

การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณเตตราไฮโดรแคนนาบินอลโดยวิธีเอชพีแอลซี และข้อกำหนดทางเคมีฟิสิกส์ของช่อดอกเพศเมียและใบกัญชา

ภุริทัต รัตนสิริ^{*†}, สุพรรณ ภัทพรชัยวัฒน์^{*}, วารุณี จิรวัดนาพงศ์^{*}

^{*}สถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข ตำบลตลาดขวัญ อำเภอเมือง จังหวัดนนทบุรี 11000

[†]ผู้รับผิดชอบบทความ: puritat.r@dmsc.mail.go.th

บทคัดย่อ

บทนำและวัตถุประสงค์: เนื่องจากยังไม่มีข้อกำหนดมาตรฐานในการควบคุมคุณภาพของช่อดอกเพศเมียและใบกัญชา งานวิจัยนี้จึงมุ่งศึกษาคุณภาพทางเคมีฟิสิกส์ของช่อดอกเพศเมียและใบกัญชา โดยจัดทำเอกลักษณ์ทางเคมี ประเมินคุณภาพทางเคมี ฟิสิกส์ พัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญ และทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ เพื่อใช้เป็นข้อมูลประกอบการจัดทำอินกราฟในตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทย

วิธีการศึกษา: ใช้ตัวอย่างช่อดอกเพศเมีย 23 ตัวอย่าง และใบกัญชา 16 ตัวอย่าง ศึกษาเอกลักษณ์ทางเคมีโดยใช้เตตราไฮโดรแคนนาบินอลและแคนนาปีไดโอดเป็นสารมาตรฐานเปรียบเทียบ พร้อมประเมินคุณภาพทางเคมีฟิสิกส์ และพัฒนาวิธีวิเคราะห์เตตราไฮโดรแคนนาบินอลด้วยวิธีเอชพีแอลซี พร้อมตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี

ผลการศึกษา: การศึกษาเอกลักษณ์ทางเคมีด้วยวิธีปฏิบัติการเกิดสีพบสารในกลุ่มแคนนาบินอยด์และเทอร์ปีนอยด์ ส่วนการวิเคราะห์ด้วยวิธีเอชพีแอลซีพบสารเตตราไฮโดรแคนนาบินอลและแคนนาปีไดโอด การประเมินคุณภาพทางเคมีฟิสิกส์ของช่อดอกเพศเมียกัญชา พบค่าปริมาณความชื้นเฉลี่ย 8.00 ± 0.68 ปริมาณเถ้ารวม 12.94 ± 2.03 ปริมาณเถ้าที่ไม่ละลายในกรด 1.96 ± 0.96 ปริมาณสารสกัดด้วยน้ำ 18.51 ± 3.33 ปริมาณสารสกัดด้วยเอทานอล 17.64 ± 2.59 และปริมาณเตตราไฮโดรแคนนาบินอล 1.95 ± 1.51 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก ส่วนใบกัญชา พบค่าปริมาณความชื้นเฉลี่ย 7.83 ± 0.74 ปริมาณเถ้ารวม 17.38 ± 3.07 ปริมาณเถ้าที่ไม่ละลายในกรด 2.48 ± 1.70 ปริมาณสารสกัดด้วยน้ำ 26.04 ± 2.54 ปริมาณสารสกัดด้วยเอทานอล 14.88 ± 3.39 และปริมาณเตตราไฮโดรแคนนาบินอล 0.39 ± 0.23 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก วิธีที่พัฒนาขึ้นมีความจำเพาะสูง ใช้ได้ในช่วงความเข้มข้น $2\text{--}10\text{ }\mu\text{g/mL}$ ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง (R^2) เท่ากับ 0.9998 ค่าการคืนกลับอยู่ในช่วงร้อยละ 97.71–103.15 ค่าความเที่ยงอยู่ในช่วงร้อยละ 0.08–0.36 ค่าความเข้มข้นน้อยที่สุดที่ตรวจพบได้และความเข้มข้นน้อยที่สุดที่หาปริมาณได้เท่ากับ 0.08 และ $0.25\text{ }\mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ

อภิปรายผล: การศึกษาเอกลักษณ์ทางเคมีของช่อดอกเพศเมียและใบกัญชา พบว่ามีปริมาณสารเตตราไฮโดรแคนนาบินอลและแคนนาปีไดโอดแตกต่างกัน โดยพบสารแคนนาปีไดโอดเพียงไม่กี่ตัวอย่าง ซึ่งอาจเกิดจากความแตกต่างของสายพันธุ์ แหล่งปลูก และอายุการเก็บเกี่ยว ทั้งนี้ ในแหล่งปลูกเดียวกัน พบว่าช่อดอกเพศเมียมีปริมาณเตตราไฮโดรแคนนาบินอลมากกว่าใบกัญชา ซึ่งสอดคล้องกับข้อมูลที่ระบุว่าช่อดอกเพศเมียเป็นแหล่งสะสมสารแคนนาบินอยด์หลักของพืชกัญชา

การตรวจเอกลักษณ์ทางเคมีด้วยเทคนิคเอชพีแอลซีสามารถแยกสารมาตรฐานได้ 8 ชนิด จาก การศึกษาคุณภาพ

ทางเคมีฟิสิกส์ พบว่าสามารถนำไปใช้เป็นแนวทางในการควบคุมคุณภาพของสมุนไพรกัญชา นอกจากนี้ การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณเตตราไฮโดรแคนนาบินอลในช่อดอกเพศเมียและใบกัญชาด้วยเทคนิคเอชพีแอลซี พบว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นมีความจำเพาะสูง มีความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงสูง ค่าการคืนกลับและความเที่ยงอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ตามมาตรฐานการวิเคราะห์ทางเภสัชกรรม และการใช้ระบบเอชพีแอลซีแบบเกรเดียนต์ช่วยลดระยะเวลาในการวิเคราะห์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

ข้อสรุปและข้อเสนอแนะ: ข้อกำหนดทางเคมีฟิสิกส์ และวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถนำไปใช้จัดทำมาตรฐานของช่อดอกเพศเมียและใบกัญชาในตำรามาตรฐานยาสมุนไพร เพื่อเป็นมาตรฐานอ้างอิงระดับประเทศ

คำสำคัญ: คุณภาพทางเคมี, กัญชา, วิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญ, เตตราไฮโดรแคนนาบินอล, เอชพีแอลซี

Development of Tetrahydrocannabinol Content Analysis by HPLC and Physicochemical Properties of Cannabis Female Inflorescences and Leaves

Puritat Rattanasiri^{*,†}, Suphan Pattarapornchaiwat^{*}, Warunee Jirawattanapong^{*}

^{*}Medicinal Plant Research Institute, Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health, Talat Khwan, Mueang, Nonthaburi, 11000, Thailand.

[†]Corresponding author: puritat.r@dmsc.mail.go.th

Abstract

Introduction and Objectives: Due to the absence of standard specification for the quality control of cannabis female inflorescences and leaves, this study aimed to evaluate their physicochemical properties, establish chemical profiles, develop quantitative analytical methods and validate these methods. The findings will support the formulation of monographs of cannabis female inflorescences and cannabis leaves for the Thai Herbal Pharmacopoeia.

Methods: A total of 23 cannabis female inflorescences samples and 16 cannabis leaf samples were analyzed. Chemical identity was assessed using tetrahydrocannabinol (THC) and cannabidiol (CBD) as reference standards. Physicochemical properties were evaluated, and a high performance liquid chromatography (HPLC) method was developed and validated for quantifying THC content.

Results: Colorimetric reactions revealed the presence of cannabinoids and terpenoids. Thin layer chromatography confirmed the presence of THC and CBD. The physicochemical evaluation of female cannabis inflorescences showed a mean moisture content of $8.00 \pm 0.68\%$ w/w, total ash of $12.94 \pm 2.03\%$ w/w, acid-insoluble ash of $1.96 \pm 0.96\%$ w/w, water extractive of $18.51 \pm 3.33\%$ w/w, ethanol extractive of $17.64 \pm 2.59\%$ w/w, and THC content of $1.95 \pm 1.51\%$ w/w. For cannabis leaves, the mean values were moisture content of $7.83 \pm 0.74\%$ w/w, total ash of $17.38 \pm 3.07\%$ w/w, acid-insoluble ash of $2.48 \pm 1.70\%$ w/w, water extractive of $26.04 \pm 2.54\%$ w/w, ethanol extractive of $14.88 \pm 3.39\%$ w/w, and THC content of $0.39 \pm 0.23\%$ w/w. The developed HPLC method demonstrated high specificity and linearity across the concentration range of 2 to 10 $\mu\text{g/mL}$ ($R^2 = 0.9998$). Recovery rates ranged from 97.71% to 103.15%, precision (%RSD) from 0.08% to 0.36%, with LOD and LOQ values of 0.08 and 0.25 $\mu\text{g/mL}$, respectively.

Discussion: Our study on the chemical profile of female cannabis inflorescences and leaves showed varying levels of THC and CBD, while CBD was detected in only a few samples. This variation may be due to differences in strain, cultivation location, and harvesting time. Within the same cultivation site, the female inflorescences contained more THC than the leaves, aligning with previous findings that female inflorescences are the primary site of cannabinoid accumulation in cannabis plants.

Chemical profiling using HPLC enabled the separation of eight standard compounds. Physicochemical quality assessment can serve as a guideline for quality control of medicinal cannabis. Moreover, the development of an HPLC method to quantify THC in female inflorescences and leaves showed high specificity, with excellent linearity, recovery, and precision, meeting accepted pharmaceutical analysis standards. The use of a gradient HPLC system also significantly reduced analysis time.

Conclusion and Recommendation: The physicochemical specifications and the analytical method developed in this study can be used to help establish national standard specification for cannabis female inflorescences and leaves in the Thai Herbal Pharmacopoeia.

