

การพัฒนาวิธีวิเคราะห์และการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ หาปริมาณแคนนาบินอยด์ในสารสกัดกัญชาด้วยวิธีโครมาโทกราฟีของเหลว ประสิทธิภาพสูง

ธนวัฒน์ ทองจีน^{*}, สายัณห์ เรืองเขตร, พิรธรรม เทียมเทียบรัตน์, สุภารัตน์ รูปคม,
นวรรตน์ จัดเจน, สันตกิจ นิลอุดมศักดิ์

สถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ อำเภอเมือง นนทบุรี 11000

^{*} ผู้รับผิดชอบบทความ: thanawat.t@dmsc.mail.go.th

บทคัดย่อ

บทนำและวัตถุประสงค์: กัญชา (*Cannabis sativa* L.) ได้ถูกนำมาใช้ทางการแพทย์ตั้งแต่สมัยโบราณ สารสำคัญที่พบในกัญชา คือ เตตราไฮโดรแคนนาบินอล ซึ่งเป็นสารที่ออกฤทธิ์ต่อจิตประสาท และสารที่ไม่ออกฤทธิ์ต่อจิตประสาท เช่น แคนนาบิไดรอล ปัจจุบันกัญชาถูกนำมาใช้เป็นองค์ประกอบทางยาและผลิตภัณฑ์สุขภาพที่หลากหลาย อย่างไรก็ตามยังขาดวิธีการควบคุมคุณภาพสารที่พบในสารสกัดกัญชาอย่างเหมาะสม การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการพัฒนาวิธีการวิเคราะห์ปริมาณแคนนาบินอยด์ในสารสกัดกัญชาด้วยวิธีโครมาโทกราฟีของเหลวประสิทธิภาพสูง (Ultra High Performance Liquid Chromatography: UHPLC)

วิธีการศึกษา: การวิจัยแบ่งเป็น 3 ขั้นตอน ได้แก่ (1) การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณสารแคนนาบิไดรอล และ เตตราไฮโดรแคนนาบินอลในสารสกัดกัญชาด้วยวิธีโครมาโทกราฟีของเหลวประสิทธิภาพสูง (2) การทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ และ (3) การวิเคราะห์ปริมาณสารแคนนาบิไดรอลและเตตราไฮโดรแคนนาบินอลในสารสกัดกัญชา จำนวน 10 ตัวอย่าง

ผลการศึกษา: ผลการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ดังกล่าว พบว่ากราฟมาตรฐานของแคนนาบิไดรอล และเตตราไฮโดรแคนนาบินอล มีลักษณะเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 24.23-290.70 และ 23.98-383.62 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เท่ากับ 0.999, ค่าร้อยละของการคืนกลับอยู่ในช่วง 98.99-100.47 ชัดจำกัดของการตรวจพบของแคนนาบิไดรอล และเตตราไฮโดรแคนนาบินอล มีค่าเท่ากับร้อยละ 1.015 และ 2.135 โดยน้ำหนักของสารสกัดกัญชา (ไมโครกรัม/ไมโครกรัม) ตามลำดับ ในขณะที่ขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณมีค่าเท่ากับร้อยละ 3.382 และ 7.118 โดยน้ำหนักของสารสกัดกัญชา (ไมโครกรัม/ไมโครกรัม) ตามลำดับ

อภิปรายผล: การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณสารแคนนาบิไดรอล และเตตราไฮโดรแคนนาบินอลในสารสกัดกัญชาด้วยวิธี UHPLC ที่พัฒนาขึ้น สามารถใช้ตรวจสอบสารสกัดกัญชา ผลการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์พบว่าทุกค่าอยู่ในเกณฑ์ยอมรับได้ อีกทั้งวิธีนี้ใช้เวลาในการวิเคราะห์ไม่นาน และวิธีการเตรียมตัวอย่างที่ง่าย สะดวก และรวดเร็ว

ข้อสรุป: วิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นนี้มีความเหมาะสม สามารถนำไปใช้เป็นวิธีมาตรฐานสำหรับตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารแคนนาบิไดอล และเตตราไฮโดรแคนนาบิโนลในสารสกัดกัญชา ตลอดจนเป็นข้อมูลพื้นฐานในการกำหนดเกณฑ์ปริมาณสารสำคัญในสารสกัดกัญชาต่อไป

คำสำคัญ: กัญชา, แคนนาบิไดอล, เตตราไฮโดรแคนนาบิโนล, โครมาโทกราฟีของเหลวประสิทธิภาพสูง

Development and Validation of Cannabinoid Quantification Method in *Cannabis sativa* L. Ethanol Extract by Ultra High Performance Liquid Chromatography

Thanawat Thongchin^{*}, Sayan Ruengkhet, Peradhama Thiemthieprat, Sudarat Rupkhom, Nawarat Chadchen, Santakit Ninudomsak

Medicinal Plant Research Institute, Department of Medical Sciences, Tiwanon Road, Muang, Nonthaburi 11000, Thailand

^{*} **Corresponding author:** thanawat.t@dmsc.mail.go.th

Abstract

Introduction and Objective: Cannabis (*Cannabis sativa* L.) has been used for medicinal purposes since ancient time. Tetrahydrocannabinol (THC) is the major psychoactive compound and the other non-psychoactive ingredients are cannabidiol (CBD). Cannabis has been used as an active ingredient in various pharmaceutical and health-related products. However, the appropriate analytical methods for quality control of active compounds in cannabis extracts remain limited. This study aimed to develop and validate an Ultra High Performance Liquid Chromatography (UHPLC) method for the quantification of cannabinoids in cannabis extract samples.

Methods: The study was divided into three steps: (1) developing the UHPLC method for analyzing cannabidiol and tetrahydrocannabinol in cannabis extracts, (2) testing the validity of the analysis method, and (3) analyzing the quantity of cannabidiol and tetrahydrocannabinol in 10 cannabis extract samples.

Results: This method was validated by establishing the linearity for cannabidiol and tetrahydrocannabinol at the concentration range of 24.23-290.70 and 23.98-383.62 $\mu\text{g/mL}$, respectively, with a determination correlation coefficient (r) of 0.999. The % recovery was in the range of 98.99-100.47%. The limit of detection of cannabidiol and tetrahydrocannabinol was 1.015 and 2.135% w/w (calculated on the weight as *C. sativa* extracts, $\mu\text{g}/\mu\text{g}$), respectively, while the limit of quantification were 3.382 and 7.118% w/w (calculated on the weight as *C. sativa* extracts, $\mu\text{g}/\mu\text{g}$), respectively.

Discussion: The method developed for analyzing cannabidiol and tetrahydrocannabinol in cannabis extracts using UHPLC. The validity test result 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 routine quantitative analysis of cannabidiol and tetrahydrocannabinol in cannabis extracts. It can support the establishment of quality specifications for cannabis extracts.

