

การพัฒนาวิธีทดสอบหาสารกลุ่ม cannabinoids ในพืชกัญชง ด้วยเทคนิค UHPLC-DAD

ชูศักดิ์ อางสูงเนิน สวรินทร์ ทองหยู ศศิกานต์ วุฒิกานต์นนท์ รัตนาภรณ์ ชนประชา

บทคัดย่อ

ปัจจุบันเกษตรกรผู้เลี้ยงสัตว์มีแนวโน้มใช้พืชกัญชงและกัญชาในการบำบัดรักษาโรค ลดอาการปวดและความเครียดของสัตว์ โดยการผสมในอาหารหรือหยอดน้ำมันสกัดให้สัตว์กิน ซึ่งพืชกัญชงและกัญชามีสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ต่อจิตประสาทคือ cannabidiol (CBD) และ delta-9-tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC) ที่มีความปลอดภัยหากใช้ในปริมาณเหมาะสม สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ จึงพัฒนาวิธีทดสอบหาสารกลุ่ม cannabinoids ในพืชกัญชง ด้วยเทคนิค Ultra-High Performance Liquid Chromatography (UHPLC) มีตัวตรวจจับแบบ Diode-Array Detector (DAD) โดยใช้คอลัมน์ Phenomenex, C18, 1.7 ไมโครเมตร ขนาด 100 × 2.1 มิลลิเมตร ใช้สารละลายเฟสเคลื่อนที่ คือ 0.1% acetic acid ใน methanol และน้ำ (95:5 v,v) และ 0.1% acetic acid ใน acetonitrile และ methanol (95 : 5, v/v) อัตราการไหล 0.4 มิลลิลิตรต่อนาที ในรูปแบบ gradient elution และใช้ปริมาณการฉีด 5 ไมโครลิตร พบว่าสามารถแยกสารกลุ่ม cannabinoids ได้ 9 สาร ได้แก่ delta-9-tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC), cannabidiol (CBD), cannabidiolic acid (CBDA), cannabigerol (CBG), cannabinol (CBN), cannabichrome (CBC), cannabichrome acid (CBCA), cannabicyclic acid (CBL) และ cannabicyclic acid (CBLA) พร้อมกันในครั้งเดียว ในเวลา 15 นาที โดยมีช่วงการวิเคราะห์ที่ความเข้มข้น 0.10–5.00 µg/mL ซึ่งวิธีนี้สามารถทดสอบได้ทั้งส่วนราก ลำต้น ใบรวมกิ่งก้าน และช่อดอกพืชกัญชง ทั้งนี้ วิธีที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถนำไปใช้ในการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบหาสารกลุ่ม cannabinoids ในสมุนไพรกัญชงและกัญชา โดยเทคนิค UHPLC-DAD ต่อไปได้

คำสำคัญ: กัญชง แคนนาบินอยด์ UHPLC-DAD

กลุ่มตรวจสอบคุณภาพยาสัตว์และวัตถุดิบรายด้านการปศุสัตว์ สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์

Method development for the determination of cannabinoids in hems by UHPLC-DAD

Chusak Ardsoongnearn, Sawanan Thongyoo, Sasikarn Wuttikannon and Rattanaorn Chonpracha

Abstract

Currently, hems and cannabis are increasingly used in livestock for therapeutic purposes, such as pain relief and stress reduction, through feed or oil supplementation. The active pharmaceutical substances, cannabidiol (CBD) and delta-9-tetrahydrocannabinol (Δ 9-THC) are considered safe at appropriate doses. This study developed a rapid and reliable method for analyzing cannabinoids in hemp using Ultra-High Performance Liquid Chromatography with Diode-Array Detector (UHPLC-DAD) using a Phenomenex C18 column (1.7 μ m, 100 $\times$ 2.1 mm) and gradient elution. The developed method could be simultaneously separated 9 cannabinoids in a single run, including Δ 9-THC, CBD, cannabidiolic acid (CBDA), cannabigerol (CBG), cannabinol (CBN), cannabichromene (CBC), cannabichromenic acid (CBCA), cannabicyclol (CBL), and cannabicyclolic acid (CBLA) within 15 minutes. The results indicated that the working range for each substance was 0.10 - 5.00 μ g/mL. This developed method was effective for roots, stems, leaves with branches, and flowers of hemp. The developed method proved suitable for evaluating method validation for cannabinoids in hems and cannabis products using UHPLC-DAD.

Keywords: hems cannabinoids UHPLC-DAD

Veterinary Drugs and Hazardous Substances Assay Division, Bureau of Quality Control of Livestock Products, Department of Livestock Development.

บทนำ

กัญชา (Hemp) เป็นพืชล้มลุกในวงศ์ Cannabaceae พืชในกลุ่มนี้มีชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Cannabis sativa L. subsp. sativa* โดยกัญชามีใบเป็นลักษณะรูปฝ่ามือ แยกเป็นแฉกประมาณ 7-9 แฉก ปลายใบสอบและเรียวแหลม ออกดอกเป็นช่อตามซอกใบและปลายยอด ดอกมีขนาดเล็กสีขาวเป็นแบบแยกเพศ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2-4 มิลลิเมตร มีลำต้นเป็นปล้องหรือข้อยาว แตกกิ่งก้านน้อย และผลเป็นเมล็ดแห้งสีเทาลักษณะเป็นรูปไข่ผิวเรียบเป็นมัน ปัจจุบันพืชกัญชากำลังได้รับความสนใจจากหลายประเทศทั่วโลก รวมถึงประเทศไทย เนื่องจากมีการรายงานการพบสารสำคัญในพืชกัญชามากกว่า 500 ชนิด โดยแบ่งสารที่พบได้เป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มแคนนาบินอยด์ (cannabinoids) กลุ่มเทอร์ปีน (terpenes) หรือไอโซพรีนอยด์ (isoprenoids) และกลุ่มฟลาโวนอยด์ (flavonoids) ซึ่งสารกลุ่ม cannabinoids เป็นสารหลักที่เป็นเอกลักษณ์ของกัญชา หากแบ่งตามลักษณะการออกฤทธิ์จะแบ่งสารกลุ่ม cannabinoids ได้เป็น 2 กลุ่ม คือ สารที่ไม่ออกฤทธิ์ต่อจิตและประสาท (non-psychoactive compound) เช่น cannabidiol (CBD) เป็นสารที่สำคัญที่มีคุณสมบัติทางการแพทย์หลายด้าน เช่น ลดอาการปวด ลดการอักเสบ ต้านชัก และลดความวิตกกังวล นอกจากนี้ยังมีสารอื่นๆ ในกลุ่มนี้ เช่น cannabinol (CBN), cannabichromene (CBC), cannabigerol (CBG), cannabidivarin (CBDV), cannabichromevarin (CBCV), Δ^9 -tetrahydrocannabivarin (THCV) และ tetrahydrocannabinolic acid (THCA) เป็นต้น และสารอีกกลุ่มคือสารที่ออกฤทธิ์ต่อจิตและประสาท (psychoactive compound) ได้แก่ Δ^9 -Tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC) ซึ่งเป็นสารที่สามารถออกฤทธิ์ได้มากที่สุด โดยจะออกฤทธิ์คล้ายกับ Endocannabinoid ที่พบในร่างกายของคนและสัตว์ เมื่อจับกับตัวรับจำเพาะซึ่งได้แก่ cannabinoid receptors ชนิด CB1 ที่พบมากในสมอง จะส่งผลให้รู้สึกมีความสุข และยังมีผลต่อสมองส่วนที่รับรู้ความกังวล ความเจ็บปวด การรับรู้ความรู้สึก การควบคุมระบบการเคลื่อนไหวของร่างกายและระบบต่อมไร้ท่อ ส่วนตัวรับชนิด CB2 จะพบมากที่เซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันและเส้นประสาทส่วนปลาย ดังนั้นผลของการได้รับสารกลุ่ม cannabinoids จึงคล้ายกับยากระตุ้นประสาท ยากดประสาท ยาหลอนประสาท ยาแก้ปวด และยาที่ออกฤทธิ์ต่อจิตประสาท การนำมาใช้จึงอาจก่อให้เกิดทั้งประโยชน์และโทษขึ้นอยู่กับปริมาณที่รับเข้าไปและสภาพร่างกาย แต่สารเหล่านี้จะมีปริมาณแตกต่างกันออกไปตามสายพันธุ์และสภาวะสิ่งแวดล้อมที่ปลูกด้วย โดยพืชกัญชามีองค์ประกอบทางเคมีใกล้เคียงกับพืชกัญชา (Marijuana) และกำลังได้รับความสนใจอย่างมาก แต่พืชกัญชาต่างกับพืชกัญชาที่สัดส่วนของสารสำคัญ โดยพืชกัญชามีปริมาณ CBD สูง และมีปริมาณ THC ต่ำกว่าพืชกัญชา