Key words: physicochemical, cannabis, quantitative analysis, tetrahydrocannabinol, HPLC

บทนำและวัตถุประสงค์

กัญชาเป็นพืชในวงศ์ Cannabaceae สายพันธุ์ที่พบบ่อย ได้แก่ *Cannabis sativa* L., *C. indica* Lam. และ *C. ruderalis* Janisch^[1] สำหรับสายพันธุ์ที่พบมากในประเทศไทย คือ *C. sativa* L. กัญชาเป็นพืชที่มีการนำมาใช้เป็นยารักษาโรคมาช้านานในรูปแบบตำรับซึ่งปรากฏในตำราแพทย์ศาสตร์สงเคราะห์และตำราโอสถพระนารายณ์ แต่เนื่องจากกัญชามีผลกระทบต่อผู้เสพอย่างมาก จึงถูกยกเลิกการใช้ทางการแพทย์ในประเทศไทย และถูกจัดเป็นยาเสพติดให้โทษในประเภท 5 ตามพระราชบัญญัติยาเสพติดให้โทษ พ.ศ. 2522 ซึ่งการปลูก ครอบครอง จำหน่าย หรือบริโภค ตลอดจนการศึกษาวิจัย ไม่สามารถทำได้ ทำให้ขาดข้อมูลที่ชัดเจนของกัญชา เมื่อมีประกาศพระราชบัญญัติยาเสพติดให้โทษ ฉบับที่ 7 พ.ศ. 2562 ในวันที่ 18 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2562 อนุญาตให้สามารถนำกัญชามาใช้ในกรณีจำเป็น เพื่อประโยชน์ของทางราชการ การแพทย์ การรักษาผู้ป่วย หรือการศึกษาวิจัยและพัฒนาการศึกษาวิจัยทางการแพทย์ได้^[2] และประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่อง กำหนดตำรับยาเสพติดให้โทษในประเภท 5 ที่มีกัญชาปรุงผสมอยู่ ให้เสพเพื่อรักษาโรคหรือการศึกษาวิจัยได้ พ.ศ. 2562

ตำรับยาแผนไทยที่มีส่วนผสมของกัญชาจำนวน 16 ตำรับ ใช้ส่วนต่าง ๆ ของกัญชาเป็นส่วนประกอบ เช่น ยาอัคคินิวคณะ ยาแก้ลมเนาวนารีวัโย ยาน้ำมันสนั่นไทรภพ ยาไฟอาวุธ ยาอัมฤตย์โอสถ ใช้ช่อดอกเพศเมียกัญชาเป็นส่วนประกอบ ส่วนยาสุโขไสยาศน์ ยาแก้ใช้พอมเหลือง ใช้ใบกัญชาเป็นส่วนประกอบ และยาแก้โรคจิต ใช้ก้านกัญชาเป็นส่วนประกอบ มีการรายงานฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา เช่น บรรเทาอาการคลื่นไส้อาเจียนระหว่างทำเคมีบำบัด บรรเทาอาการปวดเรื้อรัง บรรเทาอาการกล้ามเนื้อหดเกร็ง รักษาโรค Tourettes syndrome ด้านลมชัก ลดอาการวิตกกังวล ช่วยในการนอนหลับ^[3-7]

สารที่พบในกัญชามีหลายชนิด ที่สำคัญคือสารกลุ่มแคนนาบินอยด์ ได้แก่ เตตราไฮโดรแคนนาบินอล (tetrahydrocannabinol, THC) แคนนาบิโดล (cannabidiol, CBD) แคนนาบินอล (cannabinol, CBN) แคนนาบิเจอร์อล (cannabigerol, CBG) เตตราไฮโดรแคนนาบิโนลิกแอซิด (tetrahydrocannabinolic acid, THC-A) แคนนาบิเจอร์ิกแอซิด (cannabigerolic acid, CBG-A) แคนนาบิโครมีน (cannabichromene, CBC) แคนนาบิไดโวลิกแอซิด (cannabidiolic acid, CBD-A) สารกลุ่มเทอร์พีน

ได้แก่ เบต้า-เมอ์ซีน (β -myrcene) และลิโมนีน (limonene)^[8-9] ซึ่งสารเตตราไฮโดรแคนนาบินอล นอกจากมีฤทธิ์ทางการแพทย์แล้วยังเป็นสารที่ทำให้เกิดฤทธิ์ที่ไม่พึงประสงค์ เช่น อาการทางระบบประสาท อาการทางจิตเวช อาการทางระบบทางเดินอาหาร^[10]

เนื่องจากยังไม่มีข้อกำหนดมาตรฐานในการควบคุมคุณภาพของช่อดอกเพศเมียและใบกัญชา การศึกษาวิจัยนี้ จึงได้ดำเนินการศึกษาคุณภาพทางเคมี ฟิสิกส์ของกัญชาไทย เพื่อใช้ในการควบคุมคุณภาพของกัญชาให้ได้มาตรฐาน สามารถนำกัญชาไทยมาใช้รักษาโรคในรูปแบบสมุนไพรได้ ลดการนำเข้ายาจากต่างประเทศเป็นการลดการใช้จ่ายด้านสุขภาพ สามารถพึ่งพาตนเองได้ และใช้เป็นข้อมูลในการจัดทำ

monograph ในตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทยเพื่อประโยชน์ในการควบคุมคุณภาพสมุนไพรกัญชาไทยต่อไป

ระเบียบวิธีศึกษา

1. ตัวอย่างกัญชา

เก็บตัวอย่างช่อดอกเพศเมียกัญชา จำนวน 23 ตัวอย่าง และใบกัญชา จำนวน 16 ตัวอย่าง ระหว่างปี พ.ศ. 2563-2564 อบให้แห้งที่อุณหภูมิ 45°C บดเป็นผงละเอียดและร่อนด้วยร่อน 180 μ m เก็บในขวดสีชา ปิดสนิท รวบรวมและแหล่งเก็บตัวอย่าง (Table 1-2)

Table 1 Source of female inflorescences of *C. Sativa*

Sample No.	Source
1	Samoeng, Chiang Mai
2	Samoeng, Chiang Mai
3	Kut Bak, Sakon Nakhon
4	Mueang, Sakon Nakhon
5	Mueang, Sakon Nakhon
6	Phon Na Kaeo, Sakon Nakhon
7	Akat Amnuai, Sakon Nakhon
8	Umphang, Tak
9	Sam Ngao, Tak
10	Chawang, Nakhon Si Thammarat
11	Chawang, Nakhon Si Thammarat
12	Ron Phibun, Nakhon Si Thammarat
13	Mueang, Chiang Rai
14	Mueang, Nakhon Ratchasima
15	Mueang, Nonthaburi
16	Mueang, Nonthaburi
17	Pak Thong Chai, Nakhon Ratchasima
18	Mueang, Nonthaburi
19	Mueang, Sakon Nakhon
20	Mueang, Nakhon Ratchasima
21	Mueang, Udon Thani
22	Chae Hom, Lampang
23	Hang Dong, Chiang Mai

Table 2 Source of leaves of *C. Sativa*

Sample No.	Source
1	Samoeng, Chiang Mai
2	Kut Bak, Sakon Nakhon
3	Mueang, Sakon Nakhon
4	Dok Khamtai, Phayao
5	Mueang, Nonthaburi
6	Mueang, Nonthaburi
7	Mueang, Nonthaburi
8	Mueang, Sakon Nakhon
9	Mueang, Udon Thani
10	Chawang, Nakhon Si Thammarat
11	Chae Hom, Lampang
12	San Sai, Chiang Mai
13	Mueang, Nonthaburi
14	Mueang, Nakhon Ratchasima
15	Klaeng, Rayong
16	Ko Chan, Chonburi

2. วัสดุ

1. สารเคมีและตัวทำละลาย

โซเดียมไบคาร์บอเนต (sodium bicarbonate; Fisher, USA) ฟาสต์บลูปีซอลท์ (fast blue B salt; Spectrum chemical, USA) ไดเอทิลอีเทอร์ (diethyl ether; RCI Labscan, Thailand) อะซีติกแอนไฮไดรด์ (acetic anhydride; J.T. baker, USA) กรดไตรฟลูออโรอะซีติก (trifluoroacetic acid; Sigma, USA)

กรดกำมะถัน (sulfuric acid) กรดเกลือ (hydrochloric acid) ปีโตรเลียมอีเทอร์ (petroleum ether 60-80 °C) เมทานอล (methanol) อะซีโตนไทรล์ (acetonitrile) คลอโรฟอร์ม (chloroform) เอทานอล (absolute ethanol; Merck, Germany) น้ำปราศจากไอออน

2. สารมาตรฐาน

เตตราไฮโดรแคนนาบินอล (tetrahydrocannabinol, THC; Lipomed, USA) แคนนาบิไดโอล (cannabidiol, CBD; Department of medical sciences, Thailand) แคนนาบินอล (cannabinol, CBN; THCPharm, Germany) แคนนาบิเจอร์อล (cannabigerol, CBG) กรดเตตราไฮโดรแคนนาบินอิก (tetrahydrocannabinolic acid, THC-A) กรดแคนนาบิเจอร์อิก (cannabigerolic acid, CBG-A) แคนนาบิโครมีน (cannabichromene, CBC) กรดแคนนาบิไดโอลิก (cannabidiolic acid, CBD-A; Cayman chemical, USA)

3. วัสดุวิทยาศาสตร์และเครื่องแก้ว

แผ่นที่แอลซีชนิดกระจกเคลือบซิลิกาเจล 60 จีเอฟ 254 ความหนา 0.25 mm (Merck, Germany)

กระดาษกรอง เบอร์ 4 (Whatman, UK) คอลัมน์เอชพีแอลซี CORTECS shield RP18 (Waters, USA) กระดาษกรองปราศจากเถ้า เบอร์ 41 (Whatman, UK) กระดาษลิทมัส แผ่นกรองชนิดไนลอน 0.45 μm โดติดความชื้น ถึงสำหรับที่แอลซี ขวดล้างสาร ขวดรูปชมพู่ ถ้วยกระเบื้อง ถ้วยระเหย ขวดปรับปริมาตร ขวดบรรจุสาร ข้อนตักสาร ปิเปต กระบอกตวง หลอดทดลอง กระบอกฉีดยา

4. เครื่องมือ

เครื่องชั่งไฟฟ้าความละเอียด 0.1 ถึง 0.01 mg (Mettler Toledo AX205, Switzerland) อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Contherm, New Zealand) เครื่องอัลตราโซนิก (Branson 3200, USA) เตาอบร้อน (Mettler UNE400, Germany) เตาไฟฟ้า (Daihan, Korea) เตาเผาอุณหภูมิสูง (Carbolite AAF11/18, UK) เครื่องเขย่าสาร (New Brunswick Innova 2300, USA) เครื่องสปอตแผ่นที่แอลซีแบบอัตโนมัติ (Camag ATS4, Switzerland) เครื่องบันทึกภาพสำหรับแผ่นที่แอลซีแบบกลิ้ง (Camag Reprostar 3, Switzerland) เครื่องเอชพีแอลซี (Waters Alliance e2695, USA) เครื่องกรองน้ำแบบอัลตราฟิลเทรชัน (Heal Force Smart Plus NE, China)

3. วิธีการศึกษา

1. การตรวจเอกลักษณ์ทางเคมี

1.1 การตรวจสอบเบื้องต้นโดยปฏิกิริยาการเกิดสี^[11-13]

ซึ่งผงตัวอย่างช่อดอกเพดเมียหรือใบกัญชา น้ำหนัก 100 mg สกัดด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์ปริมาตร 10 mL โดยการแช่หมักตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 10 นาที นำไปกรอง ได้สารละลายตัวอย่าง นำไปทดสอบดังนี้

