล

การศึกษาในครั้งนี้ที่พบว่าที่อัตราส่วนของ carbon dioxide ต่อ ethanol เท่ากับ 95:5 เป็นสัดส่วนที่เหมาะสมในการสกัดด้วย SFE ให้ได้ปริมาณ delta-9-THC และ THCA มากที่สุดในการศึกษาครั้งนี้ได้น้ำ cannabinoids-rich extract ที่ได้จากการสกัดด้วยเครื่อง SFE มาอบที่ 120 °C เป็นเวลา 45 นาที เพื่อให้เกิดการ decarboxylation เปลี่ยน THCA ให้เป็น delta-9-THC อย่างสมบูรณ์ ก่อนนำ delta-9-THC-rich extract มาแยกให้ได้ delta-9-THC บริสุทธิ์ด้วยเครื่อง SFC ตามการศึกษาของ Wang M. และคณะ^[15]

การแยกบริสุทธิ์ delta-9-THC จากสารสกัดสามารถทำได้หลายวิธี ได้แก่ การแยกด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี (column chromatography)^[12] วิธี flash column chromatography^[16] สำหรับวิธีการแยกบริสุทธิ์ delta-9-THC ด้วยเครื่อง SFC^[16] สามารถแยกสารแคนาบินอยด์ที่มีคุณสมบัติเป็นกลาง เช่น delta-9-THC, CBD และสารที่มีคุณสมบัติเป็นกรด เช่น THCA และ CBDA ออกจากกันได้อย่างมีประสิทธิภาพ เนื่องจากการใช้ carbon dioxide เป็นตัวหลักของสารละลายตัวพาซึ่งเป็นสารที่เข้ากับตัวทำละลายอินทรีย์ต่าง ๆ ได้ดี มีความปลอดภัยสูง ไม่ติดไฟ มีค่าการดูดกลืนคลื่นแสงอุลตราไวโอเล็ตที่คลื่นความถี่ต่ำ (short wavelength) และสามารถกำจัดออกจากสารสำคัญที่แยกออกมาได้ง่ายในภายหลัง^[17] นอกจากนี้ เทคนิคการแยกสารด้วย SFC ที่ใช้สารละลายตัวพาที่มี carbon dioxide กับ acetonitrile และ isopropanol เป็นส่วนประกอบนั้นมีค่า diffusion coefficient สูงกว่าการใช้การแยกแบบ preparative HPLC ที่มีสารละลายตัวพาเป็น normal phase 3-5 เท่า ทำให้สามารถแยกสารได้เร็วขึ้นเนื่องจากความหนืดของสารละลายตัวพาของ SFC

น้อยกว่าสารละลายตัวพาของ preparative HPLC ทำให้สามารถเพิ่มอัตราการไหลของสารละลายตัวพาได้สูงขึ้น จึงสามารถแยกสารได้เร็วขึ้นและได้ปริมาณสารเพิ่มขึ้นอีกด้วย^[17]

การตรวจเอกลักษณ์ delta-9-THC ที่ผลิตขึ้น IR spectra และ mass spectra สอดคล้องกับการศึกษาของ Tay L.-L. และคณะ^[18] และ Gallo-Molina A.C. และคณะ^[13] ตามลำดับ นอกจากนี้การทดสอบโดย NMR พบว่าโครงสร้างโมเลกุลเป็นสาร delta-9-THC^[19] ซึ่งจากผลการทดสอบทั้งหมดสามารถยืนยันได้ว่าสารที่ได้จากวิธีผลิตที่พัฒนาขึ้นนี้คือ delta-9-THC

ข้อสรุป

delta-9-THC ที่สกัดจากช่อดอกของพืชกัญชาและแยกบริสุทธิ์โดยวิธีที่พัฒนาขึ้นนี้ มีร้อยละของผลผลิตเท่ากับ 0.6 สามารถนำมาเป็นวัตถุดิบสำหรับใช้ผลิตสารมาตรฐานกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ delta-9-tetrahydrocannabinol (delta-9-tetrahydrocannabinol DMSc reference standard) ในรูปแบบสารละลายใน methanol เป็นสารมาตรฐานที่ดำเนินการผลิตและจำหน่ายโดยกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ มีราคาถูกกว่าการนำเข้าสารมาตรฐานชนิดนี้จากต่างประเทศประมาณ 10 เท่า ผู้วิจัยและผู้ประกอบการผลิตยาจากกัญชาสามารถนำไปใช้เป็นสารมาตรฐานในการตรวจวิเคราะห์เพื่อหาปริมาณ delta-9-THC ในพืชกัญชา สารสกัดจากกัญชา เป็นการประกันคุณภาพและความปลอดภัยผลิตภัณฑ์จากกัญชาที่ผลิตในประเทศ นอกจากนี้ยังสามารถนำไปเป็นตัวเปรียบเทียบเพื่อต่อยอดงานวิจัยใช้ในการทดสอบฤทธิ์ ทดสอบความเป็นพิษและ