ปัจจุบันประเทศไทยมีการออกพระราชบัญญัติยาเสพติดให้โทษ (ฉบับที่ 7) พ.ศ. 2562 โดยกระทรวงสาธารณสุขได้อนุญาตให้มีการนำกัญชาและกัญชามาศึกษาวิจัยและใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ได้ นอกจากนี้ยังมีประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่อง ระบุชื่อยาเสพติดให้โทษในประเภท 5 พ.ศ. 2563 ระบุให้บางส่วนของพืชกัญชาและกัญชา ได้แก่ เปลือก ลำต้น เส้นใย กิ่งก้าน ราก ใบ (ที่ไม่มีช่อดอกติดมาด้วย) เมล็ด น้ำมันจากสารสกัดหรือสารสกัด และกากที่เหลือจากการสกัด (ที่มี THC ไม่เกิน 0.2% โดยน้ำหนักแห้ง) เฉพาะที่ได้รับอนุญาตให้ผลิตในประเทศเท่านั้น ไม่จัดเป็นยาเสพติดให้โทษประเภทที่ 5 ทำให้มีการส่งเสริมการนำกัญชาและกัญชามาใช้ประโยชน์ในผลิตภัณฑ์สุขภาพ เครื่องสำอางและอาหารเพื่อการบำบัด รักษาโรค การบริโภคเป็นอาหาร และวัตถุประสงค์อื่นๆ ทั้งในคนและสัตว์ ซึ่งกรมปศุสัตว์ได้จัดทำแผนปฏิบัติการราชการในระยะ 5 ปี พ.ศ. 2566 – 2570 ส่งเสริมและขับเคลื่อนการนำสมุนไพรไทยกัญชาและกัญชามาใช้ในการเลี้ยงสัตว์และสัตว์เลี้ยง เพื่อตอบสนองนโยบายการพัฒนาคุณภาพกัญชาและกัญชาเป็นพืชเศรษฐกิจ แม้จะมีข้อมูลรายงานว่ากัญชาและกัญชามีความปลอดภัยสูงหากใช้ในปริมาณที่เหมาะสม แต่

สัตว์แต่ละชนิดหรือแต่ละตัวนั้นมีความไวต่อออกฤทธิ์และการเกิดพิษที่แตกต่างกัน ดังนั้น เกษตรกรหรือผู้เลี้ยงสัตว์จะต้องศึกษาข้อมูลโดยละเอียดก่อนนำมาใช้ และใช้อย่างระมัดระวัง นอกจากนี้ควรมีหน่วยงานที่กำกับดูแล ตรวจสอบคุณภาพและปริมาณของสารสำคัญในผลิตภัณฑ์และให้ข้อมูลในการใช้กัญชงและกัญชาในทางปศุสัตว์ให้อยู่ภายใต้คำแนะนำของสัตวแพทย์

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การตรวจวิเคราะห์หาสารกลุ่ม cannabinoids ในพืชและผลิตภัณฑ์จากกัญชงและกัญชาโดยวิธีทางห้องปฏิบัติการนั้นมีหลากหลายเทคนิค เช่น Thin Layer Chromatography (TLC), High-Performance Liquid Chromatography (HPLC), Gas Chromatography (GC), Mass Spectrometry (MS), Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) และ Nuclear Magnetic Resonance Spectrometry (NMR) แต่เทคนิคหลักที่นิยมใช้คือ HPLC และ GC แต่เทคนิค GC มีข้อจำกัดคือไม่สามารถแยกอนุพันธ์ของ cannabinoids ในรูปกรดและกลางได้ เนื่องจากเมื่อ cannabinoid acid ได้รับความร้อนสูงจากกระบวนการตรวจวิเคราะห์จะเกิด decarboxylation สลายตัวเป็น natural cannabinoids ทำให้ผลวิเคราะห์ที่ได้จะเป็นผลรวมในรูปของ total cannabinoid contents หากต้องการวิเคราะห์โดยแยกชนิดสารจะต้องผ่านกระบวนการ derivatization ซึ่งมีความยุ่งยากและซับซ้อน (สกุลรัตน์ และคณะ, 2021; Kanabus *et al.*, 2023)

Patel *et al.* (2017) ได้สกัดสาร cannabinoids จากชิ้นส่วนพืชกัญชาด้วย methanol: chloroform (9:1) ตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC-DAD โดยใช้คอลัมน์ Agilent Poroshell 120 SB-C18 2.7 μm ขนาด 3.0x 75 mL ใช้สารละลายเฟสเคลื่อนที่ คือ ammonium acetate, pH 4.75 และ methanol เพื่อแยกและตรวจวัดปริมาณสาร cannabinoids 8 ชนิด ได้แก่ Δ^8 -THC, Δ^9 -THC, THCA, CBD, CBDA, CBG, CBGA และ CBN ในเวลา 10 นาที

Ciolino *et al.* (2018) ได้สกัดผลิตภัณฑ์กัญชาด้วย ethanol: water ตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC-DAD โดยใช้คอลัมน์ MacMod ACE 5 C18-AR 5 μm ขนาด 4.6x 250 mL ใช้สารละลายเฟสเคลื่อนที่ คือ acetonitrile: 0.5% acetic acid (66:34) เพื่อแยกและตรวจวิเคราะห์สาร cannabinoids 11 ชนิด ได้แก่ CBD, CBDA, Δ^9 -THC, Δ^8 -THC, THCA, CBN, CBG, CBGA, CBDV, THCV และ CBC ในเวลา 50 นาที

สกุลรัตน์ และคณะ (2021) ได้สกัดตัวอย่างกัญชาด้วย dichloromethane ตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Liquid Chromatography – Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS) ใช้สารละลายเฟสเคลื่อนที่ คือ 0.1% acetic acid ใน DI water: methanol (95:5) และ 0.1% acetic acid ใน acetonitrile: methanol (95:5) เพื่อแยกและตรวจวัดสารสำคัญ 6 ชนิด ได้แก่ CBD, CBN, Δ^9 -THC, Δ^8 -THC, THCA และ THCV ในเวลา 15 นาที

Kanabus *et al.* (2023) ได้เปรียบเทียบการสกัดตัวอย่างช่อดอกและใบกัญชงด้วย methanol acetonitrile ethanol n-hexane และ ethanol: n-hexane (7:3) โดยสกัดซ้ำ 3 ครั้ง และตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Ultra-high-performance liquid chromatography-QExactive Orbitrap mass spectrometry setup operating with a heated electrospray interface (UHPLC-HESI-MS) โดยใช้สารละลายเฟสเคลื่อนที่คือ ACN: 0.02% acetic acid และ 5 mM Ammonium formate (75:25) เพื่อแยกและตรวจวิเคราะห์วัดปริมาณสาร cannabinoids ทั้งหมด 17 ชนิด ได้แก่ CBDVA, CBDV, CBDA, CBGA, CBG, CBD, CBNA, Δ^9 -THCVA, Δ^9 -THCV, CBN, CBCA, Δ^9 -THC, Δ^9 -THCA-A, Δ^8 -THC, CBL, CBLA และ CBC ในเวลา 18 นาที โดยพบว่าการใช้ methanol ในกระบวนการสกัด สามารถสกัดสาร cannabinoids ออกมาได้มากที่สุดทั้งในพืชสดและพืชแห้ง

Nahar *et al.* (2023) ได้ทบทวนงานวิจัยปี 2010–2019 ที่มีการใช้เทคนิค Liquid Chromatography (LC), High Performance Liquid Chromatography (HPLC) และ Ultra-High Performance Liquid Chromatography (UHPLC) ในการวิเคราะห์สาร cannabinoids ในกัญชาและพืชที่มีสารกลุ่มนี้ พบว่าการใช้ UHPLC ได้รับความนิยมมากกว่าวิธี HPLC แบบดั้งเดิม ในแง่ของความเร็ว ความแม่นยำในการแยกสาร และประสิทธิภาพการใช้ตัวทำละลาย โดยเฉพาะในกรณีที่ต้องการการวิเคราะห์ที่มีความละเอียดสูงหรือทำงานกับตัวอย่างที่มีความซับซ้อน สามารถวิเคราะห์สารหลายชนิดได้พร้อมกันทั้งในรูปแบบ natural cannabinoids, cannabinoid acid และ degradation product

ประกาศกระทรวงสาธารณสุข พ.ศ.2564 ฉบับที่ 425 เรื่อง เมล็ดกัญชง น้ำมันจากเมล็ดกัญชง โปรตีนจากเมล็ดกัญชง และผลิตภัณฑ์อาหารที่มีส่วนประกอบของเมล็ดกัญชง น้ำมันจากเมล็ดกัญชง หรือโปรตีนจากเมล็ดกัญชง และฉบับที่ 427 เรื่อง ผลิตภัณฑ์อาหารที่มีส่วนประกอบของส่วนของกัญชาหรือกัญชง ระบุว่าการตรวจวิเคราะห์เพื่อหาปริมาณสาร Total THC (Δ 9-THC, Δ 8-THC, THC content) และ CBD ให้ใช้หลักเกณฑ์และวิธีการตรวจยืนยันที่ห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่องมือที่ใช้หลักการโครมาโตกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) หรือสูงกว่า

ดังนั้น สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ในฐานะที่เป็นหน่วยงานตรวจสอบคุณภาพความปลอดภัยของสินค้าปศุสัตว์ จึงเตรียมความพร้อมในการจัดตั้งห้องปฏิบัติการทดสอบคุณภาพสมุนไพร และดำเนินโครงการพัฒนาและยกระดับห้องปฏิบัติการสมุนไพรไทยกัญชงและกัญชา เพื่อการเลี้ยงปศุสัตว์และสัตว์เลี้ยง โดยในปีงบประมาณ 2568 ได้พัฒนาวิธีทดสอบหาสารกลุ่ม cannabinoids 9 ชนิด ในพืชกัญชง ได้แก่ Δ 9-THC, CBD, CBDA, CBG, CBN, CBC, CBCA, CBL และ CBLA โดยการสกัดพืชกัญชงด้วย methanol เนื่องจากการงานวิจัยก่อนหน้านี้พบว่าสารสามารถสกัดสารสำคัญจากกัญชงได้ดีที่สุด และเป็นตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีความเป็นพิษน้อยเมื่อเทียบกับตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดอื่นๆ และมีการทดสอบสถานะเบื้องต้น (preliminary test) โดยใช้ UHPLC Column C18 1.7 μ m, 2.1x100 mm ที่มีอยู่ในห้องปฏิบัติการ มาพัฒนาการตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค UHPLC-DAD และทดสอบหาสาร cannabinoids ในส่วนต่างๆ ของพืชกัญชง ซึ่งสามารถใช้ผลการตรวจวิเคราะห์นี้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการวางแผนให้กับหน่วยงานที่เกี่ยวข้อง เพื่อป้องกันและเฝ้าระวังการใช้สารเหล่านี้ในทางปศุสัตว์ให้เหมาะสมต่อไป