1.1.1 ปฏิกิริยากับสารละลาย 0.5% ฟอสต์บรูปีซอลท์

สารละลายตัวอย่าง ปริมาตร 1 mL ระเหยจนแห้ง ละลายด้วยเมทานอล ปริมาตร 1 mL หยดสารละลายทดสอบ 0.5% ฟอสต์บรูปีซอลท์ จำนวน 1 หยด และ 10% โซเดียมไบคาร์บอเนต จำนวน 1 หยด สารละลายเปลี่ยนเป็นสีส้มแดง เนื่องจากสารกลุ่มแคนนาบินอยด์

1.1.2 ปฏิกิริยาไลเบอร์แมน-เบอร์ชาร์ด (Liebermann-Burchard)

สารละลายตัวอย่าง ปริมาตร 1 mL ระเหยจนแห้ง ละลายด้วยอะซิติกแอนไฮไดรด์ ปริมาตร 1 mL เติมนครดกามะถัน ปริมาตร 1 mL ชำแหละอย่างช้า ๆ ให้สารละลายแยกเป็น 2 ชั้น สารละลายชั้นบนเปลี่ยนเป็นสีเขียวเนื่องจากสารกลุ่มเทอร์พีน

1.2 การตรวจเอกลักษณ์ทางเคมีด้วยวิธีที่แอลซี (Thin Layer Chromatography; TLC)^[11-13]

1.2.1 สารละลายตัวอย่าง

ซึ่งผงตัวอย่างช่อดอกเพดเมียหรือใบกัญชา น้ำหนัก 100 mg สกัดด้วยเมทานอล ปริมาตร 5 mL โดยเขย่าเป็นเวลา 10 นาที นำไปกรอง ได้สารละลายตัวอย่าง

1.2.2 สารละลายมาตรฐาน

1) เตตราไฮโดรแคนนาบินอลในเมทานอล ความเข้มข้น 1 mg/mL

2) แคนนาบิไดโอดอลในเมทานอล ความเข้มข้น 1 mg/mL

1.2.3 ระบบที่แอลซี

วัฏภาคคงที่ ซิลิกาเจล 60 จีเอฟ 254, ความหนา 0.25 mm

วัฏภาคเคลื่อนที่ ส่วนผสมของ

ปิโตรเลียมอีเทอร์ (60-80 °C) และ ไดเอทิลอีเทอร์
อัตราส่วน 8:2

ระยะทาง 8 cm

ปริมาตรวิเคราะห์ 10 μ L/band สำหรับ

สารละลายตัวอย่าง

5 μ L/band สำหรับ

สารละลายมาตรฐาน

การตรวจวัด 1) ฟันด้วยน้ำยาฟอส 0.5%

ฟอสต์บลูปีซอลท์

1.3 การตรวจเอกลักษณ์ทางเคมีด้วยวิธี
เอชพีแอลซี (High Performance Liquid Chroma-
tography; HPLC)

1.3.1 สารละลายตัวอย่าง

ซึ่งผงตัวอย่าง ช่อดอกเพชเมีย น้ำหนัก
200 mg หรือใบกัญชา น้ำหนัก 400 mg

เติมอะซีโตนไตรลล์ ปริมาตร 20 mL
สกัดโดยใช้เครื่องอัลตราโซนิกเป็นเวลา 20 นาที

นำไปกรองผ่านแผ่นกรองไนลอน 0.45
 μ m ได้สารละลายตัวอย่าง

1.3.2 สารละลายมาตรฐาน

ละลายสารละลายมาตรฐาน 8 ชนิด
ได้แก่ เตตราไฮโดรแคนนาบินอล แคนนาบิไดออล
แคนนาบินอล แคนนาบิเจอร์อล กรดเตตระไฮโดร-
แคนนาบิโนลิก กรดแคนนาบิเจอร์อริก แคนนาบิ-
โครมิน และกรดแคนนาบิไดออลิก ด้วยเมทานอล ให้
ได้ความเข้มข้น 1 mg/mL

การคำนวณ

$$\text{ปริมาณความชื้น (\% w/w)} = \left(\frac{m_s - m_R}{m_s} \right) \times 100$$

โดยที่

m_s คือ น้ำหนักของตัวอย่าง (g)

m_R คือ น้ำหนักคงที่ของตัวอย่างหลังการอบ (g)

1.3.3 ระบบเอชพีแอลซีแบบอัตราส่วน
วัฏภาคเคลื่อนที่คงที่ (isocratic elu-
tion)

วัฏภาคคงที่ คอลัมน์ CORTECS
shield RP18 ขนาดอนุภาค 2.7 μ m เส้นผ่าน
ศูนย์กลางภายใน 4.6 mm ยาว 150 mm

วัฏภาคเคลื่อนที่ ส่วนผสมของอะซีโตน
ไตรลล์ และสารละลาย 0.1% กรดไทรฟลูออโร-
อะซีติก อัตราส่วน 59:41

อุณหภูมิตัวอย่าง 30 °C

อุณหภูมิคอลัมน์ 35 °C

อัตราการไหล 1.0 mL/min

ปริมาตรวิเคราะห์ 5 μ L

เวลาที่ใช้วิเคราะห์ 60 min

การตรวจวัด แสงอัลตราไวโอเล็ต
ความยาวคลื่น 228 nm

2. การประเมินคุณลักษณะทางเคมีฟิสิกส์

2.1 ปริมาณความชื้น^[14]

ซึ่งผงตัวอย่าง น้ำหนัก 5 g (ซึ่งอย่างละเอียด
เทคนิค 4 ตำแหน่ง) ใส่ในขวดซึ่งที่ทราบน้ำหนัก
แน่นอนนำไปอบที่อุณหภูมิ 105 °C เป็นเวลา 5 ชั่วโมง
ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นแล้วชั่งน้ำหนัก จากนั้นนำไปอบซ้ำที่
อุณหภูมิ 105 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็น แล้ว
ชั่งน้ำหนัก ทำซ้ำจนได้น้ำหนักคงที่ (น้ำหนักที่ได้จาก
การชั่ง 2 ครั้งติดต่อกัน มีค่าความแตกต่างไม่เกิน 2.5
mg/g)

2.2 ปริมาณเถ้า^[14]

2.2.1 ปริมาณเถ้ารวม

ซึ่งผงตัวอย่าง น้ำหนัก 2 g (ซึ่งอย่างละเอียด ทศนิยม 4 ตำแหน่ง) ใส่ในถ้วยกระเบื้องที่ทราบน้ำหนักแน่นอน เฝ้านในเตาเผา โดยค่อย ๆ เพิ่มอุณหภูมิ จนถึง $450 \pm 25^\circ\text{C}$ จนเกิดการเผาไหม้อย่างสมบูรณ์ จะได้เถ้าสีขาว (เถ้าปราศจากคาร์บอน) ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วชั่งน้ำหนัก ถ้ายังไม่ได้เถ้าสีขาวให้ตั้งถ้วยกระเบื้องทิ้งไว้ให้เย็น ค่อย ๆ เติมน้ำกลั่นประมาณ 2 mL นำไประเหยแห้งบนอ่างน้ำร้อน แล้วนำมาเผาซ้ำอีกครั้ง

การคำนวณ

$$\text{ปริมาณเถ้า (\% w/w)} = \frac{m_R}{m_S} \times 100$$

โดยที่

m_S คือ น้ำหนักของตัวอย่าง (g)

m_R คือ น้ำหนักคงที่ของเถ้า (g)

2.2.2 ปริมาณเถ้าที่ไม่ละลายในกรด

นำถ้วยกระเบื้องที่มีเถ้าสีขาว จากข้อ

2.2.1 มาเติมกรดเกลือที่มีความเข้มข้น 2 M ปริมาณ 25 mL ปิดฝาถ้วยกระเบื้องด้วยกระดาษฟิวส์ แล้วนำไปต้มเป็นเวลา 5 นาที กรองด้วยกระดาษกรองชนิดที่ปราศจากเถ้า ล้างตะกอนด้วยน้ำร้อนจนน้ำล้างตะกอนมีความเป็นกลางเมื่อทดสอบด้วยกระดาษลิตมัส จากนั้นนำกระดาษกรองที่มีเถ้าอยู่ใส่ในถ้วยกระเบื้องใบเดิม นำไประเหยแห้งบนเตาไฟฟ้า จากนั้นนำไปเผาที่อุณหภูมิ $500 \pm 25^\circ\text{C}$ เป็นเวลา 8 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วชั่งน้ำหนัก

การคำนวณ

$$\text{ปริมาณเถ้าที่ไม่ละลายในกรด (\% w/w)} = \frac{m_R}{m_S} \times 100$$

โดยที่

m_S คือ น้ำหนักของตัวอย่าง (g)

m_R คือ น้ำหนักคงที่ของเถ้า (g)

2.3 ปริมาณสารสกัดด้วยตัวทำละลาย^[14]

2.3.1 ปริมาณสารสกัดด้วยน้ำ

เตรียมน้ำที่อิมัลชันด้วยคลอโรฟอร์ม (chloroform-water) โดยเติมคลอโรฟอร์ม ปริมาตร 2.5 mL ลงในขวดปริมาตร (volumetric flask) ขนาด 1,000 mL ปรับจนครบปริมาตรด้วยน้ำที่ปราศจากไอออน

สกัดผงตัวอย่าง น้ำหนัก 5 g (ซึ่งอย่างละเอียด ทศนิยม 4 ตำแหน่ง) ด้วยน้ำที่อิมัลชันด้วยคลอโรฟอร์ม จำนวน 100 mL ในขวดแก้วที่มีฝาปิดสนิท เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยเขย่าด้วยเครื่องเขย่าสาร (shaker) เป็นเวลา 6 ชั่วโมง แล้วตั้งทิ้งไว้ 18 ชั่วโมง จากนั้น กรองผ่านกระดาษกรองอย่างรวดเร็ว แล้วนำสารละลายที่กรองได้ ปริมาตร 20 mL ใส่ในถ้วยระเหยที่ทราบน้ำหนักแน่นอน นำไประเหยแห้งบนอ่างน้ำร้อนจนแห้ง จากนั้นนำไปอบที่อุณหภูมิ 105°C จนได้น้ำหนักคงที่ (น้ำหนักที่ได้จากการชั่ง 2 ครั้งติดต่อกัน มีค่าความแตกต่างไม่เกิน 0.5 mg/g)

การคำนวณ

$$\text{ปริมาณสารสกัดด้วยตัวทำละลาย (\%w/w)} = \frac{m_R \times 5}{m_S} \times 100$$

โดยที่

m_S คือ น้ำหนักของตัวอย่าง (g)

m_R คือ น้ำหนักคงที่ของสารสกัดหลังการอบ (g)