Key words: *Cannabis sativa* L., Cannabidiol, Tetrahydrocannabinol, Ultra High Performance Liquid Chromatography

บทนำและวัตถุประสงค์

กัญชา มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Cannabis sativa* L. จัดอยู่ในวงศ์ Cannabaceae มีชื่อเรียกอื่น เช่น กัญชาจีน, คุณเฒ่า, ปาง, ยานอ, Hashish, Hemp, Indian hemp, Marijuana เป็นต้น จัดเป็นไม้ล้มลุก ต้นตั้งตรง ดอกตัวผู้และดอกตัวเมียแยกกันอยู่คนละต้น มีขนที่มีสารเหนียว ลำต้นเป็นเหลี่ยมเล็กน้อย ใบที่อยู่ใกล้โคนต้นออกเป็นคู่ตรงข้ามกัน ใบที่อยู่ไกลยอดเรียงแบบบันไดเวียน มีหูใบ 2 อัน เป็นรูปเส้นด้ายติดอยู่โคน ก้านใบยาวประมาณ 0.5 เซนติเมตร ตั้งตรง ไม่ร่วงง่าย แผ่นใบเป็นแฉก 5-7 แฉก แต่ละแฉกเป็นรูปหอก ปลายแฉกแหลมเป็นติ่ง โคนแฉกแหลม ขอบหยัก ก้านใบมีขน ดอกตัวผู้ออกเป็นช่อตามง่ามใบและยอด ดอกมีกลีบเพียงชั้นเดียว จำนวน 5 กลีบ ไม่ติดกัน กลีบรูปขอบขนาน ดอกตัวเมีย ออกเดี่ยวตามง่ามใบและยอด แต่ละดอกมีใบประดับสีเขียวเข้ม คล้ายกาบและมีขนเป็นต่อมหุ้มอยู่ ไม่มีกลีบดอก ผลรูปไข่หรือ รูปรี เกือบกลม มีใบประดับหุ้มอยู่ 2 ใบ สรรพคุณของกัญชามีดังนี้ คือ ใบเป็นยาชูกำลัง แก้อ่อนเพลีย เจริญอาหาร กระตุ้นประสาท ทำให้อนหลับ ช่อดอกตัวเมีย ช่วยบำรุงประสาท แก้ปวดประสาท ทำให้เคลิ้มฝัน มีฤทธิ์เป็นยาระงับปวด เมล็ดเป็นยาชูกำลัง ทำให้ประจำเดือนมาปกติ ส่วนลำต้นมีสรรพคุณบำรุงประสาท^[1] กัญชามีส่วนประกอบของสารเคมีมากกว่า 450 ชนิด โดยมากกว่า 60 ชนิดเป็นสารกลุ่มแคนนาบินอยด์ (cannabinoids) มีองค์ประกอบหลักคือ tetrahydrocannabinol (THC) และสารชนิดอื่นในกลุ่มเดียวกัน เช่น cannabinalol (CBN), cannabidiol (CBD), cannabichromene (CBC), cannabigerol (CBG) เป็นต้น^[2,3]

สารสกัดกัญชา (Figure 1) มีสารสำคัญในกลุ่ม

แคนนาบินอยด์อยู่ โดยสารที่เป็นที่รู้จักกันดีนั้นคือ แคนนาบิไดอลและเตตราไฮโดรแคนนาบินอล ซึ่งเป็นสารที่ออกฤทธิ์ กระตุ้นระบบประสาท ฮอริโมน และภูมิคุ้มกันต่าง ๆ สารแคนนาบิไดอล มีลักษณะเป็นผงสีขาว สารเตตราไฮโดรแคนนาบินอล มีลักษณะเป็นของเหลวใส สารแคนนาบิไดอล มีฤทธิ์บรรเทาอาการลมชัก ลดอาการวิตกกังวลทั้งในเด็กกลุ่มอาการออทิสติก หรือในผู้ป่วยที่มีประวัติการเสพติดกัญชา ส่วนสารเตตราไฮโดรแคนนาบินอล มีฤทธิ์แก้ปวด กระตุ้นความอยากอาหารและลดอาการคลื่นไส้จากการใช้เคมีบำบัด ช่วยปกป้องและกระตุ้นการสร้างเซลล์สมอง^[4] สูตรโครงสร้างของแคนนาบิไดอลและเตตราไฮโดรแคนนาบินอล (Figure 2)

ปัจจุบัน การพัฒนาพืชสมุนไพรกัญชาเพื่อประโยชน์ทางการแพทย์ จำเป็นต้องมีการศึกษา การพัฒนาสารสกัด การแยกสารบริสุทธิ์และผลิตภัณฑ์จากกัญชา เพื่อให้สามารถใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ได้อย่างเหมาะสม และในการนำสารสกัดกัญชามาเป็นองค์ประกอบในการปรุงตำรายา ยังไม่มีข้อมูลปริมาณสารสำคัญ ในปี พ.ศ. 2555 มีรายงานการหาปริมาณสารแคนนาบิไดอล แคนนาบินอล และเตตราไฮโดรแคนนาบินอลในกัญชาด้วยวิธี HPLC/UV^[5] แต่เนื่องจากการวิเคราะห์ปริมาณสารกลุ่มแคนนาบินอยด์ในกัญชาด้วยวิธี HPLC/UV จำนวน 1 ตัวอย่างนั้น ใช้เวลานาน คือ 22 นาที ทำให้สิ้นเปลืองวัสดุภาคเคลื่อนที่ (mobile phase) และต่อมาในปี พ.ศ. 2561 มีรายงานการหาปริมาณสารแคนนาบินอยด์ในกัญชาด้วยวิธี HPLC-DAD^[6] และการวิเคราะห์ปริมาณสารกลุ่มแคนนาบินอยด์ในกัญชาด้วยวิธี HPLC-DAD นี้ ใช้เวลานาน ถึง 50 นาที ซึ่งเป็นสาเหตุของการสิ้นเปลืองสารเคมีด้วยเช่นกัน

การวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์ในการพัฒนาวิธีวิเคราะห์สารแคนนาบิไดโอลและเตตราไฮโดรแคนนาบินอลในสารสกัดกัญชา และทดสอบความถูกต้องของวิธีเพื่อให้ได้วิธีมาตรฐานของห้องปฏิบัติการที่มีความถูกต้องแม่นยำ สะดวก รวดเร็วและประหยัดสารเคมีเพื่อใช้ในการประเมินคุณภาพของสารสกัดกัญชา

รวมทั้งการหาปริมาณสารสำคัญที่อยู่ในสารสกัดกัญชาให้สามารถนำไปใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ได้อย่างเหมาะสม นอกจากนี้ยังสามารถใช้ในการวิจัยและพัฒนาตำรับยาและผลิตภัณฑ์จากสารสกัดกัญชาเป็นส่วนผสม รวมถึงเป็นข้อมูลในการเพิ่มมูลค่าของสารสกัดกัญชาทางเศรษฐกิจต่อไป

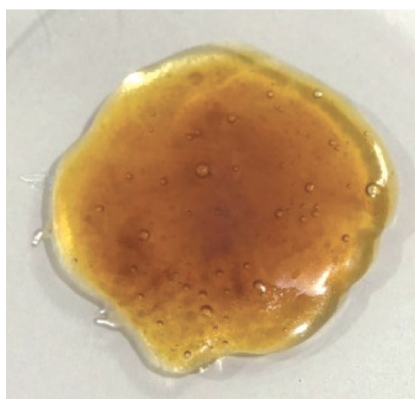
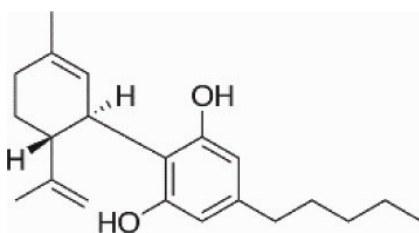
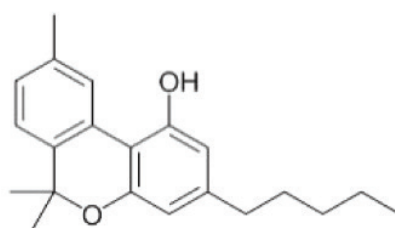


Figure 1 *Cannabis sativa* L. extracts



Cannabidiol (CBD)