1. วัตถุประสงค์

เพื่อพัฒนาวิธีทดสอบหาสารกลุ่ม cannabinoids ในพืชกัญชง ด้วยเทคนิค UHPLC-DAD และนำวิธีที่พัฒนาได้มาใช้ทดสอบตัวอย่างกัญชงในห้องปฏิบัติการกลุ่มตรวจสอบคุณภาพยาสัตว์และวัตถุอันตรายด้านการปศุสัตว์

2. ขอบข่าย

ใช้สำหรับการทดสอบหาปริมาณสารกลุ่ม cannabinoids ในพืชกัญชง ในห้องปฏิบัติการกลุ่มตรวจสอบคุณภาพยาสัตว์และวัตถุอันตรายด้านการปศุสัตว์

3. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้วิธีทดสอบหาสารกลุ่ม cannabinoids ในกัญชง ด้วยเทคนิค UHPLC-DAD ที่สามารถทดสอบหาสาร cannabinoids ในกัญชงและกัญชาในห้องปฏิบัติการ และสามารถนำข้อมูลผลการทดสอบไปใช้ประโยชน์กับหน่วยงานที่เกี่ยวข้องเพื่อการเลี้ยงปศุสัตว์และสัตว์เลี้ยงต่อไป

4. วิธีดำเนินการ

4.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

- 4.1.1 เครื่อง Ultra-High Performance Liquid Chromatography (UHPLC) ยี่ห้อ Shimadzu ประกอบด้วย degasser รุ่น DGU-405, binary pump รุ่น LC-40D XS, autosampler รุ่น SIL-40C XS, column oven รุ่น CTO-40C, photo diode array detector รุ่น SPD-M40 และควบคุมการทำงานและประมวลผลด้วยโปรแกรม LabSolutions
- 4.1.2 เครื่องชั่งน้ำหนักไฟฟ้าทศนิยม 5 ตำแหน่ง (analytical Balance)
- 4.1.3 เครื่องเขย่าสารอัตโนมัติ (shaker)
- 4.1.4 เครื่องลดอุณหภูมิด้วยระบบคลื่นเสียงความถี่สูง (ultrasonic Processor)
- 4.1.5 เครื่องปั่นเหวี่ยงแยกสารละลายชนิดควบคุมอุณหภูมิ (centrifuge)
- 4.1.6 ตู้ดูดไอสารเคมี (fume Hood)
- 4.1.7 เครื่องทำน้ำบริสุทธิ์ (water purification system)
- 4.1.8 เครื่องผสมสารละลาย (vortex mixer)

4.2 วัสดุวิทยาศาสตร์

- 4.2.1 Acetonitrile, HPLC grade
- 4.2.2 Acetic acid, HPLC grade
- 4.2.3 Methanol, HPLC grade
- 4.2.4 Methanol, AR grade
- 4.2.5 DI water
- 4.2.6 Beaker ขนาด 50, 100 และ 250 mL
- 4.2.7 Volumetric flask ขนาด 5 mL
- 4.2.8 Volumetric flask ขนาด 10 mL
- 4.2.9 Volumetric flask ขนาด 1000 mL
- 4.2.10 Amber glass vial ขนาด 16 mL
- 4.2.11 Vial ใส with screw cap ขนาด 2 mL
- 4.2.12 Syringe membrane filter, Nylon 0.20 μm
- 4.2.13 Cylinder ขนาด 10, 25, 50, 100 และ 250 mL
- 4.2.14 Syringe ไม่มีหัวเข็ม ขนาด 1 ถึง 3 mL
- 4.2.15 Solution bottle ขนาด 100 และ 500 mL พร้อมฝา
- 4.2.16 Pasture pipette
- 4.2.17 Micropipette ขนาด 20-200 μl
- 4.2.18 Micropipette ขนาด 100-1000 μl
- 4.2.19 Phenomenex, C18 1.7 μm , 2.1 mm. ID x100 mm length
- 4.2.20 กรวยกรอง
- 4.2.21 กระดาษขังสาร

4.2.22 ลูกยางซิลิโคน

4.2.23 ข้อนตักสารและข้อนตักสารมาตรฐานสารเคมี

4.3 สารมาตรฐานและตัวอย่าง

4.3.1 สารมาตรฐาน Δ^9 -Tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC) ยี่ห้อ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ Lot. 02A66244

4.3.2 สารมาตรฐาน Cannabidiol (CBD) ยี่ห้อ Dr. Ehrenstorfer Lot. 2-H443379ME

4.3.3 สารมาตรฐาน Cannabidiolic acid (CBDA) ยี่ห้อ CHIRON Lot. 27531

4.3.4 สารมาตรฐาน Cannabigerol (CBG) ยี่ห้อ CHIRON Lot. 27532

4.3.5 สารมาตรฐาน Cannabinol (CBN) ยี่ห้อ CHIRON Lot. 26861

4.3.6 สารมาตรฐาน Cannabichrome (CBC) ยี่ห้อ Dr. Ehrenstorfer Lot. 2-H526642ME

4.3.7 สารมาตรฐาน Cannabichrome acid (CBCA) ยี่ห้อ Dr. Ehrenstorfer Lot. 2-H514488AL

4.3.8 สารมาตรฐาน Cannabicyclic (CBL) ยี่ห้อ Dr. Ehrenstorfer Lot. 2-H515547A

4.3.9 สารมาตรฐาน Cannabicyclic acid (CBLA) ยี่ห้อ Dr. Ehrenstorfer Lot. 2-H498909AL

4.3.10 ตัวอย่างกัญชงจาก ราก ลำต้น ใบรวมกิ่งก้าน และช่อดอก

4.4 ขั้นตอนการทดลอง

4.4.1 การเตรียมสารมาตรฐาน สารมาตรฐานผสมและ intermediate standards solution

สารมาตรฐานที่เป็นของเหลว ความเข้มข้น 1 mg/mL เตรียมโดยการดูดสารมาตรฐาน 250 μ L ลงใน volumetric flask ขนาด 5 mL ปรับปริมาตรด้วย methanol (HPLC grade) เพื่อให้ได้ intermediate standards solution ความเข้มข้น 0.05 mg/mL หรือ 50 ppm และเจือจางด้วย 20% methanol ให้มีความเข้มข้น 8 ระดับ ได้แก่ 0.10, 0.25, 0.50, 1.00, 2.00, 4.00 และ 5.00 μ g/mL

สารมาตรฐานที่เป็นผง เตรียมโดยการชั่งน้ำหนักสารมาตรฐานรวมขวด แล้วละลายสารทั้งหมดด้วย 80% methanol (HPLC grade) ดูดสารละลายทั้งหมดใส่ volumetric flask ขนาด 10 mL ปรับปริมาตรด้วย methanol (HPLC grade) รองจนขวดแห้ง ชั่งน้ำหนักขวดเปล่า คำนวณความเข้มข้นของสารมาตรฐานที่เตรียมได้ (เตรียมแยกชนิดและเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสหรือต่ำกว่า) จากนั้นเตรียม intermediate standards solution ของสารมาตรฐานแต่ละชนิด ให้มีความเข้มข้น 0.05 mg/mL หรือ 50 ppm แต่เนื่องจากสารแต่ละชนิดมี %purity ที่แตกต่างกัน ต้องคำนวณปริมาณสารมาตรฐานผงที่ต้องใช้ในกรณีนี้ %purity น้อยกว่า 99% ดังนี้

$$\text{ความเข้มข้นของสารที่เตรียมได้ (mg/mL)} = \frac{(\text{น้ำหนักสารรวมขวด} - \text{น้ำหนักขวดเปล่า}) \times \% \text{purity}}{\text{ปริมาตรของสาร (mL)} \times 100}$$

จากนั้นเจือจางด้วย 20% methanol (HPLC grade) ให้มีความเข้มข้น 8 ระดับ ได้แก่ 0.10, 0.25, 0.50, 1.00, 2.00, 4.00 และ 5.00 μ g/mL

เตรียมสารมาตรฐานผสม 9 ชนิด คือ Δ^9 -THC, CBD, CBDA, CBG, CBN, CBC, CBCA, CBL และ CBLA ที่ความเข้มข้น 2 μ g/mL โดยปิเปต intermediate standards solution แต่ละชนิด ที่ความเข้มข้น 50 μ g/mL ชนิดละ 40 μ L ผสมกับ 20% methanol (HPLC grade) ปริมาตร 560 μ L ผสมให้เข้ากัน กรองด้วย nylon syringe PTFE, 13 mm, 0.2 μ m ลงใน vial ขนาด 2 mL เพื่อใช้ทดสอบด้วยเทคนิค UHPLC-DAD