2.3.2 ปริมาณสารสกัดด้วยเอทานอล

ปริมาณสารสกัดด้วยเอทานอล ทำเช่นเดียวกับการวิเคราะห์ปริมาณสารสกัดด้วยน้ำ แต่ใช้เอทานอลความเข้มข้น 95% แทนน้ำที่อิมัลชันด้วยคลอโรฟอร์ม

2.4 ปริมาณสารเตตราไฮโดรแคนนาบินอล

2.4.1 การทำกราฟมาตรฐาน

1) ปิเปตสารมาตรฐานเตตรา-

ไฮโดรแคนนาบินอล ปริมาตร 1 mL ลงในขวดปรับปริมาตร ขนาด 50 mL ปรับปริมาตรจนครบด้วยอะซีโตนไไตรล์ จะได้สารละลายมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 20 $\mu\text{g/mL}$

2) ปิเปตสารละลายมาตรฐานจากข้อ 1) ปริมาตร 1, 2, 3, 4 และ 5 mL ลงในขวดปรับปริมาตร ขนาด 10 mL แยกแต่ละขวด แล้วปรับปริมาตรจนครบด้วยอะซีโตนไไตรล์ ได้สารละลายมาตรฐานเตตราไฮโดรแคนนาบินอล ที่มีระดับความเข้มข้น 2, 4, 6, 8 และ 10 $\mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ

3) นีตสารละลายมาตรฐานความเข้มข้นละ 3 ขั้ว ด้วยเครื่องเอชพีแอลซี สร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐานเตตราไฮโดรแคนนาบินอลกับพื้นที่ใต้กราฟได้สมการถดถอยเชิงเส้น (linear regression)

2.4.2 ซั่งผงตัวอย่าง ช่อดอกเพศเมีย น้ำหนัก 200 mg หรือใบกัญชา น้ำหนัก 400 mg ลงในขวดรูปชมพู่ เต็มอะซีโตนไไตรล์ ปริมาตร 20 mL สกัดในอ่างน้ำความถี่สูงเป็นเวลา 20 นาที นำไปกรองผ่านแผ่นกรองไนลอนขนาด 13 mm ปิเปตสารละลายที่กรองได้ ปริมาตร 1 mL ใส่ในขวดปรับปริมาตรขนาด 20 mL ปรับปริมาตรด้วยอะซีโตนไไตรล์ได้สารละลาย

ตัวอย่าง นำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องเอชพีแอลซี

2.4.3 ระบบเอชพีแอลซีแบบเกรเดียนต์ (gradient elution)

วัฏภาคคงที่ คอลัมน์CORTECSshield RP18 ขนาดอนุภาค 2.7 μm เส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 4.6 mm ยาว 150 mm

วัฏภาคเคลื่อนที่ A. อะซีโตนไไตรล์
B. สารละลาย 0.10% กรดไตรฟลูออโรอะซีติก

อุณหภูมิตัวอย่าง 30°C

อุณหภูมิคอลัมน์ 35°C

อัตราการไหล 1.8 mL/min

ปริมาตรวิเคราะห์ 25 μL

เวลาที่ใช้วิเคราะห์ 15 min

การตรวจวัด แสงอัลตราไวโอเลต ความยาวคลื่น 228 nm

การชะ (elution) แบบเกรเดียนต์ โดยอัตราส่วนของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่เวลาต่าง ๆ (Table 3)

Table 3 Mobile phase constituent ratios with time

Time (min)	A. acetonitrile	B. 0.1% trifluoroacetic acid
0	55.0	45.0
1	55.0	45.0
9	100.0	0.0
11	100.0	0.0
13	55.0	45.0
15	55.0	45.0

การคำนวณ

$$\text{ปริมาณสารเตตราไฮโดรแคนนาบินอล (\%w/w)} = \frac{(A - I) \times D}{S \times m_s} \times 100$$

โดยที่

m_s คือ น้ำหนักของตัวอย่าง (g)

A คือ พื้นที่ใต้กราฟ

I คือ จุดตัดแกน (intercept)

D คือ ปัจจัยการเจือจาง (dilution factor)

S คือ ความชัน (Slope) ของกราฟมาตรฐาน

3. การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ปริมาณสารเตตราไฮโดรแคนนาบินอลโดยวิธีเอชพีแอลซี

3.1 ความเฉพาะเจาะจง (specificity)^[15]

ทำการเปรียบเทียบเวลาที่สารใช้ในการเคลื่อนที่ (retention time) ของเตตราไฮโดรแคนนาบินอลในสารละลายมาตรฐานกับสารละลายตัวอย่าง ข้อดอกเพศเมียหรือใบกัญชาที่สกัดด้วยอะซิโตนไตรล สารละลายตัวอย่างที่ผสมกับสารมาตรฐานเตตราไฮโดรแคนนาบินอล และสารอื่นที่อาจรบกวน

3.2 ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงและช่วงการใช้งาน (linearity and range)^[15]

3.2.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

1) ปิเปตสารมาตรฐานเตตราไฮโดรแคนนาบินอลปริมาตร 1 mL ลงในขวดปรับปริมาตร ขนาด 50 mL ปรับปริมาตรจนครบด้วยอะซิโตนไตรล จะได้สารละลายมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 20 $\mu\text{g/mL}$

2) ปิเปตสารละลายมาตรฐาน จากข้อ 1) ปริมาตร 1, 2, 3, 4 และ 5 mL ลงในขวดปรับปริมาตร ขนาด 10 mL แยกแต่ละขวด แล้วปรับปริมาตรจนครบด้วยอะซิโตนไตรล ได้สารละลายมาตรฐานเตตราไฮโดรแคนนาบินอล ที่มีระดับความเข้มข้น 2, 4, 6, 8 และ 10 $\mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ

3.2.2 นีตสารละลายมาตรฐานทั้ง 5 ระดับความเข้มข้นๆ ละ 3 ซ้ำ นำข้อมูลค่าพื้นที่ใต้กราฟ และความเข้มข้นสร้างสมการถดถอยเชิงเส้น (linear regression)

3.3 ความเข้มข้นน้อยที่สุดที่ตรวจพบได้ (limit of detection; LOD) และความเข้มข้นน้อยที่สุดที่หาปริมาณได้ (limit of quantitation; LOQ)^[15]

สามารถหาได้จากสมการนี้

$$\text{LOD} = \frac{3.3 \times \text{SD of y-intercept}}{S}$$

$$\text{LOQ} = \frac{10 \times \text{SD of y-intercept}}{S}$$

โดยที่

SD of y-intercept คือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของจุดตัดแกน y

S คือ ความชัน (slope) ของกราฟมาตรฐาน

3.4 ความแม่นยำ (accuracy) และ ความเที่ยง (precision)^[15]

3.4.1 สารละลายมาตรฐาน

1) ปิเปตสารมาตรฐานเตตราไฮโดรแคนนาบินอล ความเข้มข้น 1 mg/mL ปริมาตร 10 mL ลงในขวดปรับปริมาตร ขนาด 50 mL ปรับปริมาตรจนครบด้วยอะซิโตนไตรล จะได้สารละลายมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 200 $\mu\text{g/mL}$

2) ปิเปตสารละลายมาตรฐาน จากข้อ 1) ปริมาตร 2, 6, และ 10 mL ลงในขวดปรับปริมาตร ขนาด 200 mL แยกแต่ละขวด ปรับปริมาตรจนครบด้วยอะซิโตนไตรล จะได้สารละลายมาตรฐาน 3 ความเข้มข้น ได้แก่ 2, 6 และ 10 $\mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ

3.4.2 สารละลายตัวอย่าง

ซึ่งผงตัวอย่างช่อดอกเพศเมีย น้ำหนัก 200 mg หรือใบกัญชา น้ำหนัก 400 mg ลงในขวดรูปชมพู่ แบ่งเป็น 2 กลุ่มดังนี้

กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุม เต็มอะซี-โตไนไตรล์ ปริมาตร 20 mL จำนวน 10 ขวด

กลุ่มที่ 2 กลุ่มที่มีการเติมสารมาตรฐาน เต็มสารละลายจากข้อ 3.4.1. ปริมาตร 20 mL 3 ความเข้มข้น ความเข้มข้นละ 6 ขวด

จากนั้น นำไปสกัดในเครื่องอัลตราโซนิก (ultrasonic bath) เป็นเวลา 20 นาที นำไปกรองผ่านแผ่นกรองในลอน ขนาด 13 มิลลิเมตร ได้สารละลายตัวอย่าง

3.4.3 ระบบเอชพีแอลซีแบบเกรเดียนต์ (gradient elution)

วัฏภาคคงที่ คอลัมน์ COR-TECS shield RP18 ขนาดอนุภาค 2.7 μm เส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 4.6 mm ยาว 150 mm

วัฏภาคเคลื่อนที่ A. อะซีโตไนไตรล์

B. สารละลาย 0.1% กรดไตรฟลูออโรอะซีติก

อุณหภูมิตัวอย่าง 30 °C

อุณหภูมิคอลัมน์ 35 °C

อัตราการไหล 1.8 mL/min

ปริมาตรวิเคราะห์ 25 μL

เวลาที่ใช้วิเคราะห์ 15 min

การตรวจวัด แสงอัลตราไวโอเลต

ความยาวคลื่น 228 nm

การชะ (elution) แบบเกรเดียนต์ โดยอัตราส่วนของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่เวลาต่าง ๆ (Table 3)

ผลการศึกษา

1. การตรวจเอกลักษณ์ทางเคมี

1.1 การตรวจสอบเบื้องต้น โดยปฏิกิริยาการเกิดสี

สารละลายตัวอย่างซึ่งได้จากการสกัดช่อดอกเพศเมียหรือใบกัญชาด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์

1.1.1 เมื่อทดสอบด้วยปฏิกิริยากับสารละลาย 0.5% ฟอสต์บรูปีซอลท์ สารละลายเปลี่ยนเป็นสีส้มแดงทุกตัวอย่าง

1.1.2 เมื่อทดสอบด้วยอะซีติกแอนไฮไดรด์ และกรดกำมะถัน สารละลายชั้นบนมีสีเขียวน้ำเงิน และเกิดสีน้ำตาลที่รอยต่อระหว่างชั้นทุกตัวอย่าง

1.2 การตรวจเอกลักษณ์ทางเคมีด้วยวิธีทีแอลซี

เมื่อทำการทดสอบสารมาตรฐานเทียบกับสารสกัดเมทานอลจากช่อดอกเพศเมียหรือใบกัญชา โดยใช้วิธีทีแอลซี พบว่าช่อดอกเพศเมียและใบกัญชามีสารเตตราไฮโดรแคนนาบินอล แคนนาบิไดออล และมีสารในกลุ่มแคนนาบินอยด์อื่นๆ ซึ่งปรากฏเป็นแถบสีน้ำตาลแดงเมื่อพ่นด้วยสารละลาย 0.5% ฟอสต์บรูปีซอลท์ (Figure 1-2)