Tetrahydrocannabinol (THC)

Figure 2 Chemical structure of cannabidiol and tetrahydrocannabinol

ระเบียบวิธีศึกษา

1. วัสดุ

1.1 ตัวอย่างสารสกัด

สารสกัดกัญชาได้จากการนำช่อดอกกัญชาต้นตัวเมียสด (ซึ่งมีอายุการปลูก 5 เดือน นำมาคัดแยกเอาเฉพาะช่อดอก ล้างด้วยน้ำให้สะอาด ผึ่งให้แห้งที่อุณหภูมิห้องพอหมาด ๆ หั่นให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ และอบให้แห้งด้วยตู้อบร้อนไฟฟ้าที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส นาน 72 ชั่วโมง คัดเลือกเอาเมล็ดออกก่อน นำตัวอย่างที่แห้งแล้วไปบดเป็นผงหยาบ ผ่านร่อนที่มีขนาดช่อง 180 ไมโครเมตร) นำผงช่อดอกกัญชาแห้งจำนวน 50 กรัม สกัดด้วยเอทานอล (ethanol) โดยวิธี Soxhlet extraction นาน 4 ชั่วโมง กรองและนำสารสกัดที่ได้มาระเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ จะได้สารสกัดกัญชามีลักษณะเป็นของหนืดสีน้ำตาลปนเหลือง วัตถุดิบช่อดอกกัญชาถูกรวบรวมจากโครงการศึกษาการปลูกและขยายพันธุ์ต้นกัญชาภายใต้สภาพโรงเรือนแบบปิดของสถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ และมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี วิทยาเขตสกลนคร จำนวน 10 ตัวอย่าง คือ กัญชาพันธุ์ไทย ตะนาวศรีก้านแดงอาร์ดี1 (RD1) ได้แก่ RD1/1, RD1/2, RD1/3, RD1/4, RD1/5, RD1/6, RD1/7, RD1/8, RD1/9 และ RD1/10

1.2 สารมาตรฐาน

สารมาตรฐานแคนนาบิไดออล ความบริสุทธิ์ $\geq 99.9\%$ (THC Pharm GmbH, Batch: S19014)

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

1.3 สารเคมีและตัวทำละลาย

Methanol HPLC grade (RCI Labscan Lim-

ited, 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 4.6×150 มิลลิเมตร, ขนาดอนุภาค 2.7 ไมโครเมตร และ ARC-8, ขนาด 2.1×100 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), เครื่องบดปั่น รุ่น RT 34 (ChyunTseh Industrial), เครื่องแรง รุ่น AS 200 Basic (Retsch), แรงที่มีขนาดช่อง 180 ไมโครเมตร (Endocott), เครื่องระเหยสุญญากาศประกอบด้วย อ่างน้ำแบบควบคุมอุณหภูมิ รุ่น SB-1000 (Eyela) และ rotavapor รุ่น N-1000 (Eyela), เครื่องทำสุญญากาศ รุ่น A-3S (Eyela) และเครื่องทำน้ำเย็นหมุนเวียน รุ่น CA-101 (Eyela) และเครื่องชั่งไฟฟ้า 4 ตำแหน่ง รุ่น XT 220A (Precisa)

2. วิธีการศึกษา

2.1 การพัฒนาวิธีวิเคราะห์และหาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์

2.1.1 การเตรียมสารมาตรฐาน

เตรียมสารละลายมาตรฐานแคนนาบิไดออล และเตตราไฮโดรแคนนาบินอล ความเข้มข้น

100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร นำสารละลายมาตรฐานที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวประสิทธิภาพสูง (UHPLC)

2.1.2 การเตรียมสารละลายตัวอย่าง

นำสารสกัดกัญชา น้ำหนัก 50 มิลลิกรัม ละลายและปรับปริมาตรด้วยเมทานอล (methanol) จนครบ 100 มิลลิลิตร โดยใช้ขวดแก้ววัดปริมาตร (volumetric flask) กรองผ่าน Nylon filter syringe นำสารละลายตัวอย่างสารสกัดที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวประสิทธิภาพสูง

2.1.3 การเลือกใช้ความยาวคลื่นในการตรวจวิเคราะห์สารแคนนาบิไดออล และเตตราไฮโดรแคนนาบินอล

สารสกัดกัญชา น้ำหนัก 50 มิลลิกรัม ละลายและปรับปริมาตรด้วยเมทานอล จนครบ 100 มิลลิลิตร โดยใช้ขวดแก้ววัดปริมาตร กรองผ่าน Nylon filter syringe นำสารละลายตัวอย่างสารสกัดที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวประสิทธิภาพสูง วัดการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลตของแคนนาบิไดออล และเตตราไฮโดรแคนนาบินอล เพื่อดูความยาวคลื่นที่สารชนิดนี้สามารถดูดกลืนแสงสูงสุด (λ_{max}) และวิเคราะห์สารละลายตัวอย่างสารสกัดกัญชาโดยใช้ DAD เพื่อเลือกความยาวคลื่นสำหรับการตรวจวัดแคนนาบิไดออล และเตตราไฮโดรแคนนาบินอล โดยที่ไม่พบการซ้อนทับของ (peak, co-elute)

2.1.4 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

วัฏภาคเคลื่อนที่ คือ ภาชนะและสัดส่วนของวัฏภาคเคลื่อนที่ เมื่อปรับเปลี่ยนองค์ประกอบของวัฏภาคเคลื่อนที่จากน้ำและอะซิโตนไทรล์ เป็น 0.1% ออร์โทฟอสฟอริกแอซิด (0.1% Ortho-phosphoric acid) ในน้ำ และ 0.1% ออร์โทฟอสฟอริกแอซิดในอะซิโตนไทรล์ โดยพิจารณาจาก peak shape และ retention time ของแคนนาบิไดออล และเตตราไฮโดรแคนนาบินอล ความสามารถในการแยกสิ่งเจือปน (impurity) จากพีคของแคนนาบิไดออล และเตตราไฮโดรแคนนาบินอล ในสารละลายตัวอย่างสารสกัดกัญชาและความดันของระบบโครมาโทกราฟี

2.2 การทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (method validation)

ทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ปริมาณแคนนาบิไดออล และเตตราไฮโดรแคนนาบินอลในสารสกัดกัญชาที่พัฒนาขึ้นตามแนวปฏิบัติการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ทางเคมีโดยห้องปฏิบัติการเดี่ยว กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข^[7] และ ICH Harmonised Guideline Validation of Analytical Procedures Q2(R1)^[8]

2.2.1 การทดสอบความจำเพาะ (specificity)

ฉีดสารละลายผสมของสารมาตรฐานแคนนาบิไดออล และเตตราไฮโดรแคนนาบินอล ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวประสิทธิภาพสูง เพื่อตรวจสอบการแยกสารแคนนาบิไดออล และเตตราไฮโดรแคนนาบินอล ออกจากกันและออกจากการรบกวนของสารอื่น ซึ่งต้องมีค่า retention time แยกจากกันได้ดี ค่าพurity และค่า resolution

2.2.2 การทดสอบความเป็นเส้นตรง (linearity) และช่วงการวิเคราะห์ (range)