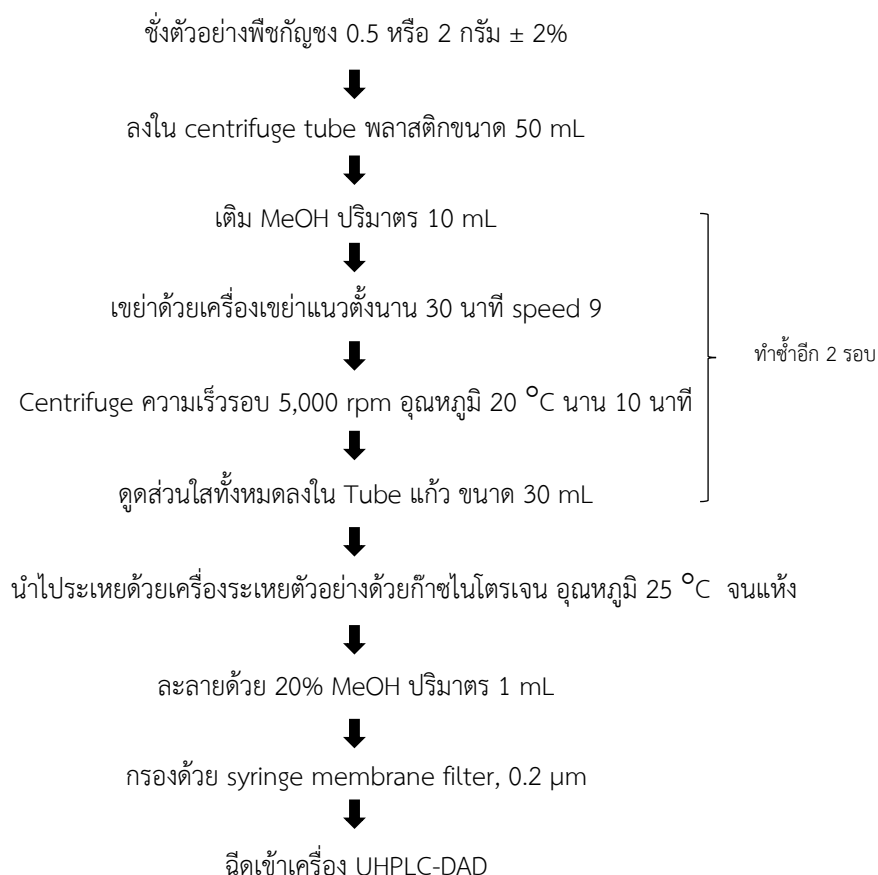
4.4.2 การเตรียม mobile phase

Mobile phase A: 0.1% acetic acid in DI water: methanol (95:5) เตรียมโดยเติม methanol 50 mL ลงใน volumetric flask ที่มี DI water อยู่แล้ว และปิเปต conc. glacial acetic acid 1 mL ใส่ลงไป ปรับปริมาตรเป็น 1000 mL ด้วย DI water กรองผ่าน nylon syringe PTFE, 13 mm, 0.2 μ m และนำไป sonicate เพื่อไล่ฟองอากาศ

Mobile phase B: 0.1% acetic acid in acetonitrile: methanol (95:5) เตรียมโดยเติม methanol 50 mL ลงใน volumetric flask ที่มี acetonitrile อยู่แล้ว และปิเปต conc. glacial acetic acid 1 mL ใส่ลงไป ปรับปริมาตรเป็น 1000 mL ด้วย acetonitrile กรองผ่าน nylon syringe PTFE, 13 mm, 0.2 μ m และนำไป sonicate เพื่อไล่ฟองอากาศ

4.4.3 การสกัดตัวอย่าง

ชั่งตัวอย่างพืชสมุนไพร 0.5 กรัม (สำหรับช่อดอก ราก ลำต้น) และ 2 กรัม (สำหรับใบรวมกิ่งก้านลง) ใน centrifuge ขนาด 50 mL เติม methanol 10 mL นำไปแช่ 30 นาที จากนั้น Centrifuge ที่ความเร็ว 5,000 rpm, 20 °C เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสลงในหลอดแก้วขนาด 30 mL นำไประเหยด้วยเครื่องระเหยตัวอย่างด้วยก๊าซไนโตรเจน อุณหภูมิ 25 °C จนแห้ง จากนั้นเติม methanol 10 mL และทำการสกัดซ้ำเช่นเดิมอีก 2 รอบ เพื่อให้ได้สารสกัดที่มีความเข้มข้นสูง แล้วนำสารสกัดแห้งมาละลายด้วย 20% MeOH ปริมาตร 1 mL และกรองผ่าน nylon syringe PTFE, 13 mm, 0.2 μ m ลงใน vial ขนาด 2 mL (ดัดแปลงจาก Thai Herbal Pharmacopoeia 2021; Kanabus J. *et al*, 2023) เพื่อนำไปทดสอบด้วยเทคนิค UHPLC-DAD ซึ่งแสดงเป็นขั้นตอนได้ดังนี้



4.4.4 การหาสภาวะที่เหมาะสมของการตรวจวิเคราะห์ด้วย UHPLC-DAD

ทดสอบสภาวะเบื้องต้น (preliminary test) โดยใช้ UHPLC Column C18 1.7 μm , 2.1x100 mm ที่มีอยู่ในห้องปฏิบัติการ ทดสอบสภาวะต่างๆ จากงานวิจัยก่อนหน้า และปรับสภาวะการทดสอบแบบ Gradient เพื่อให้เกิดการแยกของสารแต่ละชนิดอย่างเฉพาะเจาะจงและมีประสิทธิภาพมากขึ้น ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 สภาวะที่พัฒนาการทดสอบหา 9 สารในกลุ่ม cannabinoids (Δ^9 -THC, CBD, CBDA, CBG, CBN, CBC, CBCA, CBL และ CBLA)

Parameter	Condition																					
Stationary phase	UHPLC Column C18 1.7 μm, 2.1x100 mm																					
Flow rate	0.4 mL/min																					
Injection volume	5 μL																					
Column temperature	40 °C																					
Sample temperature	20 °C																					
Run time	16 min																					
Wavelength (UV)	210, 220, 240, 270, 307 nm																					
Mobile phase	A: 0.1% acetic acid in DI: methanol (95:5 v,v) B: 0.1% acetic acid in acetonitrile: methanol (95:5 v,v)																					
Gradient profile	<table><tr><th>Time</th><th>Mobile phase A (%)</th><th>Mobile phase B (%)</th></tr><tr><td>0.00</td><td>44</td><td>56</td></tr><tr><td>5.00</td><td>44</td><td>56</td></tr><tr><td>8.00</td><td>27</td><td>73</td></tr><tr><td>12.00</td><td>35</td><td>65</td></tr><tr><td>13.00</td><td>44</td><td>56</td></tr><tr><td>15.00</td><td>44</td><td>56</td></tr></table>	Time	Mobile phase A (%)	Mobile phase B (%)	0.00	44	56	5.00	44	56	8.00	27	73	12.00	35	65	13.00	44	56	15.00	44	56
Time	Mobile phase A (%)	Mobile phase B (%)																				
0.00	44	56																				
5.00	44	56																				
8.00	27	73																				
12.00	35	65																				
13.00	44	56																				
15.00	44	56																				

4.4.5 ทดสอบสภาวะสำหรับการตรวจหาสาร 9 สาร ในกลุ่ม cannabinoids

ทำการทดสอบสภาวะที่พัฒนาได้ในการตรวจหาสารกลุ่ม cannabinoids โดยฉีดสารมาตรฐาน 9 สารในกลุ่ม cannabinoids (CBDA, CBD, CBG, CBN, Δ^9 -THC, CBL, CBC, CBLA, และ CBCA) แยกทีละสาร ที่ความเข้มข้น 2 $\mu\text{g/mL}$ ปริมาตร 5 μL ตรวจสอบที่ความยาวคลื่น 210, 220, 240, 270, 307 nm ต้องมีค่า retention time ที่ไม่ซ้ำกันในแต่ละสาร

4.4.6 ทดสอบประสิทธิภาพการแยกของสารมาตรฐาน 9 สารในกลุ่ม cannabinoids

ทำการทดสอบประสิทธิภาพของสภาวะที่พัฒนาได้ในการแยกสารกลุ่ม cannabinoids โดยฉีดสารมาตรฐานผสม 9 สาร (THC, CBD, CBDA, CBG, CBN, CBC, CBCA, CBL และ CBLA) ที่ความเข้มข้น 2 $\mu\text{g/mL}$ ปริมาตร 5 μL ตรวจสอบ retention time และค่า resolution ของสารทั้ง 9 สาร ต้องมีค่า retention time ต่างกัน และมีค่า resolution มากกว่า 1.5 (AOAC, 2023)

4.4.7 ทดสอบความเป็นเส้นตรง (linearity) และช่วงการวิเคราะห์ (working range)

เตรียมกราฟมาตรฐาน (calibration curve) ของแต่ละสารให้มีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 0.10–5.00 $\mu\text{g/mL}$ (0.10, 0.25, 0.50, 1.00, 2.00, 4.00 และ 5.00 $\mu\text{g/mL}$) หาค่า correlation coefficient (r) โดยมีเกณฑ์การยอมรับ $r > 0.995$

4.4.8 ทดสอบหาสาร cannabinoids ในส่วนต่างๆ ของพืชกัญชง

สกัดตัวอย่างราก ลำต้น ใบรวมกิ่งก้าน และช่อดอกพืชกัญชง จำนวน 4 ตัวอย่าง ตามวิธีข้อใน