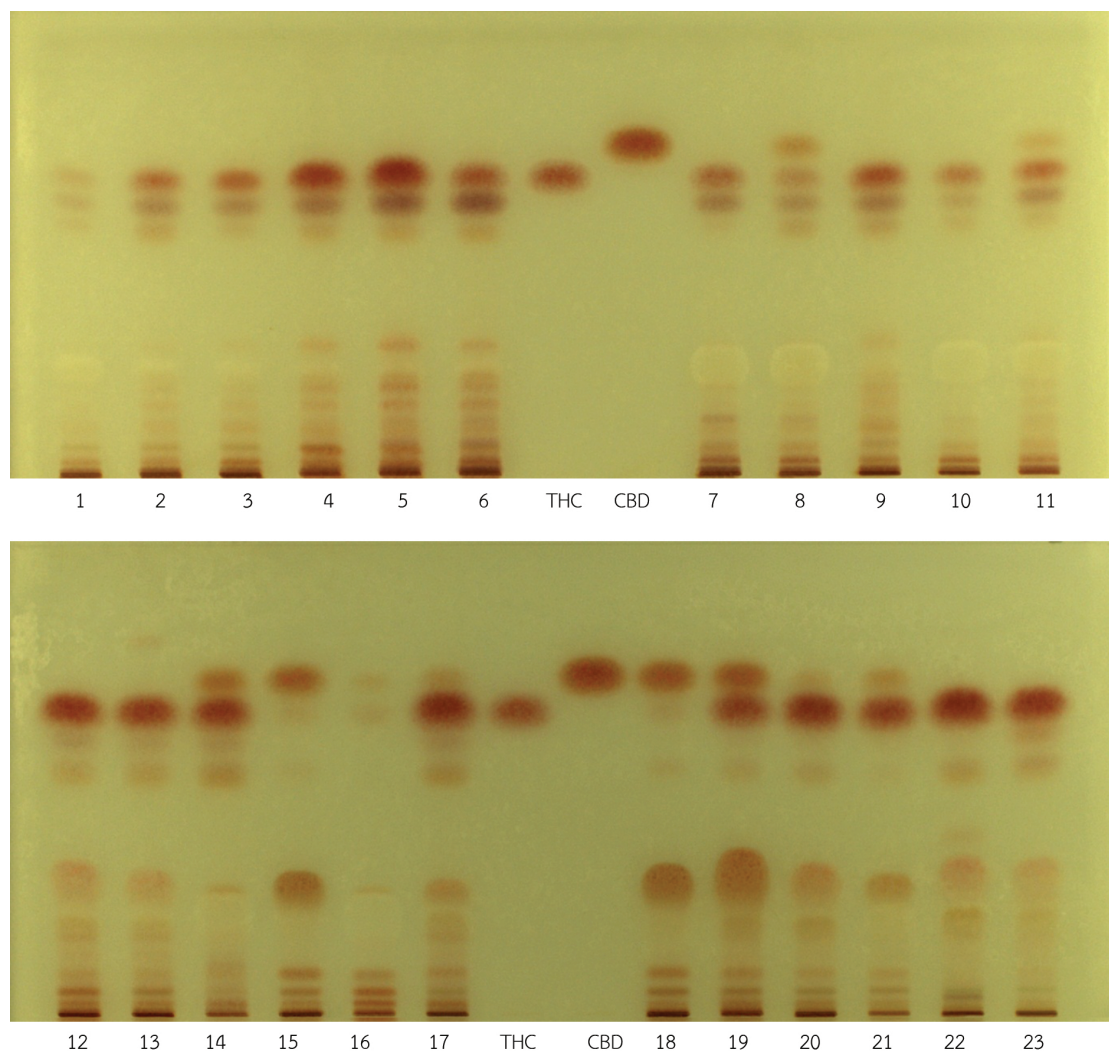


Figure 1 TLC chromatograms of 23 female inflorescences sample of *C. sativa* L.

1-23 = sample No. 1-23

THC = tetrahydrocannabinol in methanol 1 mg/ml

CBD = cannabidiol in methanol 1 mg/ml

Detection = spray with 0.5% fast blue b salt in methanol

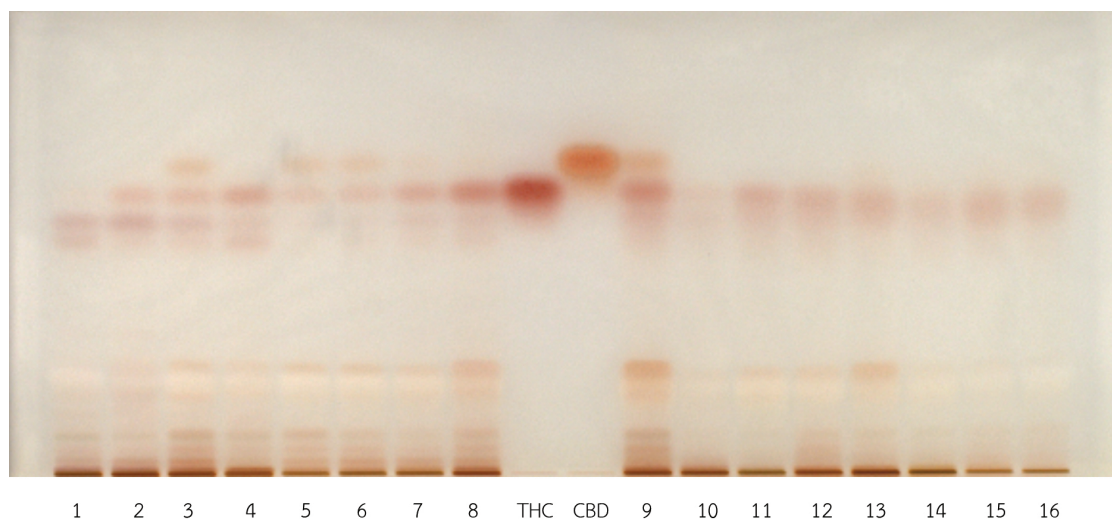


Figure 2 TLC chromatograms of 16 leaves sample of *C. sativa* L.

1-16 = sample No. 1-16

THC = tetrahydrocannabinol in methanol 1 mg/ml

CBD = cannabidiol in methanol 1 mg/ml

Detection = spray with 0.5% fast blue b salt in methanol

การตรวจเอกลักษณ์ทางเคมีด้วยวิธีเอชพีแอลซี เมื่อทำการทดสอบสารมาตรฐานเทียบกับสารสกัด อะซีโตนไตรล์ของช่อดอกกัญชาและใบกัญชาที่ใช้วิธีเอชพีแอลซี พบว่าช่อดอกเพศเมียและใบกัญชา มีสารกลุ่มแคนนาบินอยด์ ได้แก่ แคนนาบิไดออล

(CBD) กรดแคนนาบิไดโอลิก (CBD-A) แคนนาบิเจอร์อล (CBG) แคนนาบินอล (CBN) กรดแคนนาบิเจอร์ิก (CBG-A) เตตราไฮโดรแคนนาบินอล (THC) แคนนาบิโครมิน (CBC) กรดเตตระไฮโดรแคนนาบิโนลิก (THC-A) เป็นองค์ประกอบ (Figure 3-4)

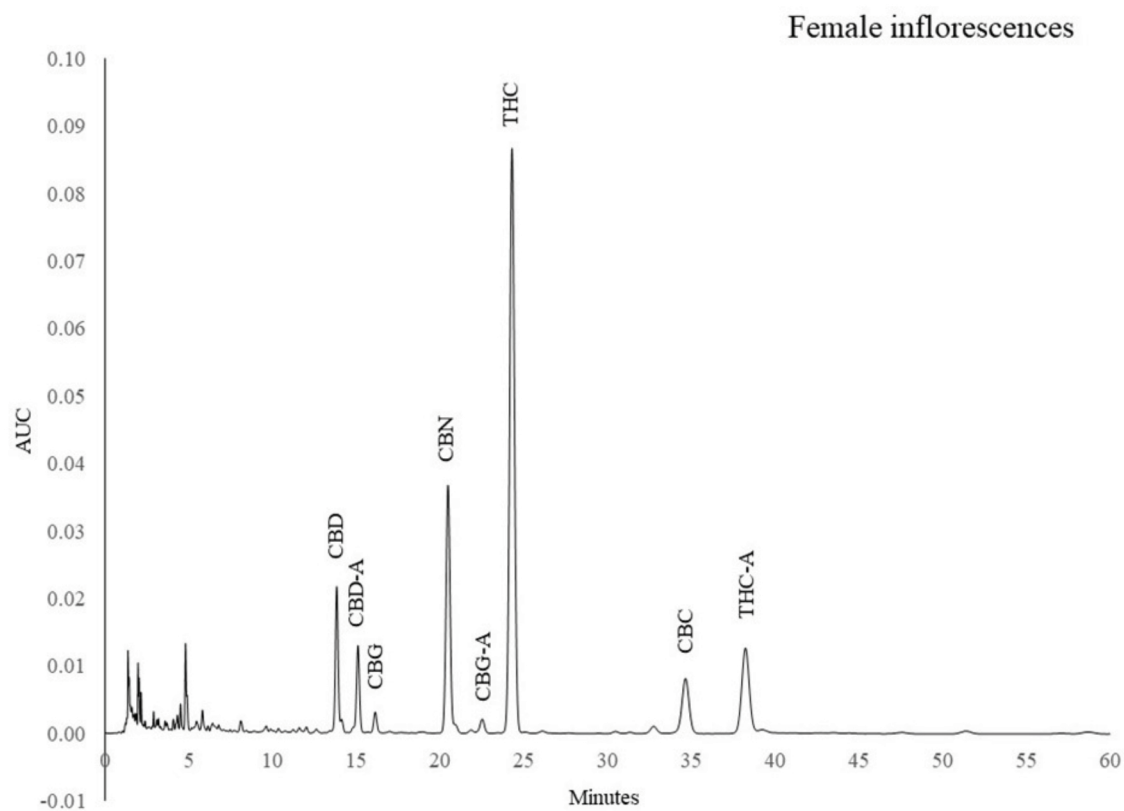


Figure 3 HPLC chromatograms of female inflorescences of *C. sativa* L.