เตรียมสารละลายสารมาตรฐานจำนวน 2 ชนิด ได้แก่ แคนนาบิไดอล และเตตราไฮโดรแคนนาบินอล โดยชั่งสารมาตรฐาน น้ำหนัก 50 และ 100 มิลลิกรัม ตามลำดับ ละลายและปรับปริมาตรด้วยเมทานอล จนครบ 50 มิลลิลิตร ด้วยขวดแก้ววัดปริมาตร ตามลำดับ จะได้ stock solution ของสารละลายสารมาตรฐานแคนนาบิไดอล และเตตราไฮโดรแคนนาบินอล เข้มข้น 1,000 และ 2,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ปิเปตสารละลายสารมาตรฐานแคนนาบิไดอล และเตตราไฮโดรแคนนาบินอลปริมาตร 1,000 และ 500 ไมโครลิตร ตามลำดับ ใส่ลงในขวดแก้ววัดปริมาตร ขนาด 10 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยเมทานอลจากนั้นเจือจางให้ได้ 5 ระดับความเข้มข้น คือ 25, 50, 100, 200 และ 300 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร จะได้ 5 ระดับความเข้มข้นของสารละลายสารมาตรฐานแคนนาบิไดอล ดังนี้ 24.23, 48.45, 96.90, 193.80 และ 290.70 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และจะได้ 5 ระดับความเข้มข้นของสารละลายสารมาตรฐานเตตราไฮโดรแคนนาบินอล ดังนี้ 23.98, 47.95, 95.90, 191.81 และ 383.62 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ฉีดสารละลายสารมาตรฐาน แคนนาบิไดอล และเตตราไฮโดรแคนนาบินอล ที่ 5 ระดับความเข้มข้น ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวประสิทธิภาพสูง นำค่าพื้นที่ใต้พีค (area under curve, AUC) และความเข้มข้น

ของสารละลายสารมาตรฐานแคนนาบิไดอล และเตตราไฮโดรแคนนาบินอล ไปสร้างกราฟมาตรฐาน (calibration curve) และคำนวณค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient, r)

2.2.3 การทดสอบหาค่าร้อยละของการคืนกลับ (% recovery) และความเที่ยง (precision)

เตรียม sample blank (sample blank คือ ตัวอย่างสารสกัดที่ตรวจวิเคราะห์หาปริมาณ แคนนาบิไดอล และเตตราไฮโดรแคนนาบินอล แล้วมีปริมาณสารแคนนาบิไดอล และเตตราไฮโดรแคนนาบินอล ในปริมาณต่ำ ๆ) โดยชั่งตัวอย่างสารสกัดกัญชา 50 มิลลิกรัม ละลายและปรับปริมาตรด้วยเมทานอล จนครบ 100 มิลลิลิตร โดยใช้ขวดแก้ววัดปริมาตร กรองผ่าน Nylon filter syringe นำสารละลายตัวอย่างที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง โครมาโทกราฟีของเหลวประสิทธิภาพสูง จำนวน 6 ซ้ำ แล้วนำมาหาค่าเฉลี่ย (mean)

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

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

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

เมื่อ C1 คือ ความเข้มข้นของสารใน spiked sample

C2 คือ ความเข้มข้นของสารใน sample blank

C3 คือ ความเข้มข้นของสารที่เติม

การทดสอบความเที่ยง

Repeatability วิเคราะห์ปริมาณสารแคนนาบิไดอล และเตตราไฮโดรแคนนาบินอล ในตัวอย่างสารสกัด กล้วยาเข้มข้น 154 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร จำนวน 10 ซ้ำ ในวันเดียวกัน นำค่าพื้นที่ใต้พีคมาคำนวณปริมาณ สารแคนนาบิไดอล และเตตราไฮโดรแคนนาบินอล และคำนวณค่าร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (% RSD) เกณฑ์การยอมรับ (acceptance criteria) % RSD < 2

Intermediate precision วิเคราะห์ปริมาณ สารแคนนาบิไดอล และเตตราไฮโดรแคนนาบินอล ในตัวอย่างสารสกัดกล้วยาเข้มข้น 154 ไมโครกรัม/ มิลลิลิตร เป็นเวลา 3 วัน วันละ 10 ซ้ำ นำค่าพื้นที่

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

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

เตรียมสารละลาย spiked sample ให้มีความเข้มข้นใกล้เคียงกับค่าประมาณของ LOD แล้ว ตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารแคนนาบิไดอล และเตตราไฮโดรแคนนาบินอล ใน spiked sample 6 ซ้ำ คำนวณ ค่า % RSD และ % recovery เกณฑ์การยอมรับ

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

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

เตรียมสารละลาย spiked sample ให้มีความเข้มข้นใกล้เคียงกับค่าประมาณของ LOQ แล้ว ตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารแคนนาบิไดอล และเตตรา

ไฮโดรแคนนาบินอล ใน spiked sample 6 ซ้ำ คำนวณ ค่า % RSD และ % recovery เกณฑ์การยอมรับ (acceptance criteria) % RSD < 2

2.2.4 การทดสอบขีดจำกัดของการตรวจพบ

(Limit of Detection, LOD)

คำนวณค่าประมาณ (estimated) ของ LOD จาก calibration curve

เตรียมสารละลายตัวอย่างสารสกัดกล้วยา โดยซึ่งตัวอย่างสารสกัดกล้วยา 50 มิลลิกรัม ละลาย และปรับปริมาตรด้วยเมทานอล จนครบ 100 มิลลิลิตร โดยใช้ขวดแก้ววัดปริมาตร กรองผ่าน Nylon filter syringe

(acceptance criteria) % RSD < 2

2.2.5 การทดสอบขีดจำกัดของการวัดเชิง

ปริมาณ (Limit of Quantitation, LOQ)

คำนวณค่าประมาณของ LOQ จาก calibration curve ดังนี้

ไฮโดรแคนนาบินอล ใน spiked sample 6 ซ้ำ คำนวณ ค่า % RSD และ % recovery เกณฑ์การยอมรับ (acceptance criteria) % RSD < 2

2.3 การวิเคราะห์ปริมาณแคนนาบิไดอล และ เตตราไฮโดรแคนนาบินอลในสารสกัดกัญชา

2.3.1 การเตรียมสารละลายตัวอย่างสารสกัดกัญชา

ซึ่งตัวอย่างสารสกัดกัญชา น้ำหนัก 50 มิลลิกรัม ละลายและปรับปริมาตรด้วยเมทานอล จนครบ 100 มิลลิลิตร โดยใช้ขวดแก้ววัดปริมาตร กรองผ่าน Nylon filter syringe นำสารละลาย ตัวอย่างสารสกัดกัญชาที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง

โครมาโทกราฟีของเหลวประสิทธิภาพสูง

วิเคราะห์ปริมาณแคนนาบิไดอล และเตตราไฮโดรแคนนาบินอล ในตัวอย่างสารสกัดกัญชา จำนวน 10 ตัวอย่าง ด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้น โดยที่แต่ละตัวอย่างให้วิเคราะห์ 3 ซ้ำ แล้วนำมาหาค่าเฉลี่ย

การคำนวณความเข้มข้นของสารแคนนาบิไดอล และเตตราไฮโดรแคนนาบินอลในตัวอย่างสารสกัดกัญชา (ร้อยละโดยน้ำหนักของตัวอย่างสารสกัดกัญชา, % 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

การพิสูจน์ว่าการเจือจางนั้นไม่มีผลต่อความถูกต้องของค่าความเข้มข้นนั้น โดยการทำ dilution integrity มีขั้นตอนดังนี้ คือ

1. เตรียมสารละลายตัวอย่างสารสกัดกัญชา

ซึ่งตัวอย่างสารสกัดกัญชา น้ำหนัก 50 มิลลิกรัม ละลายและปรับปริมาตรด้วยเมทานอล จนครบ 100 มิลลิลิตร โดยใช้ขวดแก้ววัดปริมาตร ปิเปตมา 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยเมทานอล จนครบ 25 มิลลิลิตร โดยใช้ขวดแก้ววัดปริมาตร กรองผ่าน Nylon filter syringe นำสารละลายตัวอย่างสารสกัดกัญชาที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวประสิทธิภาพสูง

วิเคราะห์ปริมาณแคนนาบิไดอล และเตตราไฮโดรแคนนาบินอล ในตัวอย่างสารสกัดกัญชาที่เจือจางแล้ว จำนวน 6 ซ้ำ นำมาหาค่าเฉลี่ย และเปรียบเทียบกับค่าความเข้มข้นที่คาดหวังจากการเจือจาง หากค่า

ที่วัดได้ใกล้เคียงกับค่าที่คาดหวัง แสดงว่าการเจือจางไม่ส่งผลต่อความถูกต้องของค่าความเข้มข้น

ผลการศึกษา

1. การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณแคนนาบิไดอล และเตตราไฮโดรแคนนาบินอลในสารสกัดกัญชา

1.1 การศึกษาหาสภาวะของระบบโครมาโทกราฟี

หลังจากนำสารละลายมาตรฐานของสารแคนนาบิไดอล และเตตราไฮโดรแคนนาบินอล และสารละลายตัวอย่างสารสกัดกัญชาไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวประสิทธิภาพสูง พบว่า ได้สภาวะของระบบโครมาโทกราฟีที่เหมาะสมในการแยกสารแคนนาบิไดอล และเตตราไฮโดรแคนนาบินอล (Table 1) โดยสัดส่วนของวัฏภาคเคลื่อนที่แบบ gradient program จะเริ่มที่เวลา นาทีที่ 0.0 ถึง

นาที่ที่ 8.5 ใช้ %A:%B (28:72), นาที่ที่ 8.5 ถึง นาที่ที่ 8.6 ใช้ %A:%B (5:95), นาที่ที่ 8.6 ถึง นาที่ที่ 9.5 ใช้ %A:%B (5:95), นาที่ที่ 9.5 ถึง นาที่ที่ 12.1 ใช้ %A:%B (28:72) และ นาที่ที่ 12.1 ถึง นาที่ที่ 15.0 ใช้ %A:%B (28:72) (Table 2, Figure 3)

Table 1 Optimal Chromatography Conditions for Separation of Cannabidiol and Tetrahydrocannabinol by UHPLC system

Chromatographic parameter	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 for UHPLC analysis

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

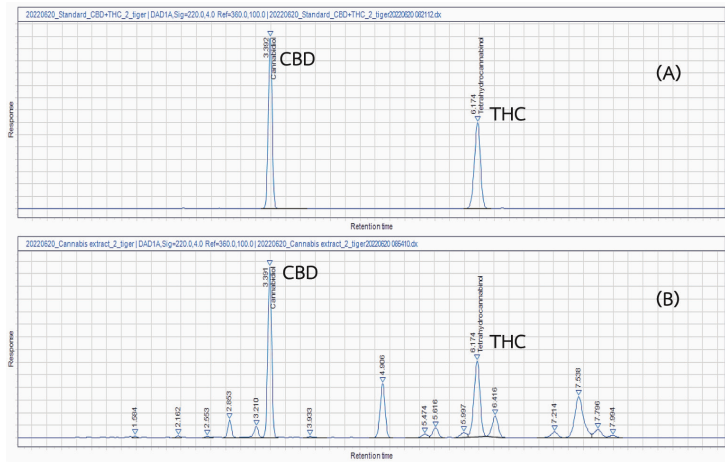


Figure 3 Chromatograms of standard solution of Cannabidiol and Tetrahydrocannabinol (A) and sample solution of Cannabis sativa L. extracts (B)

1.2 ความยาวคลื่นในการตรวจวัดสารแคนนาบิไดออล และเตตราไฮโดรแคนนาบินอล

จากการศึกษาการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลตของแคนนาบิไดออล แคนนาบินอล และเตตราไฮโดรแคนนาบินอล พบว่า $\lambda_{\max}$ ของสารแคนนาบิไดออล และเตตราไฮโดรแคนนาบินอล มีค่าเท่ากับ 208,

274 นาโนเมตร และ 210, 274 นาโนเมตร ตามลำดับ (Figure 4) และเมื่อวิเคราะห์สารละลายตัวอย่างสารสกัดกัญชาด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวประสิทธิภาพสูง โดยใช้ DAD เป็นเครื่องตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 220 นาโนเมตร ไม่พบการซ้อนทับของพีคของสารอื่น

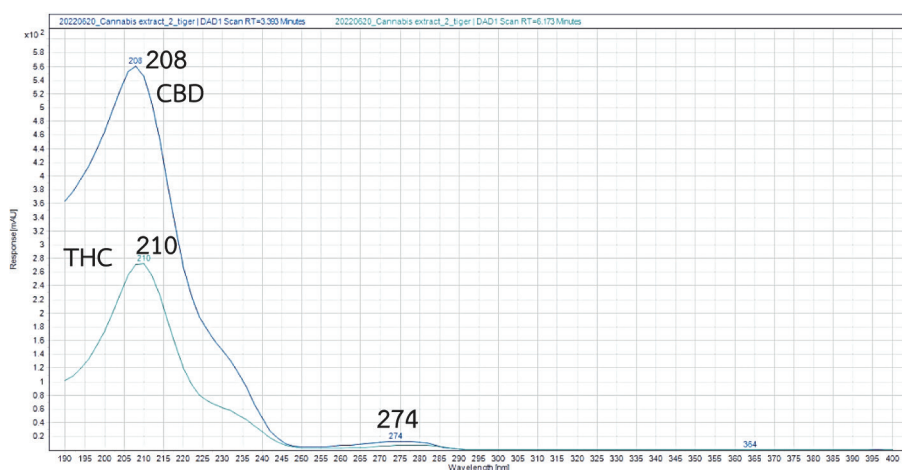


Figure 4 UV spectrum of Cannabidiol and Tetrahydrocannabinol

ดังนั้นในการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณสารแคนนาบิไดออล และเตตราไฮโดรแคนนาบินอลในสารสกัดกัญชา จึงเลือกการตรวจวัดการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 220 นาโนเมตร

1.3 ภูมิภาคคงที่และภูมิภาคเคลื่อนที่

ภูมิภาคคงที่ พบว่าเมื่อใช้ UHPLC column ชนิด ARC-18 (A), ขนาด 4.6×150 มิลลิเมตร, ขนาดอนุภาค 2.7 ไมโครเมตร UHPLC chromatogram fingerprint ที่ได้ให้พีคของแคนนาบิไดออล และเตตราไฮโดรแคนนาบินอล ที่ retention time 3.39 และ 6.17 นาที ตามลำดับ ซึ่งมีการแยกจากสิ่งเจือปนอื่นอย่างชัดเจน ดัง Figure 5 (ผู้วิจัยได้ศึกษาการเปรียบเทียบผลของคอลัมน์ทั้ง 2 ชนิด คือ ARC-18 และ ARC-8 มาแล้ว^[9,10] จึงเลือกใช้คอลัมน์ชนิด ARC-18 ในการศึกษาครั้งนี้)