4.4.3 และทดสอบหาสารกลุ่ม cannabinoids ด้วยวิธีที่พัฒนาได้

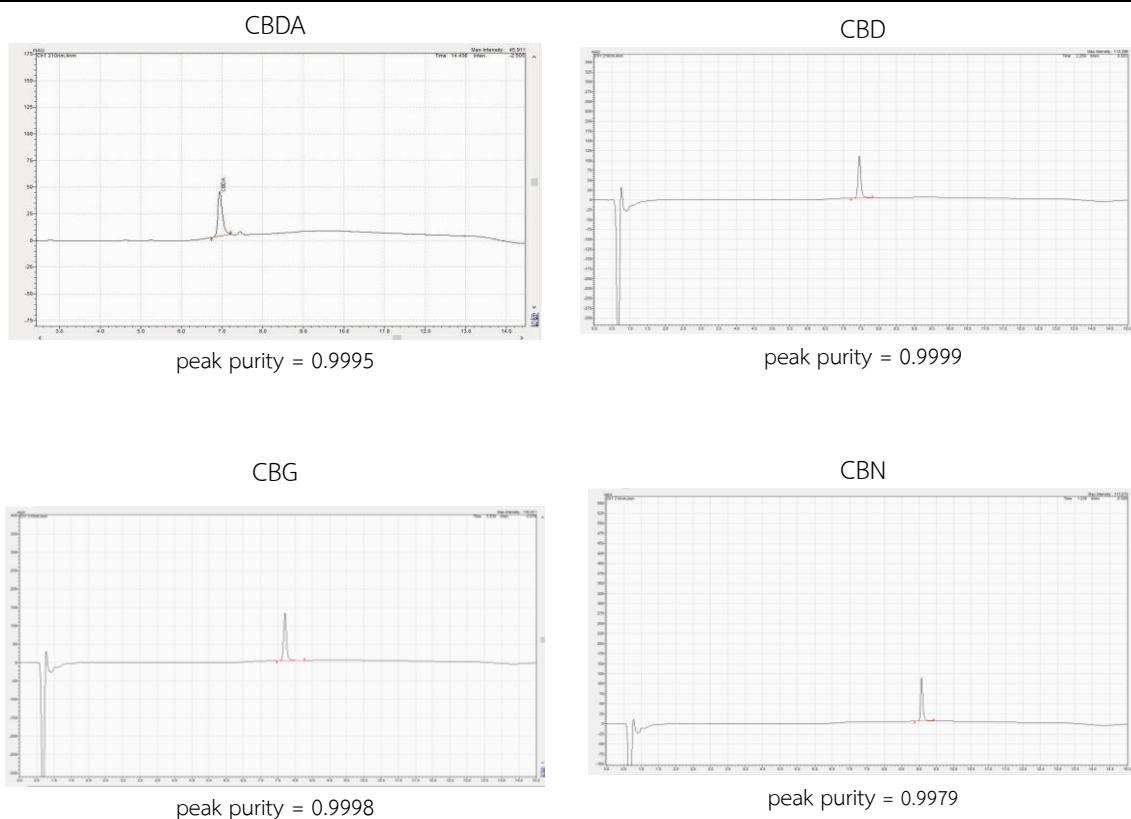
5. ผลการทดสอบ

5.1 ผลการทดสอบสภาวะสำหรับการตรวจหาสาร 9 สาร ในกลุ่ม cannabinoids

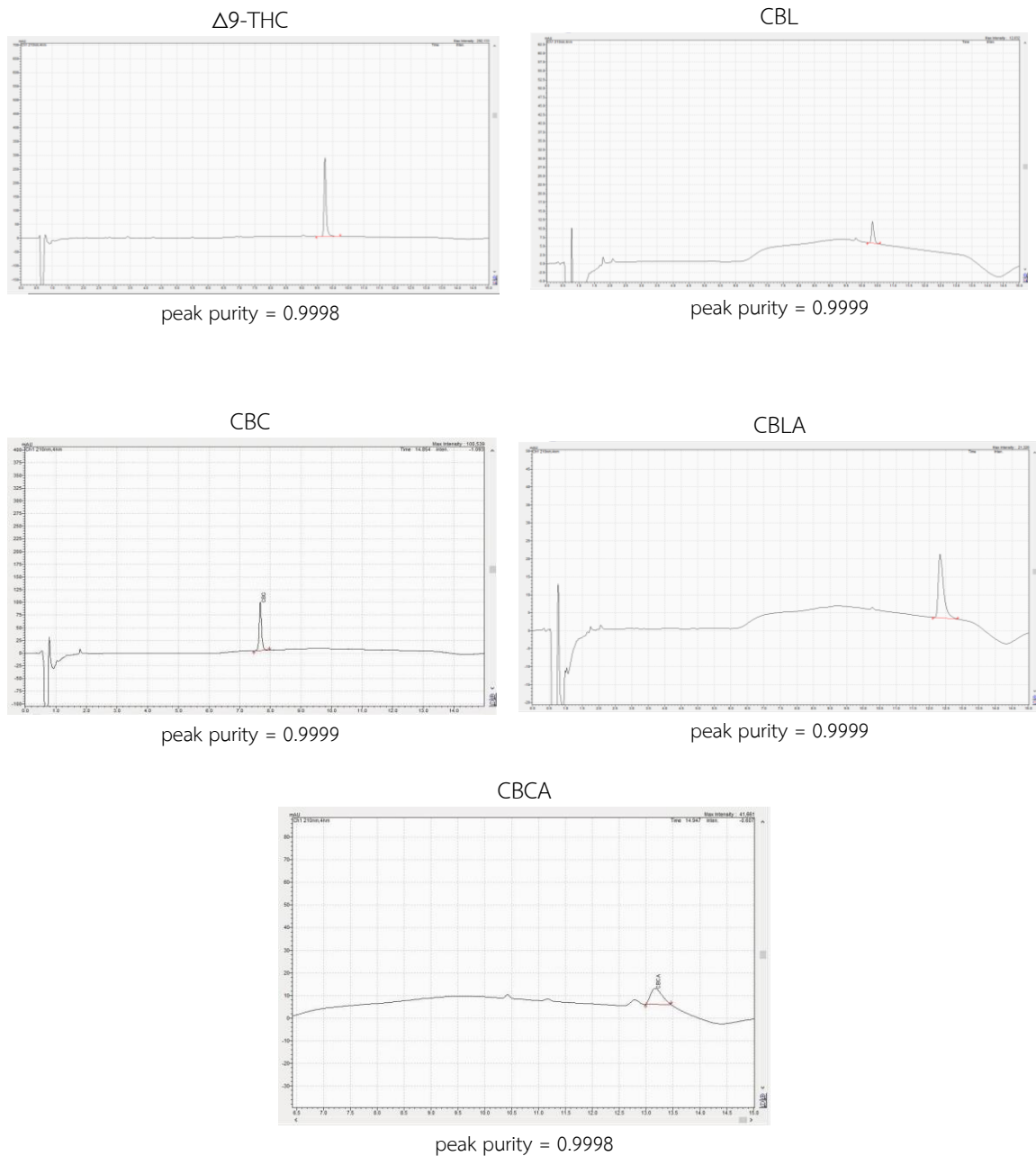
จากการทดสอบสภาวะเบื้องต้น (preliminary test) โดยใช้ UHPLC Column C18 1.7 μm , 2.1x100 mm ที่มีอยู่ในห้องปฏิบัติการ ทดสอบสภาวะต่างๆ จากงานวิจัยก่อนหน้านี้ โดยวิเคราะห์สาร cannabinoids ทั้ง 9 ชนิดพร้อมกัน พบว่า มีสารบางชนิดที่ไม่สามารถแยกจากกันได้ หรือแยกจากกันไม่ได้ ไม่ดี เนื่องจากคอลัมน์ที่มีอยู่ในห้องปฏิบัติการเป็นคอลัมน์ชนิดกับในข้อมูลที่ศึกษา จึงได้ปรับสภาวะการทดสอบแบบ gradient ดังแสดงในตารางที่ 1 เพื่อให้เกิดการแยกของสารแต่ละชนิดอย่างเฉพาะเจาะจง และมีประสิทธิภาพมากขึ้น พบว่า ที่ความยาวคลื่น 210, 220, 240, 270 nm สามารถตรวจพบสารมาตรฐานทั้ง 9 สาร ในกลุ่ม cannabinoids (CBDA, CBD, CBG, CBN, Δ^9 -THC, CBL, CBC, CBLA, และ CBCA) ได้ โดยที่ความยาวคลื่น 210 nm ให้ค่าสัญญาณคลื่นที่สูงที่สุด และมีค่า retention time ของแต่ละสารแตกต่างกัน รวมทั้งมีค่า peak purity ในช่วง 0.9979-0.9999 แสดงว่าสัญญาณเป็นของสารเดี่ยว ดังแสดงในตารางที่ 2 ซึ่งสามารถใช้เป็นข้อมูลในการพัฒนาวิธีการตรวจสารทั้ง 9 สารนี้พร้อมกันได้