CBD	=	cannabidiol	CBG-A	=	cannabigerolic acid
CBD-A	=	cannabidiolic acid	THC	=	tetrahydrocannabinol
CBG	=	cannabigerol	CBC	=	cannabichromene
CBN	=	cannabinol	THC-A	=	tetrahydrocannabinolic acid

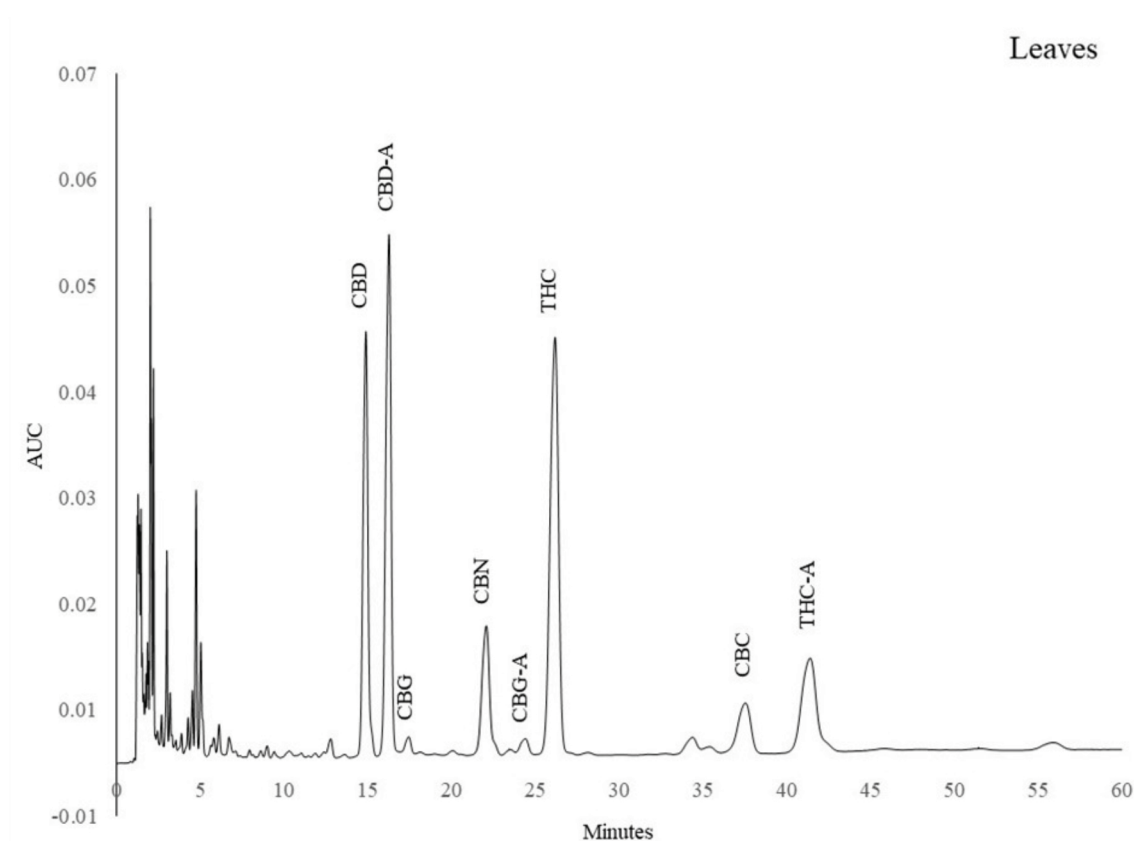


Figure 4 HPLC chromatograms of leaves of *C. sativa* L.

CBD	=	cannabidiol	CBG-A	=	cannabigerolic acid
CBD-A	=	cannabidiolic acid	THC	=	tetrahydrocannabinol
CBG	=	cannabigerol	CBC	=	cannabichromene
CBN	=	cannabinol	THC-A	=	tetrahydrocannabinolic acid

2. การประเมินคุณลักษณะทางเคมีฟิสิกส์

ผลการประเมินคุณลักษณะทางเคมีฟิสิกส์ ได้แก่ ปริมาณความชื้น ปริมาณเถ้ารวม ปริมาณเถ้าที่ไม่ละลายในกรด ปริมาณสารสกัดด้วยน้ำ ปริมาณ

สารสกัดด้วยเอทานอล และปริมาณสารเตตราไฮโดร-แคนนาบินอลของตัวอย่างช่อดอกเพศเมีย จำนวน 23 ตัวอย่าง (Table 4) และใบกัญชา จำนวน 16 ตัวอย่าง (Table 5)

Table 4 Evaluation of physicochemical properties of female inflorescences of *C. sativa* L.

Sample No.	Moisture content (%w/w)	Total ash content (%w/w)	Acid insoluble ash content (%w/w)	Ethanol extractive content (%w/w)	Water extractive content (%w/w)	THC content (%w/w)
1	8.04	12.16	1.23	13.40	21.32	0.26
2	7.46	11.36	1.51	10.84	18.08	1.07
3	7.49	11.56	0.84	14.98	21.67	1.00
4	7.73	15.23	3.90	16.99	16.49	3.43
5	7.66	12.98	1.70	22.94	19.76	5.99
6	8.60	16.22	2.90	17.60	17.51	1.83
7	7.67	11.04	1.65	19.61	15.90	1.24
8	6.27	12.73	1.23	17.88	12.11	0.59
9	8.59	15.51	3.27	18.29	11.24	1.96
10	7.31	10.00	0.43	18.98	22.24	0.83
11	8.15	14.94	1.44	14.60	20.22	0.95
12	8.90	11.21	1.65	20.13	17.64	3.21
13	9.76	10.52	1.37	18.48	19.35	3.10
14	8.59	10.33	1.29	19.72	13.56	2.23
15	7.49	13.07	2.63	18.39	23.44	0.10
16	7.99	14.07	1.55	17.71	20.40	0.11
17	7.92	17.00	4.47	17.32	17.18	3.71
18	7.92	15.63	1.95	16.28	22.04	0.13
19	8.46	13.26	1.62	18.41	23.42	2.23
20	8.17	11.21	1.88	20.09	20.27	2.84
21	8.20	11.69	1.68	20.32	16.39	1.32
22	8.17	12.08	2.27	17.20	18.42	3.97
23	7.53	13.77	2.70	15.49	17.02	2.80
Average	8.00	12.94	1.96	17.64	18.51	1.95
S.D.	0.68	2.03	0.96	2.59	3.33	1.51

Table 5 Evaluation of physicochemical properties of leaves of *C. sativa* L.

Sample No.	Moisture content (%w/w)	Total ash content (%w/w)	Acid insoluble ash content (%w/w)	Ethanol extractive content (%w/w)	Water extractive content (%w/w)	THC content (%w/w)
1	8.23	14.64	1.56	11.17	23.56	0.06
2	6.46	13.95	1.02	15.29	25.27	0.21
3	6.47	14.73	1.42	14.94	24.24	0.21
4	8.54	15.36	2.11	16.34	24.86	0.42
5	8.41	16.80	1.70	12.56	26.02	0.15
6	8.18	16.86	1.29	12.65	28.64	0.18
7	7.95	18.14	1.48	12.34	27.02	0.34
8	8.40	16.24	3.27	19.20	27.32	0.84
9	8.79	17.09	3.01	18.59	24.28	0.80
10	7.25	15.34	0.42	17.25	28.17	0.17
11	8.53	26.29	6.73	11.30	19.10	0.57
12	8.38	18.71	2.31	18.86	27.97	0.51
13	7.27	15.73	2.39	20.54	29.83	0.45
14	7.92	17.11	1.31	15.80	27.02	0.28
15	7.26	20.67	5.04	9.26	26.28	0.48
16	7.28	20.48	4.67	11.90	27.04	0.52
Average	7.83	17.38	2.48	14.88	26.04	0.39
S.D.	0.74	3.07	1.70	3.39	2.54	0.23

จากตารางแสดงปริมาณสารเตตราไฮโดรแคนนาบินอลของตัวอย่างช่อดอกเพศเมีย จำนวน 23 ตัวอย่าง (Table 4) และใบกัญชา จำนวน 16 ตัวอย่าง

(Table 5) สามารถสรุปข้อกำหนดคุณภาพทางเคมี ฟิสิกส์ของช่อดอกเพศเมียและใบกัญชาได้ดังนี้ (Table 6)

Table 6 Physicochemical quality specifications of female inflorescences and leaves of *C. sativa* L.

Physicochemical quality specifications	Female inflorescences	Leaves
Moisture content: not more than	9.00 (%w/w)	9.00 (%w/w)
Total ash content: not more than	15.00 (%w/w)	21.00 (%w/w)
Acid-insoluble ash content: not more than	3.00 (%w/w)	4.00 (%w/w)
Ethanol extractive content: not less than	15.00 (%w/w)	11.00 (%w/w)
Water extractive content: not less than	15.00 (%w/w)	23.00 (%w/w)

3. การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ปริมาณสารเตตราไฮโดรแคนนาบินอลโดยวิธีเอชพีแอลซี

3.1 ความจำเพาะ (specificity)

ทำการเปรียบเทียบเวลาที่สารใช้ในการเคลื่อนที่ของเตตราไฮโดรแคนนาบินอลในสารละลายมาตรฐานเปรียบเทียบกับสารสกัดด้วยอะซิโตนไตรล

ของช่อดอกเพศเมียและใบกัญชา พบว่าเวลาที่สารใช้ในการเคลื่อนที่ของเตตราไฮโดรแคนนาบินอลเท่ากับ 6.62 นาที ซึ่งพบในตัวอย่างช่อดอกเพศเมียและใบกัญชาเช่นกัน และไม่ถูกรบกวนโดยแคนนาบิไดโอล กรดแคนนาบิไดโอลิก และแคนนาบิเจอร์อลซึ่งมีเวลาที่สารใช้ในการเคลื่อนที่เท่ากับ 5.50, 5.68 และ 5.74 นาที ตามลำดับ (Figure 5)