ภูมิภาคเคลื่อนที่ พบว่าเมื่อใช้ 0.1% ออร์โทฟอสโฟริกแอซิด (0.1% Ortho-phosphoric acid) ในน้ำ และ 0.1% ออร์โทฟอสโฟริกแอซิดในอะซิโตไนไทรล์ (Acetonitrile) retention time ของสารแคนนาบิไดออล และเตตราไฮโดรแคนนาบินอล เท่ากับ 3.39 และ 6.17 นาที จะได้ peak shape ของแคนนาบิไดออล และเตตราไฮโดรแคนนาบินอล ที่สมมาตร (symmetry) และแยกจากสิ่งเจือปนอื่นอย่างชัดเจน (Figure 5) (ผู้วิจัยได้ศึกษาการเปรียบเทียบผลของภูมิภาคเคลื่อนที่ทั้ง 2 ชนิด คือ 1. น้ำและอะซิโตไนไทรล์ และ 2. 0.1% ออร์โทฟอสโฟริกแอซิดในน้ำ และ 0.1% ออร์โทฟอสโฟริกแอซิดในอะซิโตไนไทรล์ มาแล้ว^[9,10] จึงเลือกใช้ภูมิภาคเคลื่อนที่ 0.1% ออร์โทฟอสโฟริกแอซิดในน้ำ และ 0.1% ออร์โทฟอสโฟริกแอซิดในอะซิโตไนไทรล์ ในการศึกษาครั้งนี้)

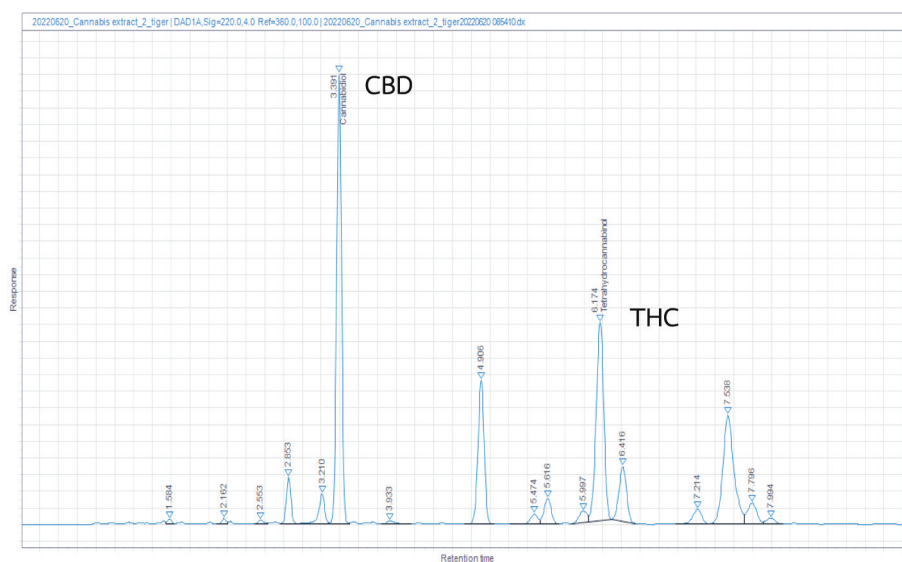


Figure 5 Chromatographic fingerprint of the *Cannabis sativa* L. extracts sample solution using stationary phases, the ARC-18 UHPLC column and mobile phases, 0.1% Ortho-phosphoric acid in water and 0.1% Ortho-phosphoric acid in Acetonitrile

ดังนั้นในการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณแคนนาบิไดออล และเตตราไฮโดรแคนนาบินอล ในสารสกัดกัญชาด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวประสิทธิภาพสูง จึงเลือกใช้ UHPLC column ชนิด ARC-18, ขนาด 4.6×150 มิลลิเมตร, ขนาดอนุภาค 2.7 ไมโครเมตร ใช้ 0.1% ออร์โทฟอสฟอริกแอซิดในน้ำ และ 0.1% ออร์โทฟอสฟอริกแอซิดในอะซิโตนไทรล์ เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ ตรวจวัดด้วย DAD ที่ความยาวคลื่น 220 นาโนเมตร

2. การทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (method validation)

2.1 การทดสอบความจำเพาะ (specificity)

จากการฉีดสารละลายผสมของสารมาตรฐานพบว่าภายใต้สภาวะ UHPLC ที่พัฒนาขึ้น สามารถแยกสารแคนนาบิไดออล และเตตราไฮโดรแคนนาบินอลออกจากกันได้ และไม่มีการรบกวนของสารอื่นโดยมีค่า retention time เท่ากับ 3.39 และ 6.17 นาทีตามลำดับ (Figure 6) มีค่า peak purity ของสารละลายสารมาตรฐาน แคนนาบิไดออล และเตตราไฮโดรแคนนาบินอล เท่ากับร้อยละ 96.74 และ 96.44 ตามลำดับ และมีค่า resolution > 2

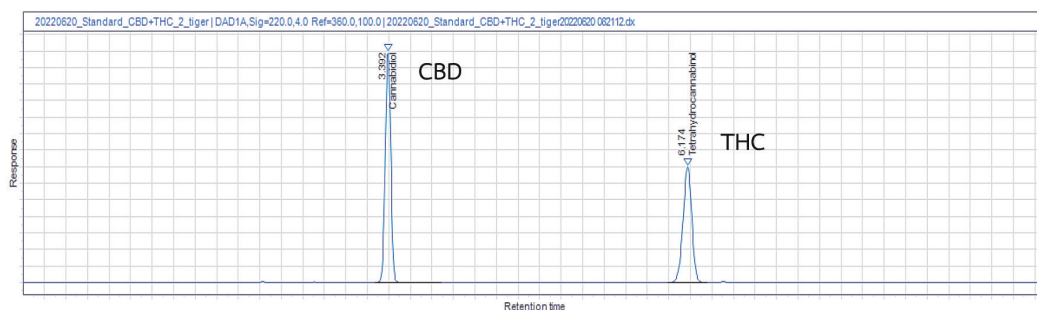


Figure 6 Chromatographic fingerprint of standard solution of Cannabidiol and Tetrahydrocannabinol, mixed standard solution of Cannabidiol and Tetrahydrocannabinol.

2.2 การทดสอบความเป็นเส้นตรงและช่วงการวิเคราะห์

จากกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานและพื้นที่ใต้พีค พบว่าความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานแคนนาบิไดออล และเตตราไฮโดรแคนนาบิโนลกับพื้นที่ใต้พีคมีลักษณะเป็นเส้นตรง โดยสารมาตรฐานแคนนาบิไดออลมีลักษณะ

เป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 24.23-290.70 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) เท่ากับ 0.9998 และสารมาตรฐานเตตราไฮโดรแคนนาบิโนลมีลักษณะเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 23.98-383.62 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) เท่ากับ 0.9995 (Figure 7)

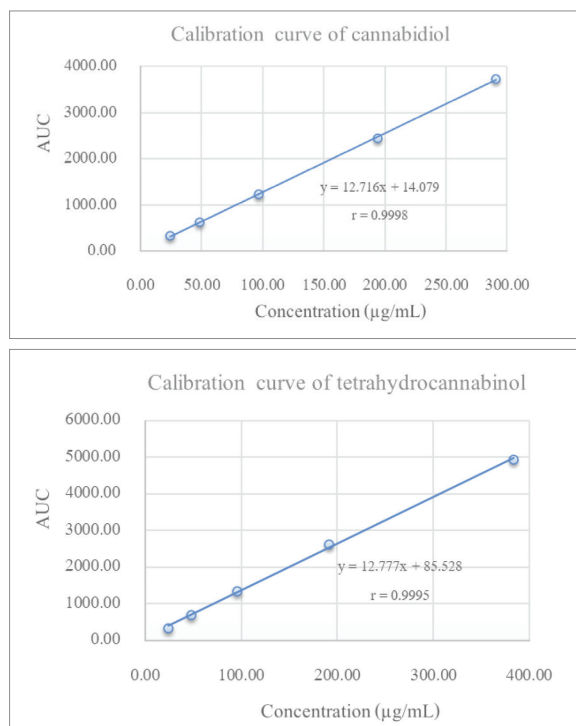


Figure 7 The calibration curve of Cannabidiol and Tetrahydrocannabinol standard intensity against peak area under the curve (AUC) concentration range of 24.00-400.00 µg/mL