ตารางที่ 2 Chromatogram และค่า peak purity ของสารมาตรฐาน แต่ละชนิด ที่ 210 nm

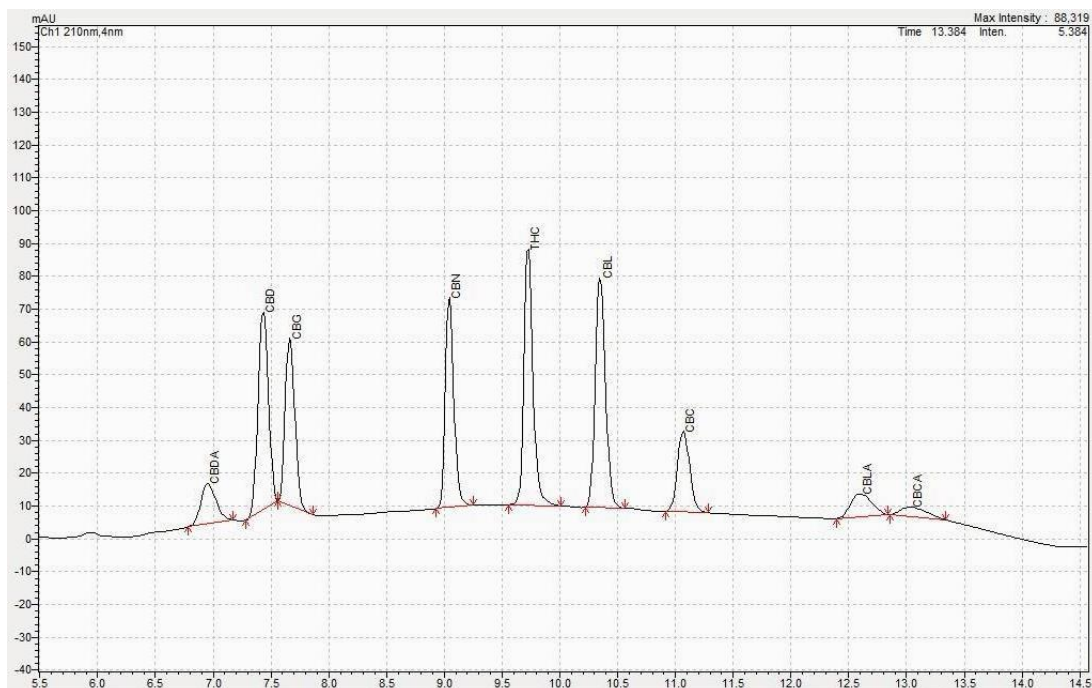
Chromatogram at 210 nm



Chromatogram at 210 nm



5.2 ผลการทดสอบประสิทธิภาพการแยกของสารมาตรฐานผสม 9 สาร ในกลุ่ม cannabinoids จากการตรวจสอบประสิทธิภาพของวิธีทดสอบในการแยกสารมาตรฐานผสม 9 สาร ในกลุ่ม cannabinoids (THC, CBD, CBDA, CBG, CBN, CBC, CBCA, CBL และ CBLA) พบว่า ทั้ง 9 สาร มีค่า retention time ที่แตกต่างกัน แสดงว่าการแยกมีประสิทธิภาพดี และพบว่ามีค่า resolution ของสาร 7 ชนิด มีค่ามากกว่า 1.5 แสดงว่า peak ของสารแต่ละชนิดแยกออกจากกันได้ชัดเจนและยอมรับได้ตามเกณฑ์ AOAC (2023) ยกเว้น สาร CBG และ CBCA ที่มีค่า resolution น้อยกว่า 1.5 ดังแสดงในรูป 1 และตาราง 3



รูปที่ 1 Chromatogram ของสารมาตรฐานผสม 9 สาร (CBDA, CBD, CBG, CBN, Δ 9-THC, CBL, CBC, CBLA, และ CBCA) ที่ 210 nm

ตารางที่ 3 ค่า retention time และค่า resolution ของสารมาตรฐาน 9 สารในกลุ่ม cannabinoids (CBDA, CBD, CBG, CBN, Δ 9-THC, CBL, CBC, CBLA, และ CBCA)

สาร	retention time (min)	resolution	tailing factor	S/N
CBDA	6.839	0	1.561	334.0
CBD	7.378	2.829	1.149	656.5
CBG	7.606	1.423	1.151	912.4
CBN	8.980	9.469	1.258	1509.5
Δ 9-THC	9.656	5.048	1.185	167.1
CBL	10.261	4.184	1.117	468.6
CBC	10.954	4.197	1.079	416.1
CBLA	12.321	6.443	1.403	117.7
CBCA	12.669	1.242	1.577	89.7

สำหรับ CBG และ CBCA ที่พบว่ามีค่า resolution น้อยกว่า 1.5 แสดงว่า มีความเสี่ยงที่จะเกิดการซ้อนทับของพีค (peak overlap) ซึ่งจากการศึกษานานวิจัยที่เกี่ยวข้อง พบว่า CBG มีโครงสร้างและหมู่ฟังก์ชันใกล้เคียงกับ CBD ทำให้มีความเป็นขั้วใกล้เคียงกัน โดยงานวิจัยของ Citti *et al.* (2018) รายงานว่า CBG และ CBD มีค่า retention time ใกล้เคียงกันมาก ทำให้มักเกิดปัญหา peak overlap หากไม่มีการปรับ mobile phase ที่เหมาะสม ส่วน CBCA มีโครงสร้างและความเป็นขั้วสูงใกล้เคียงกับ CBLA ซึ่งงานวิจัยของ Ferraro *et al.* (2023) ระบุว่า การแยก CBCA และ CBLA ออกจากกันอย่างชัดเจนค่อนข้างทำได้ยาก เนื่องจากมีความเป็นขั้วและโครงสร้างทางเคมีคล้ายคลึงกัน ซึ่งให้แนวคิดในการเติมสารที่เป็นกรด เช่น Trifluoroethanoic acid (TFA) ลงในเฟสเคลื่อนที่ จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการแยกของพีคให้ดีขึ้นได้

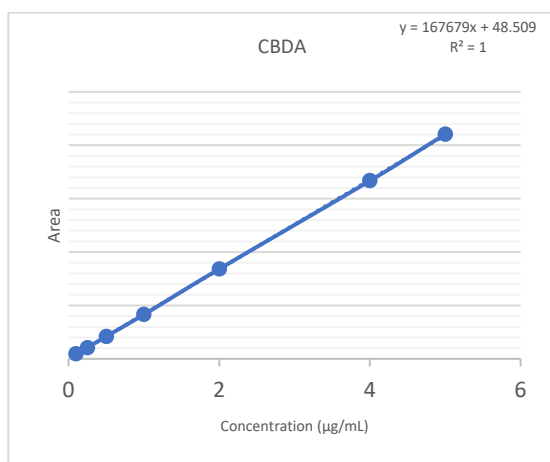
งานวิจัยนี้จึงศึกษาค่าจากการทดสอบอื่นๆ เพิ่มเติม เพื่อประเมินประสิทธิภาพของการแยกสาร ด้วยวิธีที่พัฒนาได้นี้ ได้แก่ ค่า tailing factor ที่ใช้ประเมินความสมมาตรของ peak พบว่า ทุกสารมีค่าใกล้ 1.0 และไม่เกิน 2.0 แสดงว่าทุก peak มีความสมมาตร สามารถระบุชนิดของสารและทำ integration ได้แม่นยำ และศึกษาค่า signal-to-noise ratio (S/N) ที่ใช้ประเมินสัญญาณของ peak เทียบกับสัญญาณรบกวน ซึ่งพบว่า ทุก peak มี S/N มากกว่า 10 แสดงว่าสัญญาณที่ตรวจวัดได้สามารถใช้ตรวจและหาปริมาณสารแต่ละชนิดอย่างเชื่อถือได้ ดังแสดงในตารางที่ 3 แต่ทั้งนี้ ควรปรับสภาวะการแยกสาร CBG และ CBCA ให้มีค่า resolution อยู่ในเกณฑ์การยอมรับ หรือใช้เทคนิคที่ประสิทธิภาพดีกว่า เช่น Liquid Chromatography – Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS) มาช่วยตรวจยืนยันผลการตรวจวิเคราะห์ เพื่อให้การหาปริมาณสารมีความถูกต้องและแม่นยำมากขึ้น

5.3 ผลการทดสอบความเป็นเส้นตรง (linearity) และช่วงการวิเคราะห์ (working range)

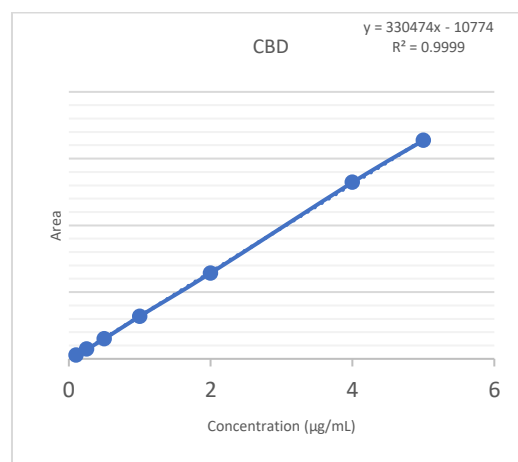
เมื่อทดสอบความเป็นเส้นตรง (linearity) ของสารมาตรฐาน 9 สาร โดยพิจารณาจากกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานและพื้นที่ใต้พีค พบว่า กราฟมาตรฐานของแต่ละสารมีลักษณะเป็นเส้นตรง มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) ของแต่ละสารอยู่ในช่วง 0.9994 – 0.9999 และมีช่วงการวิเคราะห์ (working range) ที่ความเข้มข้น 0.10–5.00 $\mu\text{g/mL}$ ดังแสดงในตารางที่ 4 และรูปที่ 2-10

ตารางที่ 4 ค่า Coefficient of determination (r^2), correlation coefficient (r) และ working range ของสารมาตรฐานในกลุ่ม cannabinoids (CBDA, CBD, CBG, CBN, Δ^9 -THC, CBL, CBC, CBLA, และ CBCA)

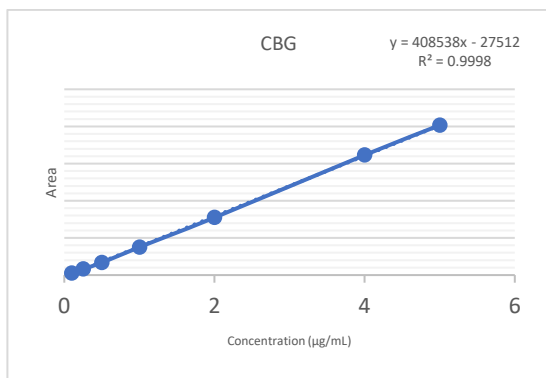
สาร	r^2	r	working range ($\mu\text{g/mL}$)
CBDA	1.0000	0.9999	0.10–5.00
CBD	0.9999	0.9999	0.10–5.00
CBG	0.9998	0.9999	0.10–5.00
CBN	0.9998	0.9999	0.10–5.00
Δ^9 -THC	0.9998	0.9999	0.10–5.00
CBL	0.9999	0.9999	0.10–5.00
CBC	0.9994	0.9997	0.10–5.00
CBLA	0.9987	0.9994	0.10–5.00
CBCA	0.9999	0.9999	0.10–5.00