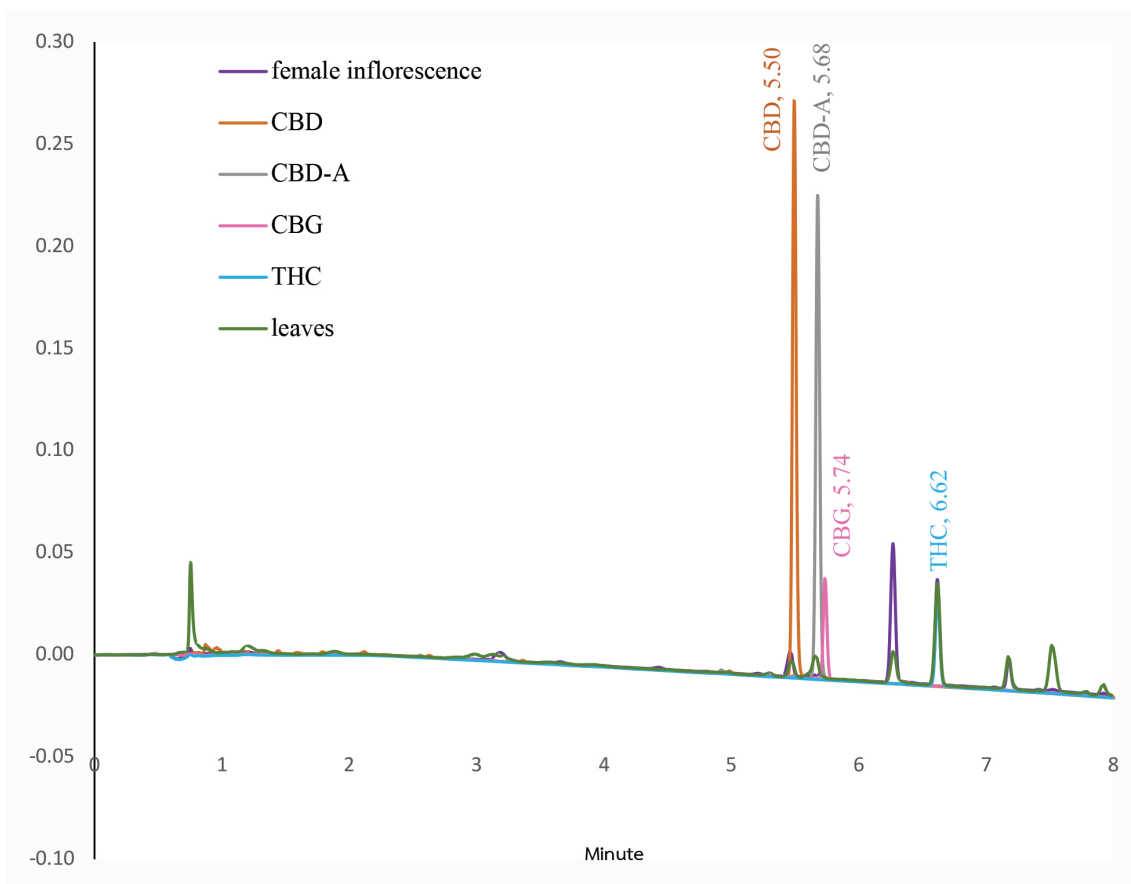


Figure 5 HPLC Chromatograms of tetrahydrocannabinol compared to samples of female inflorescences and leaves of *C. sativa* L.

- CBD = cannabidiol
CBD-A = cannabidiolic acid
CBG = cannabigerol
THC = tetrahydrocannabinol

3.2 ความเป็นเส้นตรง (linear) และช่วงของการวิเคราะห์ (working range)

การวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานเตตราไฮโดรแคนนาบินอลที่ความเข้มข้น 2-10 $\mu\text{g/mL}$ ด้วยเทคนิคเอชพีแอลซี โดยตรวจวัดด้วยแสง

อัลตราไวโอเลตความยาวคลื่น 228 nm เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของเตตราไฮโดรแคนนาบินอลและพื้นที่ใต้กราฟ (AUC) สมการความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงและค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) (Figure 6)

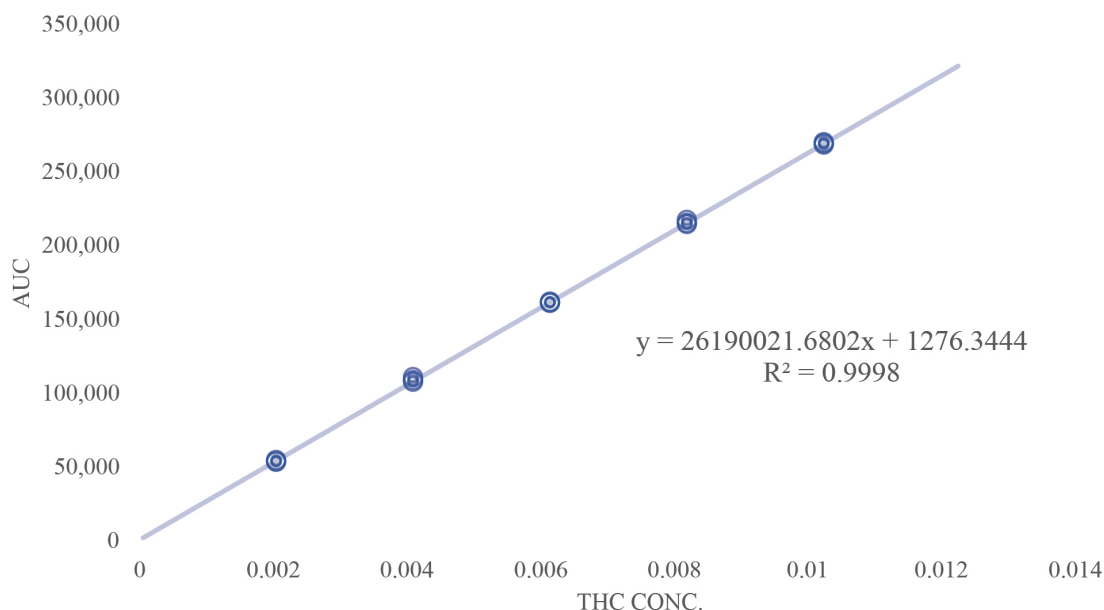


Figure 6 Correlation between concentration of tetrahydrocannabinol (mg/ml) and peak area

3.3 ความเข้มข้นน้อยที่สุดที่ตรวจพบได้ (LOD) และความเข้มข้นน้อยที่สุดที่หาปริมาณได้ (LOQ)

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง เมื่อนำมาหาค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของจุดตัดแกน y (S.D. of y-intercept) มีค่าเท่ากับ 1276.34 เมื่อนำมาแทนค่าในสูตร พบว่า เตตราไฮโดรแคนนาบินอลมีค่า LOD เท่ากับ 0.08 $\mu\text{g/mL}$ และ LOQ เท่ากับ 0.25 $\mu\text{g/mL}$

3.4 ความแม่นยำ (accuracy) และความเที่ยง (precision)

การทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ที่ความเข้มข้นเตตราไฮโดรแคนนาบินอลเท่ากับ 2, 6 และ 10 $\mu\text{g/mL}$ ความเข้มข้นละ 6 ซ้ำ เมื่อนำมาคำนวณหาร้อยละของการกลับคืน (%recovery) และ ร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) (Table 7)

Table 7 Accuracy and precision of tetrahydrocannabinol analysis method

Sample	Conc. ($\mu\text{g/ml}$)	%recovery						Average	%RSD
		1	2	3	4	5	6		
Female inflorescence	2	95.34	97.33	99.70	101.55	102.41	103.55	99.98	0.36
	6	98.74	97.45	99.44	101.07	101.22	101.89	99.97	0.08
	10	100.20	100.34	99.85	100.61	100.51	101.20	100.45	0.11
Leaves	2	97.32	95.31	98.11	98.58	98.55	98.38	97.71	0.31
	6	101.96	101.23	102.24	102.13	102.47	103.41	102.24	0.09
	10	102.28	102.71	103.11	103.33	103.16	104.29	103.15	0.12

อภิปรายผล

การศึกษาเอกลักษณ์ทางเคมีของช่อดอกเพศเมียและใบกัญชาด้วยปฏิกิริยาการเกิดสี พบว่าทุกตัวอย่างมีสารกลุ่มแคนนาบินอยด์เป็นองค์ประกอบ ซึ่งจะให้ผลบวกเป็นสารละลายสีแดงอมส้มกับสารละลาย 0.5% ฟอสฟอรัสโซลท์ และสารกลุ่มเทอร์พีนอยด์ ซึ่งจะให้ผลบวกกับปฏิกิริยาลีเบอร์แมน-เบอร์กฮาร์ด โดยสารละลายชั้นบนมีสีเขียว น้ำเงินและเกิดสีน้ำตาลที่รอยต่อระหว่างชั้น และเมื่อพิสูจน์เอกลักษณ์ทางเคมีด้วยวิธีที่แอลซีเทียบกับสารมาตรฐานเตตราไฮโดรแคนนาบินอลและแคนนาบินไดออล พบว่า บางตัวอย่างพบเตตราไฮโดรแคนนาบินอลในปริมาณน้อย ได้แก่ ใบกัญชาตัวอย่างที่ 1 และ 10 ในขณะที่พบแคนนาบินไดออลเพียงไม่กี่ตัวอย่าง อาจเกิดจากสายพันธุ์ แหล่งปลูก และอายุเก็บเกี่ยว โดยในแหล่งเดียวกันช่อดอกเพศเมียจะพบปริมาณเตตราไฮโดรแคนนาบินอลมากกว่าในใบกัญชา วิธีตรวจสอบเอกลักษณ์ทางเคมีด้วยวิธีเอชพีแอลซีสามารถแยกเตตราไฮโดรแคนนาบินอล แคนนาบินไดออล แคนนาบินออล แคนนาบินเจอรอล กรดเตตระไฮโดรแคนนาบินอิก กรดแคนนาบินเจอโรลิก แคนนา

บิโครมิน และกรดแคนนาบิไดโอลลิกออกจากกันได้ดี ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับการตรวจสอบเอกลักษณ์ทางเคมีด้วยวิธีที่แอลซี

การศึกษาคูณภาพทางเคมีฟิสิกส์มีความสำคัญในการควบคุมคุณภาพของสมุนไพร การควบคุมปริมาณความชื้น เนื่องจากความชื้นมีผลต่อการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์และทำให้สารสำคัญสลายตัวได้ ปริมาณถ้ารวมบ่งบอกถึงปริมาณสารอนินทรีย์ที่มีในสมุนไพรที่เหลืออยู่หลังจากเผาไหม้ซึ่งจะละลายได้ดีในกรดเกลือและการหาปริมาณถ้าที่ไม่ละลายในกรดบ่งบอกถึงการปนเปื้อนสารที่ไม่ละลายในกรดเกลือ เช่น หิน ดิน หวาย การกำหนดปริมาณความชื้น ถ้ารวมและถ้าไม่ละลายในกรด จึงระบุว่า “ไม่เกิน หรือ not more than” ส่วนปริมาณสารสกัดด้วยน้ำและปริมาณสารสกัดด้วยเอทานอลเป็นการหาปริมาณสารสำคัญในเบื้องต้น การกำหนดปริมาณสารสกัดด้วยน้ำและเอทานอล จึงระบุว่า “ไม่น้อยกว่า หรือ not less than” ผลการศึกษาคูณภาพทางเคมีฟิสิกส์ในช่อดอกเพศเมียกัญชา จำนวน 23 ตัวอย่าง มีค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของปริมาณความชื้น ปริมาณถ้ารวม ปริมาณถ้าที่ไม่ละลายในกรด ปริมาณสารสกัด

ด้วยน้ำ และปริมาณสารสกัดด้วยเอทานอล เท่ากับ ร้อยละ 8.00 ± 0.68 , 12.94 ± 2.03 , 1.96 ± 0.96 , 18.51 ± 3.33 , และ 17.64 ± 2.59 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก (w/w) ตามลำดับ ส่วนใบกัญชา จำนวน 16 ตัวอย่าง เท่ากับร้อยละ 7.83 ± 0.74 , 17.38 ± 3.07 , 2.48 ± 1.70 , 26.04 ± 2.54 , และ 14.88 ± 3.39 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก (w/w) ตามลำดับ