2.3 การทดสอบร้อยละของการคืนกลับและความเที่ยง

เมื่อเติมสารละลายสารมาตรฐานแคนนาบิไดอล และเตตราไฮโดรแคนนาบินอล ที่ความเข้มข้นระดับต่าง ๆ ในช่วงการใช้งาน 3 ระดับ ลงใน sample blank วิเคราะห์ sample blank จำนวน 6 ซ้ำ และวิเคราะห์ spiked sample ระดับละ 3 ซ้ำ แต่ละซ้ำ จิตวิเคราะห์ 2 ครั้ง ตามลำดับ การเตรียม spiked sample ให้มีความเข้มข้น 50, 100, 150 % ความเข้มข้นของแคนนาบิไดอล ที่ spiked ลงไปใน sample

blank สามารถคำนวณได้เท่ากับร้อยละ 9.09, 16.67 และ 23.08 โดยน้ำหนัก ตามลำดับ และเตตราไฮโดรแคนนาบินอล สามารถคำนวณได้เท่ากับร้อยละ 9.09, 16.72 และ 23.15 โดยน้ำหนัก ตามลำดับ

จากการวิเคราะห์ตัวอย่าง spiked sample พบว่า ร้อยละของการคืนกลับของสารแคนนาบิไดอล และเตตราไฮโดรแคนนาบินอล อยู่ในช่วงร้อยละ 98.99-100.47 และ 99.26-100.36 ตามลำดับ (Table 3)

Table 3 Results of percentage recovery and repeatability

Analyzed Substances	Sample blank		Spiked level		n = 6		
	(ug/mL)	(% w/w)	(%)	(% w/w)	% recovery Mean $\pm$ SD	% RSD	HORRAT
CBD	58.51	7.69	50	9.09	98.99 $\pm$ 1.53	1.55	1.90
			100	16.67	100.47 $\pm$ 0.33	0.33	1.52
			150	23.08	99.30 $\pm$ 0.63	0.63	1.12
THC	47.66	9.51	50	9.09	100.36 $\pm$ 1.56	1.55	1.89
			100	16.67	99.26 $\pm$ 1.23	1.24	1.87
			150	23.08	100.07 $\pm$ 0.59	0.59	1.09

การทดสอบความเที่ยง (precision)

Repeatability วิเคราะห์ปริมาณสารแคนนาบิไดอล และเตตราไฮโดรแคนนาบินอล ในตัวอย่างสารสกัดกัญชา พบว่ามีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (% RSD) เท่ากับ 0.10 และ 0.13 ตามลำดับ (Table 4)

การทดสอบ Intermediate precision between-day วิเคราะห์ปริมาณสารแคนนาบิไดอล และเตตราไฮโดรแคนนาบินอล ในตัวอย่างสารสกัดกัญชา พบว่ามีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ เท่ากับ 0.14 และ 0.19 ตามลำดับ (Table 4)

Table 4 Results of repeatability and intermediate precision between-day

Analyzed substances	% RSD of Repeatability	% RSD of intermediate predision between-day
CBD	0.10	0.14
THC	0.13	0.19

การทดสอบขีดจำกัดของการตรวจพบ (Limit of detection, LOD) : พบว่า LOD ของการวิเคราะห์แคนนาบิไดอล และเตตราไฮโดรแคนนาบินอล เท่ากับร้อยละ 1.015 และ 2.135 โดยน้ำหนัก ตามลำดับ โดย

มีค่าร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์เท่ากับ 1.00 และ 1.24 ตามลำดับ และร้อยละของการคืนกลับอยู่ในช่วงร้อยละ 97.88-100.61 และ 97.27-100.65 ตามลำดับ (Table 5)

Table 5 Results of the limit of detection (LOD)

Analyzed Substances	Spilled sample ($\mu\text{g/mL}$)	LOD (% w/w)	n = 6		
			% recovery	% recovery Mean $\pm$ SD	% RSD
CRD	5.17	1.015	100.61	99.00 $\pm$ 0.99	1.00
			99.24		
			98.10		
			98.80		
			97.88		
			99.37		
THC	101.89	2.135	98.30	98.89 $\pm$ 1.23	1.2 d4
			100.65		
			99.03		
			98.22		
			99.87		
			97.27		

การทดสอบขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (Limit of quantitation, LOQ) : พบว่า LOQ ของการวิเคราะห์แคนนาบิไดอล และเตตราไฮโดรแคนนาบินอล เท่ากับร้อยละ 3.382 และ 7.118 โดยน้ำหนัก

ตามลำดับ โดยมีค่าร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์เท่ากับ 1.71 และ 1.89 ตามลำดับ และร้อยละของการคืนกลับอยู่ในช่วงร้อยละ 98.28-102.68 และ 97.31-102.53 ตามลำดับ (Table 6)

Table 6 Results of the limit of quantitation (LOQ)

Analyzed Substances	Spiked sample ($\mu\text{g/mL}$)	LOQ (% w/w)	n = 6		
			% recovery	% recovery Mean $\pm$ SD	% RSD
CRD	17.25	3.382	99.58	100.11 $\pm$ 1.71	1.71
			102.68		
			98.28		
			99.54		
			98.86		
			101.72		
THC	36.30	7.118	98.27	99.52 $\pm$ 1.88	1.89
			97.31		
			100.86		
			98.98		
			102.53		
			99.15		

การวิเคราะห์ปริมาณแคนนาบิไดอล และเตตราไฮโดรแคนนาบินอลในสารสกัดกัญชา

ผลการวิเคราะห์ปริมาณแคนนาบิไดอล และเตตราไฮโดรแคนนาบินอลในตัวอย่างสารสกัดกัญชาจำนวน 10 ตัวอย่างพบว่าสารสกัดกัญชาพันธุ์ตะนาวศรี ก้านแดงอาร์ดี 1 (RD1), RD1/1 ให้ปริมาณสาร

แคนนาบิไดอลสูงที่สุดเท่ากับ 347.788 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (ร้อยละ 68.194 โดยน้ำหนัก) และให้ปริมาณเตตราไฮโดรแคนนาบินอลสูงที่สุดเท่ากับ 307.766 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (ร้อยละ 60.346 โดยน้ำหนัก) (Table 7)

Table 7 The results showed cannabidiol and tetrahydrocannabinol contents in *Cannabis sativa* L. extracts sample by Ultra High Performance Liquid Chromatography technique

Sample	<i>Cannabis sativa</i> L. extracts	Sample weight (g)	The concentration of CBD and THC are calculated from a linear equation of Calibration curve ($\mu\text{g/mL}$)		Substance contents (% w/w)	
			CBD	THC	CBD	THC
1	RD1/1	0.0510	347.788	307.766	68.194	60.346
2	RD1/2	0.0509	211.236	187.569	41.500	36.850
3	RD1/3	0.0512	137.557	95.049	26.867	18.564
4	RD1/4	0.0512	211.065	204.078	41.224	39.859
5	RD1/5	0.0514	222.131	207.553	43.216	40.380
6	RD1/6	0.0508	235.014	160.662	46.263	31.626
7	RD1/7	0.0511	177.655	88.559	34.766	17.330
8	RD1/8	0.0537	166.254	126.722	27.235	23.598
9	RD1/9	0.0522	137.351	102.416	26.312	19.620
10	RD1/10	0.515	186.359	190.653	36.186	37.020