กำหนดขนาด (dose) ของสารสำคัญของผลิตภัณฑ์กัญชาที่พัฒนาขึ้นเพื่อใช้ในการแพทย์แผนปัจจุบันต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณนายอำพร วงศ์เจริญสถิตย์ ที่ให้คำแนะนำขั้นตอนการพัฒนาวิธีการใช้เครื่อง SFE และ SFC, นายธีระวุธ ปิ่นทอง ที่ให้คำแนะนำและเป็นที่ปรึกษาในการสกัดและแยกสาร delta-9-THC จากกัญชาให้มีความบริสุทธิ์สูงจนสามารถนำมาผลิตเป็นสารมาตรฐานกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ delta-9-tetrahydrocannabinol ได้

References

1. Simiyu DC, Jang JH, Lee OR. Understanding *Cannabis sativa* L.: Current Status of Propagation, Use, Legalization, and Haploid-Inducer-Mediated Genetic Engineering. *Plants*. 2022;11:1236.
2. Narcotic Act B.E. 2522 (1979). Published in Government Gazette. (1979 Apr 22). (in Thai)
3. Ministry of Public Health. A manual for preparing individual medicines for traditional Thai medical cannabis medicines, (The part that is not a harmful drug) for public health service units. Nonthaburi: Ministry of Public Health; 2022. (in Thai)
4. Narcotics Act (No. 7) B.E. 2562 (A.D. 2019). Published in Government Gazette, (2019 Feb 18). (in Thai)
5. United Nations Office on Drugs and Crime. Recommended methods for the identification and analysis of cannabis and cannabis products. New York: United Nations Office on Drugs and Crime; 2009. p. 41-3.
6. American Herbal Pharmacopoeia. Cannabis Inflorescence. *Cannabis* spp., Standards of Identity, Analysis, and Quality Control, Scotts Valley. CA: American Herbal Pharmacopoeia; 2014. p. 44-7.
7. Pavan MVR, Barron AR. Basic principles of supercritical fluid chromatography and supercritical fluid extraction,

- physical methods in chemistry and nano science. Houston: Rice University, LibreTexts; 2024. p. 229-41.
8. European Medicines Agency. ICH harmonised tripartite guideline stability testing of new drug substances and products Q1A(R2). London: European Medicines Agency; 2003. 24 p.
 9. ISO 33405: 2024. Reference materials - Approaches for characterization and assessment of homogeneity and stability. Geneva: International Organization for Standardization (ISO); 2017.
 10. ISO 17034: 2016. General requirements for the competence of reference material producers. Geneva: International Organization for Standardization (ISO); 2016.
 11. European Medicines Agency. ICH Topic Q1E : Evaluation of Stability Data. London: European Medicines Agency; 2006. 17 p.
 12. Azmira J, Zaidula ISM, Rahmana MM, Sharifa KM, Mohameda A, Sahenab F, Jahurul M.H.A., Ghafoor K, Norulaini N.A.N, Omar A.K.M. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. J Food Eng. 2013;117:426-36.
 13. Gallo-Molina AC, Castro-Vargas HI, Garzón-Méndez WF, Martínez Ramírez JA, Rivera Monroy ZJ, King JW, Parada-Alfonso F. Extraction, isolation and purification of tetrahydrocannabinol from the *Cannabis sativa* L. plant using supercritical fluid extraction and solid phase extraction. J Supercrit Fluids. 2019;146:208-16.
 14. Laura JR, Niccolo VA. Supercritical carbon dioxide extraction of cannabinoids from *Cannabis sativa* L. J Supercrit Fluids. 2017;129:16-27.
 15. Wang M, Wang Y-H, Avula B, Radwan MM, Wanas AS, Antwerp JV, Parcher J.F, ElSohly M.A, Khan I.A. Decarboxylation study of acidic cannabinoids: a novel approach using ultra high-performance supercritical fluid chromatography/photodiode array-mass spectrometry. Cannabis Cannabinoid Res. 2016;1(1):262-71.
 16. Zala SP, Patel KP, Patel KS, Parmar JP, Sen DJ. Laboratory techniques of purification and isolation. Int J Drug Dev & Res. 2012;4(2):41-55.
 17. Matthew P, David AK. The SFC isolation and purification of cannabinoids using application specific stationary phases under optimised conditions. Chromatography Today. 2020;43-6.
 18. Tay L-L, Hulse J, Paroli RM. FTIR and raman spectroscopic characterization of cannabinoids. Can J Chem. 2022;100(10):751-8.
 19. Hazekamp A, Choi YH, Verpoorte R. Quantitative analysis of cannabinoids from *Cannabis sativa* using ¹H-NMR. Chem Pharm Bull. 2004;52(6):718-21.