ผลการศึกษาปริมาณเตตราไฮโดรแคนนาบินอลในช่อดอกเพศเมียและใบกัญชามีความแตกต่างกันมากสอดคล้องกับข้อมูลที่จะบ่งชี้ช่อดอกเพศเมียเป็นแหล่งสะสมสารแคนนาบินอยด์หลักของพืชกัญชา โดยในช่อดอกเพศเมียมีปริมาณเตตราไฮโดรแคนนาบินอลอยู่ในช่วงร้อยละ 0.10 (จังหวัดนนทบุรี) ถึง 5.99 (จังหวัดสกลนคร) โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก (w/w) ส่วนในใบกัญชามีปริมาณเตตราไฮโดรแคนนาบินอลอยู่ในช่วงร้อยละ 0.06 (จังหวัดเชียงใหม่) ถึง 0.84 (จังหวัดสกลนคร) โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก มีประกาศกระทรวงสาธารณสุขที่กำหนดเกี่ยวกับปริมาณเตตราไฮโดรแคนนาบินอล ได้แก่ สารสกัดจากทุกส่วนของพืชกัญชาที่มีปริมาณสารเตตราไฮโดรแคนนาบินอลไม่เกินร้อยละ 0.2 โดยน้ำหนัก ไม่ถือเป็นยาเสพติด^[16] กัญชงซึ่งเป็นชนิดย่อยของกัญชามีปริมาณเตตราไฮโดรแคนนาบินอลในใบและช่อดอกไม่เกินร้อยละ 1.0 ต่อน้ำหนักแห้ง^[17] ผลิตภัณฑ์อาหารที่มีส่วนประกอบของกัญชาต้องตรวจพบเตตราไฮโดรแคนนาบินอลไม่เกิน 1.6 mg/หน่วยบรรจุ^[18] แต่ไม่พบประกาศที่กำหนดปริมาณเตตราไฮโดรแคนนาบินอลในวัตถุดิบช่อดอกเพศเมียและใบกัญชา เนื่องจากปริมาณเตตราไฮโดรแคนนาบินอลในแต่ละแหล่งมีปริมาณที่ต่างกันมาก และร่างกายหากได้รับเตตราไฮโดรแคนนาบินอลมากเกินไปจะทำให้เกิดผล

ข้างเคียง เช่น เกิดอาการทางประสาท จิตเวชและการเสพติด ดังนั้นการทราบปริมาณเตตราไฮโดรแคนนาบินอลในวัตถุดิบสามารถทำให้แพทย์ปรับปริมาณกัญชาให้เหมาะสมเพื่อลดการเกิดผลข้างเคียงได้

ในส่วนของการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ ปริมาณเตตราไฮโดรแคนนาบินอลในช่อดอกเพศเมียและใบกัญชาด้วยเทคนิคเอชพีแอลซี โดยใช้ระบบ พบว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นมี ความจำเพาะเจาะจงสูง และสามารถวิเคราะห์ในช่วงความเข้มข้น 2-10 $\mu\text{g/mL}$ ได้อย่างแม่นยำ มีความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงสูง ($R^2 = 0.9998$) ซึ่งแสดงถึงความน่าเชื่อถือของวิธี ค่าการคืนกลับ (recovery) อยู่ในช่วง 97.71-103.15% และค่าความเที่ยง (precision) อยู่ในช่วง 0.08-0.36% ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ตามมาตรฐานการวิเคราะห์ทางเภสัชกรรม ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ตรวจพบได้ (LOD) และที่สามารถหาปริมาณได้ (LOQ) เท่ากับ 0.08 และ 0.25 $\mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ แสดงถึงความไวของวิธีวิเคราะห์ และการใช้ระบบเอชพีแอลซีแบบเกรเดียนต์ช่วยลดระยะเวลาในการวิเคราะห์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับวิธีการวิเคราะห์อื่น^[19-20] ซึ่งเป็นประโยชน์ต่อการใช้งานในห้องปฏิบัติการที่ต้องวิเคราะห์ตัวอย่างจำนวนมาก

โดยสรุป การศึกษานี้สามารถกำหนดเกณฑ์คุณภาพของช่อดอกเพศเมียและใบกัญชาไทยได้ และวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนามีความแม่นยำและเชื่อถือได้ สามารถนำไปใช้เป็นแนวทางในการวิเคราะห์ปริมาณเตตราไฮโดรแคนนาบินอลของสารสกัด หรือผลิตภัณฑ์กัญชาได้ รวมถึงเป็นข้อมูลพื้นฐานในการจัดทำมโนกราฟีสำหรับตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทย

ข้อสรุป

การศึกษาคุณภาพทางเคมีฟิสิกส์ของช่อดอกกัญชาและใบกัญชา จำนวน 23 ตัวอย่างและ 16 ตัวอย่าง ตามลำดับ สามารถสรุปเป็นข้อกำหนดคุณภาพดังนี้ การตรวจเอกลักษณ์ทางเคมีด้วยปฏิกิริยาการเกิดสีต้องให้ผลบวกกับสารละลาย 0.5% ฟอสฟอรัสโซลล์ และปฏิกิริยาฮีเบอร์แมน-เบอร์ชาร์ดเมื่อตรวจเอกลักษณ์ทางเคมีด้วยวิธีที่แอลซีต้องพบสารเตตราไฮโดรแคนนาบินอล ข้อกำหนดมาตรฐานของปริมาณความชื้น ปริมาณเถ้ารวม ปริมาณเถ้าที่ไม่ละลายในกรด ปริมาณสารสกัดด้วยน้ำ และปริมาณสารสกัดด้วยเอทานอล ของช่อดอกเพศเมียกัญชา เท่ากับร้อยละ 9.0, 15.0, 3.0, 15.0 และ 15.0 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก ตามลำดับ ส่วนใบกัญชา เท่ากับร้อยละ 9.0, 21.0, 5.0, 23.0 และ 11.0 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก ตามลำดับ ผลการศึกษาคุณภาพทางเคมีฟิสิกส์สามารถนำไปใช้กำหนดมาตรฐานของช่อดอกเพศเมียและใบกัญชาในตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทย และการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณเตตราไฮโดรแคนนาบินอลโดยวิธีเอชพีแอลซีสามารถนำไปใช้เป็นวิธีมาตรฐานในการวิเคราะห์ปริมาณเตตราไฮโดรแคนนาบินอลในช่อดอกเพศเมียและใบกัญชาได้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณนายแพทย์พิเชฐ บุญญ์ติ รองอธิบดีกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ นางศิริวรรณ ชัยสมบุญพันธ์ และนายทรงพล ชีวะพัฒน์ อดีตผู้อำนวยการสถาบันวิจัยสมุนไพร สำหรับการประสานแหล่งปลูกกัญชาที่ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างกัญชา

References

1. Hiilig K. Genetic evidence for speciation in cannabis (Cannabaceae). *Genet Resour Crop Evol.* 2005;52:161-80.
2. Narcotics Act (No. 7) B.E. 2562 (2019). Published in Government Gazette, vol. 136, Part 19A. (2019 Feb 18). (in Thai)
3. Whiting PF, Wolff RF, Deshpande S, Di Nisio M, Duffy S, Hernandez AV, Keurentjes JC, Lang S, Misso K, Ryder S, Schmidtkofer S, Westwood M, Kleijnen J. Cannabinoids for medical use: a systematic review and meta-analysis. *JAMA.* 2015;313(24):2456-73.
4. Goutopoulos A, Makriyannis A. From cannabis to cannabinergics: New therapeutic opportunities. *Pharmacol Ther.* 2002;95(2):103-17.
5. Russo E, Guy GW. A tale of two cannabinoids: the therapeutic rationale for combining tetrahydrocannabinol and cannabidiol. *Med Hypotheses.* 2006;66(2):234-46.
6. Kendall DA, Yudowski GA. Cannabinoid receptors in the central nervous system: their signaling and roles in disease. *Front Cell Neurosci.* 2017;10:294.
7. Russo EB. Cannabinoids in the management of difficult to treat pain. *Ther Clin Risk Manag.* 2008;4(1):245-59.
8. ElSohly MA, Slade D. Chemical constituents of marijuana: The complex mixture of natural cannabinoids. *Life Sci.* 2005;78(5):539-48.
9. Sarana S, Chuda C, Warintorn R, Pensak J. The cannabis terpenes. *Molecules.* 2020;25(24):5792.
10. Wang T, Collet JP, Shapiro S, Ware MA. Adverse effects of medical cannabinoids: a systematic review. *CMAJ.* 2008;178(13):1669-78.
11. Wagner H, Bladt S. Plant drug analysis—A thin-layer chromatography atlas. 2nd ed. Berlin: Springer Verlag; 1996. p. 260-1.
12. United Nations Office on Drugs and Crime (UNODC). Recommended methods for the identification and analysis of cannabis and cannabis products. New York: United Nations; 2009.
13. Jork H, Funk W, Fischer W, Wimmer H. Thin-layer chromatography—Reagents and detection methods. Vol 1a: Physical and chemical detection methods, fundamentals, reagents I. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH; 1990.
14. Department of Medical Sciences, Ministry of Public

- Health. Thai herbal pharmacopoeia. Vol II. Bangkok: The Agricultural Co-operative Federation of Thailand Limited; 2020.
15. Department of Medical Sciences. A practical guide for single laboratory method validation of chemical methods. Ministry of Public Health; 2006. (in Thai)
 16. Notification of the Ministry of Public Health: Specification of Narcotic Drugs in Category 5 B.E. 2565 (2022). Published in Royal Thai Government Gazette. (2022 Feb 9). (in Thai)
 17. Notification of the Narcotic Control Committee: Specification of Hemp Characteristics B.E. 2562 (2019). Published in Royal Thai Government Gazette. (2019 Oct 24). (in Thai)
 18. Notification No. 427 B.E. 2564 (2021) issued under the Food Act B.E. 2522 (1979) regarding food products containing cannabis or hemp components. Published in Royal Thai Government Gazette. (2021 Jul 23). (in Thai)
 19. Brighenti V, Marani M, Caroli C, Bertarini L, Gaggiotti A, Pollastro F, Durante C, Cannazza G, Pellati F. A new HPLC method with multiple detection systems for impurity analysis and discrimination of natural versus synthetic cannabidiol. *Anal Bioanal Chem.* 2024;416:4555-69.
 20. Pathompak P, Chankana N, Vipunungeun N, Phonkrathok S. HPLC method development and validation for quantitation of CBD and THC in Suk-SaiYas Pills. *J Curr Sci Technol.* 2022;12(3):538-46.