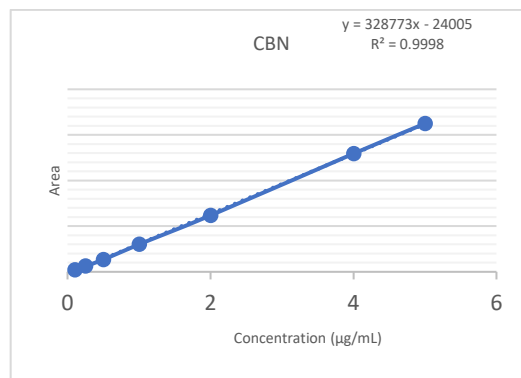
รูปที่ 2 calibration curve of CBDA



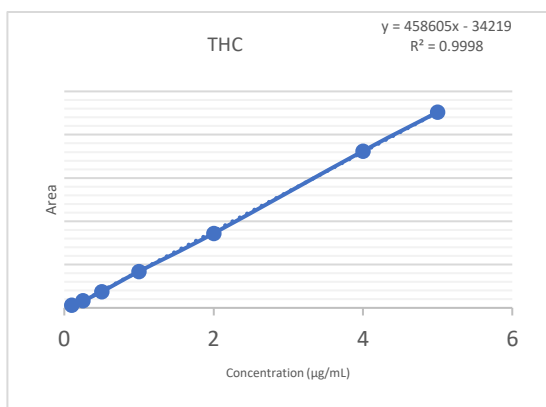
รูปที่ 3 calibration curve of CBD



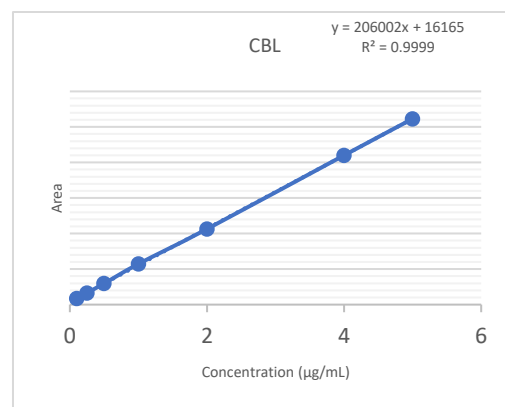
รูปที่ 4 calibration curve of CBG



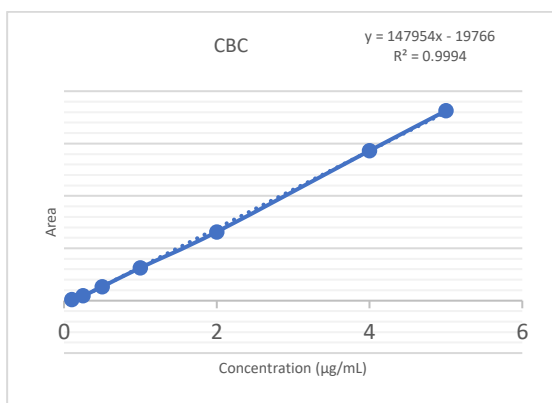
รูปที่ 5 calibration curve of CBN



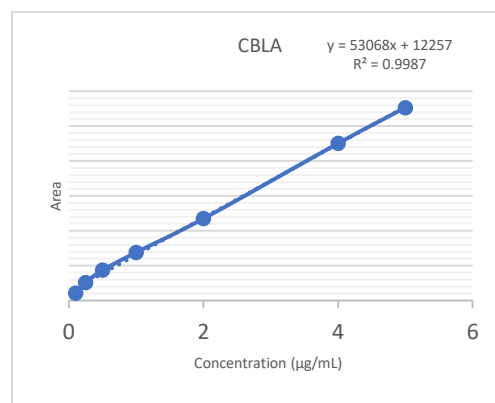
รูปที่ 6 calibration curve of THC



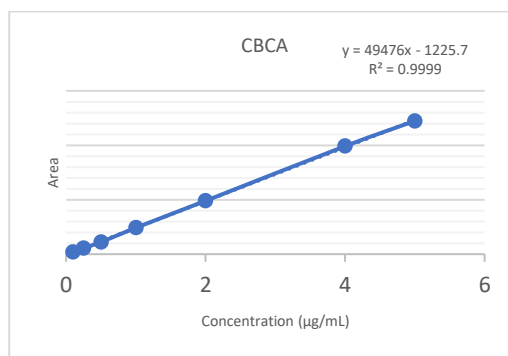
รูปที่ 7 calibration curve of CBL



รูปที่ 8 calibration curve of CBC



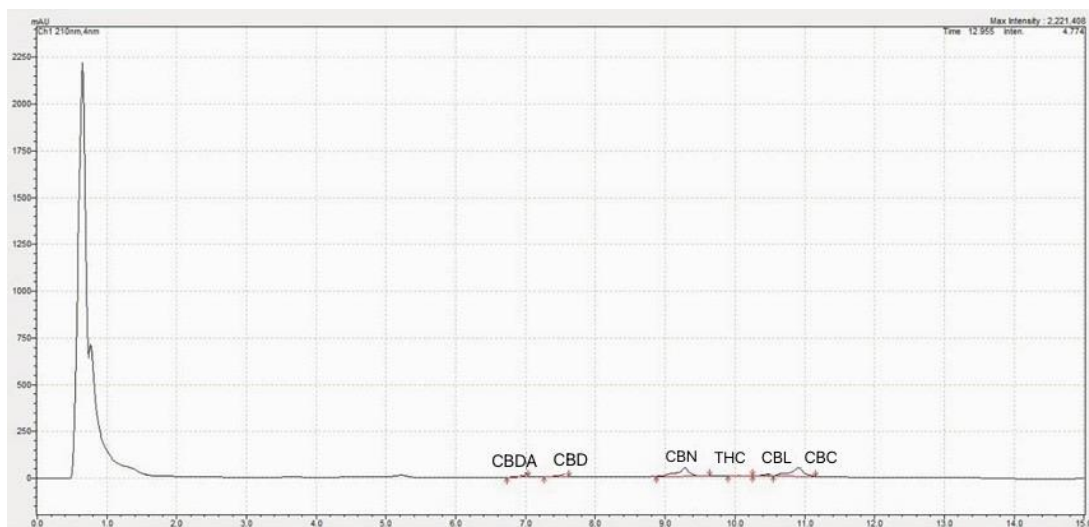
รูปที่ 9 calibration curve of CBLA



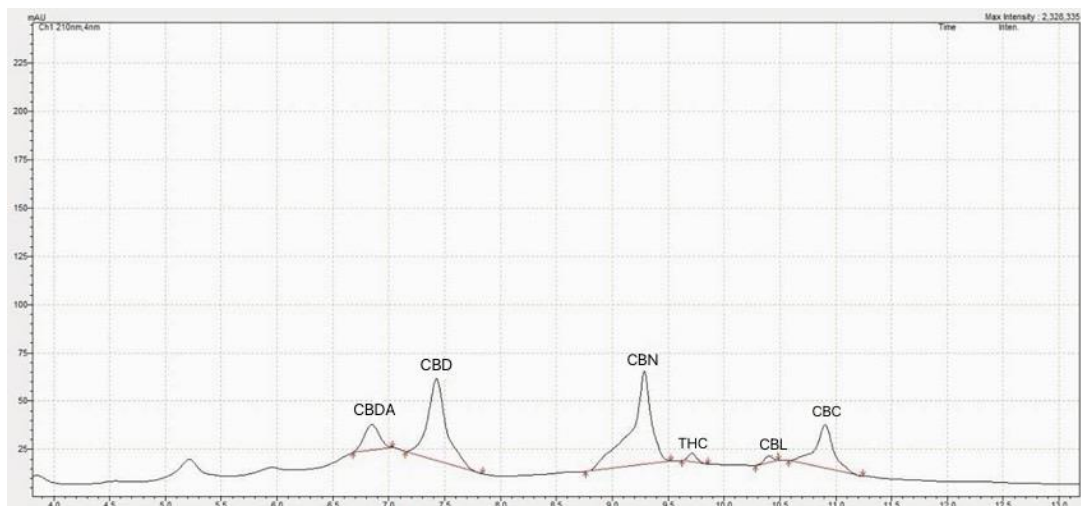
รูปที่ 10 calibration curve of CBCA

5.4 ผลการทดสอบหาสาร cannabinoids ในส่วนต่างๆ ของพืชกัญชง

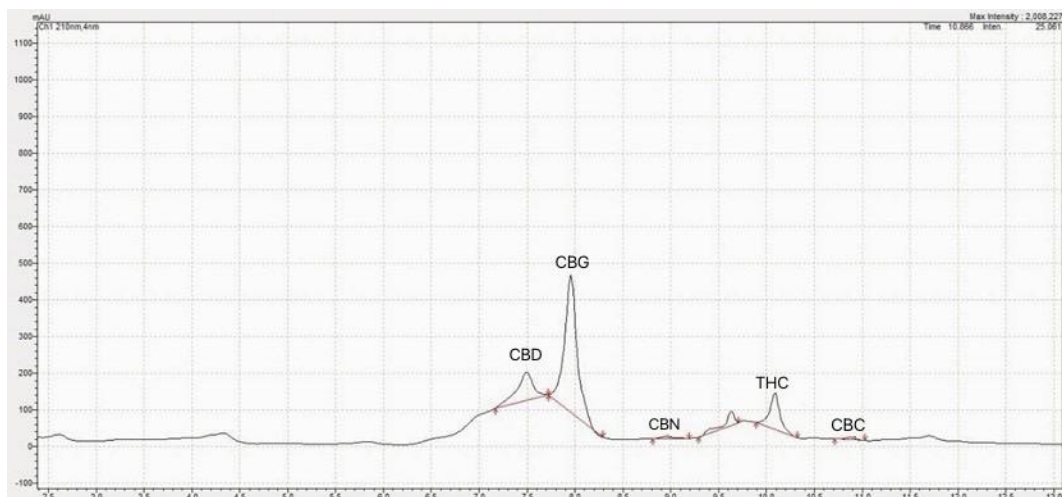
เมื่อสกัดส่วนต่างๆ ของพืชกัญชง ได้แก่ ราก ลำต้น ใบรวมกิ่งก้าน และช่อดอกพืชกัญชง ที่มีช่วงอายุการปลูกที่แตกต่างกัน และทดสอบด้วยวิธีที่พัฒนาได้ พบว่า สามารถทดสอบได้ทั้งส่วนราก ลำต้น ใบรวมกิ่งก้าน และช่อดอกพืชกัญชง ดังแสดงใน chromatogram รูปที่ 11-14 โดยแต่ละส่วนมีชนิดและปริมาณสารกลุ่ม cannabinoids ที่แตกต่างกัน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสภาวะการปลูก และอายุของพืชด้วย ซึ่งสามารถนำข้อมูลนี้ไปใช้ศึกษาเพิ่มเติม และนำไปใช้ประโยชน์กับหน่วยงานที่เกี่ยวข้องเพื่อการเลี้ยงปศุสัตว์และสัตว์เลี้ยงต่อไปได้