ผลการพิสูจน์ว่าการเจือจางนั้นไม่มีผลต่อความถูกต้องของค่าความเข้มข้นนั้น โดยการทำ dilution integrity

ซึ่งตัวอย่างสารสกัดกัญชา น้ำหนัก 54 มิลลิกรัม ละลายและปรับปริมาตรด้วยเมทานอล จนครบ 100 มิลลิลิตร โดยใช้ขวดแก้ววัดปริมาตร ปิเปตมา 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยเมทานอล จนครบ 25 มิลลิลิตร โดยใช้ขวดแก้ววัดปริมาตร กรองผ่าน Nylon filter syringe คำนวณค่าความเข้มข้นที่คาดหวังจากการเจือจางได้เท่ากับ 216 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร นำสารละลายตัวอย่างสารสกัดกัญชาที่

ได้ไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวประสิทธิภาพสูง

วิเคราะห์ปริมาณแคนนาบิไดอล และเตตราไฮโดรแคนนาบินอล ในตัวอย่างสารสกัดกัญชาที่เจือจางแล้ว จำนวน 6 ซ้ำ นำมาหาค่าเฉลี่ย ได้ปริมาณความเข้มข้น 220.47 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และ 211.54 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ และเปรียบเทียบกับค่าความเข้มข้นที่คาดหวังจากการเจือจาง พบว่าค่าที่วิเคราะห์ได้ใกล้เคียงกับค่าที่คาดหวัง แสดงว่าการเจือจางไม่ส่งผลกระทบต่อความถูกต้องของค่าความเข้มข้น (Table 8)

Table 8 The results showed concentration of Cannabidiol and Tetrahydrocannabinol in *Cannabis sativa* L. extracts sample by Ultra High Performance Liquid

<i>Cannabis sativa</i> L. extracts Conc. 216 µg/mL	Chromatography technique Peak area of CBD and THC		The concentration of CBD and THC are calculated from a linear equation of Calibration curve (µg/mL)	
	CBD	THC	CBD	THC
1	2820.211	2788.231	220.68	211.53
2	2822.314	2782.415	220.84	211.07
3	2818.524	2788.584	220.54	211.56
4	2819.222	2796.229	220.60	212.15
5	2811.347	2789.221	219.98	211.61
6	2813.898	2785.898	220.18	211.35
Average			220.47	211.54
SD			0.32	0.36
% RSD			0.15	0.17

อภิปรายผล

กัญชาเป็นสมุนไพรที่มีศักยภาพเชิงพาณิชย์ และมีประโยชน์ทั้งเป็นยาและผลิตภัณฑ์สุขภาพ สามารถนำมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆ เช่น เครื่องดื่มสมุนไพร ผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง มีรายงาน

การศึกษาทางวิทยาศาสตร์ทางด้านเคมีเภสัชวิทยา และพิษวิทยามากมายที่สนับสนุนการใช้ แต่การพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์นั้น ปัจจัยที่สำคัญที่ควรคำนึงถึง คือ ปัจจัยด้านคุณภาพของสารสกัดกัญชาเนื่องจากกัญชามีสารสำคัญกลุ่มแคนนาบินอยด์ คือ แคนนาบิไดอล และ

UHPLC เป็น High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ที่มีการพัฒนาเพื่อให้มีประสิทธิภาพการแยกสาร ความไวในการแยกสารที่ดีขึ้น ใช้วัฏภาคเคลื่อนที่น้อยลง และลดระยะเวลาในการตรวจวิเคราะห์ เมื่อนำวิธีวิเคราะห์ปริมาณสารแคนนาบิไดออล และเตตราไฮโดรแคนนาบินอลในสารสกัดกัญชาด้วยวิธี UHPLC ที่พัฒนาขึ้นมาใหม่ เปรียบเทียบกับการหาปริมาณสารแคนนาบิไดออล และ

เตตราไฮโดรแคนนาบินอลในกัญชาด้วยวิธี HPLC/UV^[5] และวิธี HPLC-DAD^[6] 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 ทำให้สิ้นเปลืองวัสดุภาคเคลื่อนที่ ส่วนวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นมาใหม่ใช้เวลาวิเคราะห์ตัวอย่างสารสกัดกัญชาต่อ 1 ตัวอย่าง นาน 10 นาที ใช้ flow rate 1.5 มิลลิลิตร/นาที ซึ่งรวดเร็วและประหยัดวัสดุภาคเคลื่อนที่ ดังนั้นจึงเลือกใช้เครื่อง UHPLC ในการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณแคนนาบิไดอล และเตตราไฮโดรแคนนาบินอลในสารสกัดกัญชา และจากการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ปริมาณแคนนาบิไดอล และเตตราไฮโดรแคนนาบินอลที่พัฒนาขึ้นพบว่า ค่าร้อยละของการคืนกลับจากการวิเคราะห์ spiked sample อยู่ในเกณฑ์ยอมรับ (95 - 105%) ซึ่งแสดงถึงความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ และค่า HORRAT อยู่ในเกณฑ์ยอมรับ (< 2) ซึ่งแสดงถึงความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้น วิธีดังกล่าวจึงมีความเหมาะสม สามารถนำไปใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณสารแคนนาบิไดอล และเตตราไฮโดรแคนนาบินอลเพื่อใช้ควบคุมปริมาณสารของสารสกัดกัญชาต่อไปได้ ในเบื้องต้นสามารถนำวิธีที่พัฒนาขึ้นนี้ตรวจวิเคราะห์สารสกัดกัญชาจากกัญชาพันธุ์ไทยสายพันธุ์ชนิดอื่น เพื่อให้มีข้อมูลหลากหลายเป็นประโยชน์ต่อการพัฒนาคุณภาพพันธุ์ไทยต่อไป

ข้อสรุป

เป็นวิธีการควบคุมคุณภาพและจำแนกสายพันธุ์พืชกัญชา ที่สนับสนุนการวิจัยและพัฒนาสายพันธุ์และผลิตภัณฑ์จากกัญชา เพื่อใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ได้เป็นอย่างดี

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ที่สนับสนุนงบประมาณในการวิจัยนี้ ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ห้องปฏิบัติการพิษวิทยาพืช และเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการวิจัยเพื่อแยกสารสำคัญจากสมุนไพรทุกท่าน ที่ทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

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. 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)
5. 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.
6. Ciolino LA, Ranieri TL, Taylor AM. Commercial Cannabis consumer products part 2: HPLC-DAD quantitative analysis of cannabis cannabinoids. *Forensic Sci Int*. 2018;289:438-47.
7. 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.
8. ICH Q2 (R1): Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. 2005.
9. Thongchinn T, Marsud S, Thiemthieprat P, Ruengkhet S, Ontong S, Banyati P, Chaisomboonpan S, Shuayprom A. Development and method validation of Cannabinoid contents in Cannabis sativa L. leaves by Ultra High

- Performance Liquid Chromatography. The Bulletin of the Department of Medical Sciences. 2021;63(3):505-23. (in Thai)
10. Thongchin T, Thiemthieprat P, Ruengkhet S, Marsud S, Ontong S, Chaisomboonpan S, Shuayprom A. Development of analytical methods and validation of Cannabinoid quantification methods in *Cannabis sativa* L. flowers by Ultra High Performance Liquid Chromatography. Journal of Thai Traditional & Alternative Medicine. 2024;22(3):685-88. (in Thai)