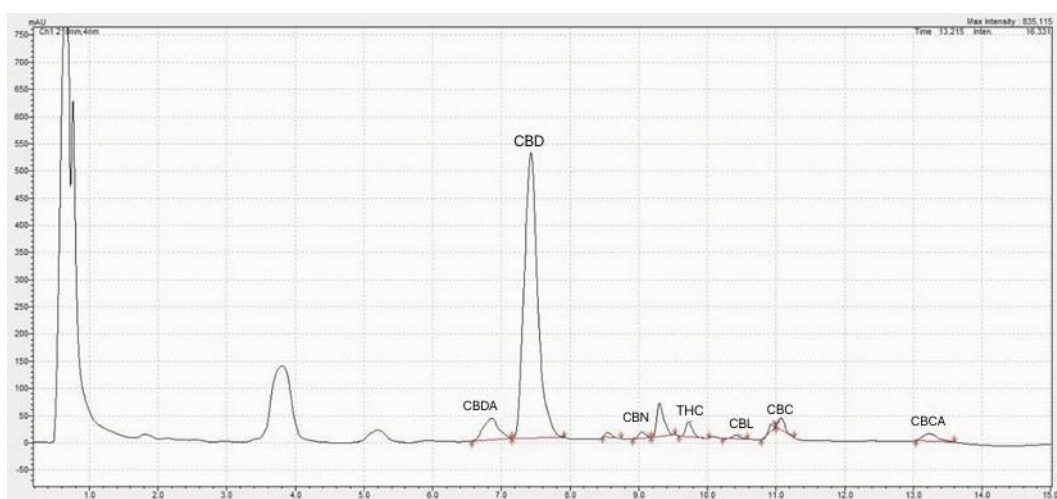
รูปที่ 11 chromatogram ที่ 210 nm แสดงการตรวจพบสารกลุ่ม cannabinoids ในสารสกัดจากรากกัญชง



รูปที่ 12 chromatogram ที่ 210 nm แสดงการตรวจพบสารกลุ่ม cannabinoids ในสารสกัดจากลำต้นกัญชง



รูปที่ 13 chromatogram ที่ 210 nm แสดงการตรวจพบสารกลุ่ม cannabinoids ในสารสกัดจากใบรวมกิ่งก้านกัญชง



รูปที่ 14 chromatogram ที่ 210 nm แสดงการตรวจพบสารกลุ่ม cannabinoids ในสารสกัดจากช่อดอกกัญชง

6. สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาการทดสอบสารกลุ่ม cannabinoids ทั้ง 9 ชนิด ได้แก่ CBDA, CBD, CBG, CBN, Δ^9 -THC, CBL, CBC, CBLA, และ CBCA ภายใต้วิธีการและสภาวะที่พัฒนาขึ้นในห้องปฏิบัติการ สามารถแยกสารทั้ง 9 ชนิด ได้พร้อมกันในครั้งเดียว ในเวลา 15 นาที โดยค่า resolution ของสาร 7 ชนิดเป็นไปตามเกณฑ์ AOAC (2023) ยกเว้น สาร CBG และ CBCA ที่มีค่า resolution น้อยกว่า 1.5 และเมื่อตรวจสอบความสัมพันธ์เชิงเส้นของสารทั้ง 9 ชนิด พบว่ามีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) ในช่วง 0.9994 – 0.9999 เป็นไปตามเกณฑ์การยอมรับที่กำหนด และมีช่วงการวิเคราะห์ (working range) ที่ความเข้มข้น 0.10–5.00 $\mu\text{g/mL}$ ทั้งนี้วิธีที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถนำไปใช้ในการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบหาปริมาณสาร cannabinoids โดยเทคนิค UHPLC-DAD โดยเฉพาะสาร THC และ CBD ที่เป็นสารออกฤทธิ์ที่สำคัญในสมุนไพรกัญชงและกัญชาต่อไปได้

7. ข้อเสนอแนะ

ควรปรับสภาวะการแยกสาร CBG และ CBGA ให้มีค่า resolution อยู่ในเกณฑ์การยอมรับ หรือ พัฒนาวิธีตรวจวิเคราะห์ที่มีประสิทธิภาพดีกว่า เช่น Liquid Chromatography – Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS) มาช่วยตรวจยืนยันผลการตรวจวิเคราะห์ของเทคนิค UHPLC ที่พัฒนาได้ นี้ และตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ รวมทั้งเตรียมความพร้อมขอการรับรองมาตรฐาน ห้องปฏิบัติการ ISO-IEC 17025:2017 ต่อไป

8. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณผู้อำนวยการสำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ที่พิจารณาให้ดำเนินงานในปีงบประมาณ 2568 และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการกลุ่มตรวจสอบคุณภาพยาสัตว์และวัตถุอันตรายด้านการปศุสัตว์ที่ช่วยเหลือในการปฏิบัติงาน

9. เอกสารอ้างอิง

- AOAC. 2023. Official Methods of Analysis, 22th Ed. AOAC INTERNATIONAL, Method 2000.08.
- Bhupendra, P., Wene, D., and Fan, Z. 2017. Qualitative and quantitative measurement of cannabinoids in cannabis using modified HPLC/DAD method. J. Pharm. Biomed. Anal. 146: 15-23.
- Citti, C., Braghiroli, D., Vandelli, M.A., and Cannazza, G. 2018. Pharmaceutical and biomedical analysis of cannabinoids: a critical review. J. Pharm. Biomed. Anal. 147: 565-579.
- Ciolino, L.A., Ranieri, T.L., and Taylor, M.A. 2018. Commercial cannabis consumer products part 2: HPLC-DAD quantitative analysis of cannabis cannabinoids. Forensic Sci. Int. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2018.05.033>
- Ferraro, J.M., Umstead, W.J. 2023. Chiral Separation of Cannabichromene, Cannabicyclol, and Their Acidic Analogs on Polysaccharide Chiral Stationary Phases. Molecules 28, 1164. <https://doi.org/10.3390/molecules28031164>
- Kanabus, J., Marcin, B., and Roszko, M. 2023. The development, validation, and application of a UHPLC-HESI-MS method for the determination of 17 cannabinoids in Cannabis sativa L. var. sativa plant material. Molecules 28: 8008.
- Nahar, L., Onder, A., and Sarker, S.D. 2019. A review on the recent advances in HPLC, UHPLC and UPLC analyses of naturally occurring cannabinoids (2010-2019). Phytochem. Anal. 31 (4): 413-457.
- Silva, E.M.P., Vitiello, A., Miro, A., and Ribeiro, C.J.A. 2025. Recent HPLC-UV approaches for cannabinoid analysis: from extraction to method validation and quantification compliance. Pharmaceuticals 18: 786. <https://doi.org/10.3390/ph18060786>
- Thai Herbal Pharmacopoeia. 2021. Monographs กัญชา, ใบ (KANCHA, BAI). Supplement: 37-48.
- Thai Herbal Pharmacopoeia. 2021. Monographs กัญชา, เรือนช่อดอกเพศเมีย (KANCHA, RUEAN CHO DOK PHET MIA): 153-168.

W. J. Umstead. 2021. Cannabis Science and Technology 4(6), 44-51.

ธนวัฒน์ ทองจีน, สรเพชร มาสุด, และ พีรธรรม เทียมเทียบรัตน์. 2564. การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณแคนนาบินอยด์ในใบกัญชาด้วยวิธี Ultra-High Performance Liquid Chromatography. วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ 63 (2): 120-134.

สกลรัตน์ สมสันติสุข, อัจฉรี อินแก้ว, เสาวนีย์ วาจาสิทธิ์, สุวิมล หมวดม๊ะ, กัญญารัตน์ เชื้อกุลชาติ, วิทวัส วังแก้วหิรัญ และ ทองสุข ปายะนันท์. 2564. การพัฒนาและทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์สารกลุ่มแคนนาบินอยด์ในน้ำมะพร้าว โดยเทคนิค LC-MS/MS. วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ 63 (3): 556-570.

สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา กระทรวงสาธารณสุข. 2563. เมล็ดกัญชง น้ำมันจากเมล็ดกัญชง โปรตีนจากเมล็ดกัญชง และผลิตภัณฑ์อาหารที่มีส่วนประกอบของเมล็ดกัญชง น้ำมันจากเมล็ดกัญชง หรือโปรตีนจากเมล็ดกัญชง, ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 425 พ.ศ. 2564. ราชกิจจานุเบกษา 138 (ตอนพิเศษ 49 ง).

สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา กระทรวงสาธารณสุข. 2564. ผลิตภัณฑ์อาหารที่มีส่วนประกอบของส่วนของกัญชาหรือกัญชง, ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 427 พ.ศ. 2564. ราชกิจจานุเบกษา 138 (ตอนพิเศษ 168 ง)