การพัฒนาวิธีและตรวจสอบความใช้ได้ของการทดสอบสาร CBD และ Δ9-THC ในพืชกัญชง โดยเทคนิค liquid chromatography mass spectrometry

สวนันท์ ทองหยู ศศิกานต์ วุฒิกานต์นนท์ รัตนาภรณ์ ชนประชา และนรยา ตั้งศิริทรัพย์

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สาร Cannabidiol (CBD) และ Tetrahydrocannabinol (Δ9-THC) ในพืชกัญชงด้วยเทคนิค Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (LC-MS/MS) โดยใช้คอลัมน์ Phenomenex C18 (ขนาด 1.7 ไมโครเมตร, 2.1 x 100 มิลลิเมตร) อัตราการไหล 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที ปริมาณการฉีด 5 ไมโครลิตร และใช้ระบบเฟสเคลื่อนที่แบบ Gradient Elution ระหว่าง 0.1% กรดฟอร์มิกในน้ำและ 0.1% กรดฟอร์มิกในอะซีโตไนไทรล์ ผลการศึกษาพบว่า วิธีดังกล่าวสามารถชะแยกสาร CBD และ Δ9-THC รวมถึงแคนนาบินอยด์อื่น ๆ ได้แก่ CBDA, CBG, CBN, CBC, CBCA, CBL และ CBLA ให้ออกจากกันอย่างจำเพาะภายในเวลา 15 นาที เมื่อตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีตามแนวทาง AOAC Appendix K (2023) พบว่า สาร CBD และ Δ9-THC มีความเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 50 - 1000 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (r^2) เท่ากับ 0.9994 และ 0.9996 ตามลำดับ มีขีดจำกัดการตรวจวัด (LOD) เท่ากับ 25 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และขีดจำกัดการตรวจวัดปริมาณ (LOQ) เท่ากับ 50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ทั้งนี้ ค่าความถูกต้อง (ร้อยละการคืนกลับ) และความเที่ยง (การทวนซ้ำและการทำซ้ำ) อยู่ในเกณฑ์มาตรฐานที่กำหนด รวมถึงให้ผลการทดสอบความชำนาญของห้องปฏิบัติการเป็นที่น่าพอใจ สรุปได้ว่า วิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นนี้มีความเหมาะสมและความน่าเชื่อถือสูง สามารถนำไปใช้เป็นวิธีมาตรฐานในห้องปฏิบัติการเพื่อควบคุมการนำพืชกัญชงและผลิตภัณฑ์เข้าสู่ภาคปศุสัตว์ให้เป็นไปตามกฎหมายและมาตรฐานที่กำหนด

คำสำคัญ: กัญชง กัญชา CBD Δ9-THC LC-MS/MS

กลุ่มตรวจสอบคุณภาพยาสัตว์และวัตถุอันตรายด้านการปศุสัตว์ สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์

Method development and validation for the determination of CBD and Δ9-THC in hemp by liquid chromatography mass spectrometry

Sawanan Thongyoo Sasikarn Wuttikannon Rattanaporn Chonpracha and Naraya Tangsirisap

Abstract

This study aimed to develop and validate an analytical method for the determination of cannabidiol (CBD) and tetrahydrocannabinol (Δ9-THC) in hemp using liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS/MS). The analysis was performed using a Phenomenex C18 column (1.7 µm, 2.1 x 100 mm) at a flow rate of 0.5 mL/min with an injection volume of 5 µL. A gradient elution program was applied using a mobile phase consisting of 0.1% formic acid in water and 0.1% formic acid in acetonitrile. The results demonstrated that the method could specifically separate CBD and Δ9-THC, as well as other cannabinoids, including CBDA, CBG, CBN, CBC, CBCA, CBL, and CBLA, within 15 minutes. Method validation was conducted according to the AOAC Appendix K (2023) guidelines. The calibration curves for CBD and Δ9-THC exhibited good linearity over the concentration range of 50 - 1000 ng/mL, with coefficients of determination (r^2) of 0.9994 and 0.9996, respectively. The limit of detection (LOD) was established at 25 ng/mL, and the limit of quantification (LOQ) was 50 ng/mL. The accuracy (recovery rate) and precision (repeatability and reproducibility) fell within acceptable criteria. Furthermore, the laboratory proficiency testing yielded satisfactory results. In conclusion, this developed method is highly suitable and reliable for use as a standard laboratory procedure to monitor and control the application of hemp and its extracts in the livestock sector, ensuring compliance with legal requirements and established standards.

Keywords: hemp CBD Δ9-THC liquid chromatography mass spectrometry

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

บทนำ

ในปัจจุบันพืชกัญชง (hemp) และกัญชา (Marijuana) กำลังได้รับความสนใจอย่างกว้างขวางในฐานะพืชเศรษฐกิจและพืชสมุนไพรที่มีศักยภาพทางยา ซึ่งมีสารกลุ่มแคนนาบินอยด์ (Cannabinoids) เป็นสารประกอบสำคัญกว่า 100 ชนิด แต่สารที่ถูกนำมาศึกษา วิจัยและใช้ประโยชน์มากที่สุด คือ Cannabidiol (CBD) และ Delta-9-Tetrahydrocannabinol (Δ9-THC) โดย CBD เป็นสารที่ไม่ออกฤทธิ์ต่อจิตและประสาท (non-psychotropic compound) มีคุณสมบัติทางการแพทย์หลายด้าน เช่น ลดอาการปวด ลดการอักเสบ ต้านการชัก และลดความวิตกกังวล เป็นต้น ส่วน Δ9-THC เป็นสารที่ออกฤทธิ์ต่อจิตและประสาท (psychotropic compound) จะออกฤทธิ์คล้ายกับสารสื่อประสาท Endocannabinoid ที่ร่างกายสร้างขึ้นเอง เพื่อระบบรักษาสมดุลร่างกายทั้งในคนและสัตว์ ซึ่งเมื่อ CBD และ Δ9-THC จับกับตัวรับจำเพาะชนิด CB1 ที่พบมากในสมอง จะส่งผลให้รู้สึกมีความสุข และเมื่อจับกับตัวรับจำเพาะชนิด CB2 ที่พบมากในระบบภูมิคุ้มกันและเส้นประสาทส่วนปลาย จะส่งผลต่อสมองส่วนที่รับรู้ความรู้สึกลดความเจ็บปวด ความกังวล ดังนั้นผลของการได้รับสารกลุ่ม CBD และ Δ9-THC จึงคล้ายกับยาแก้ปวดและยาที่ออกฤทธิ์ต่อจิตประสาท การนำสารนี้มาใช้จึงอาจก่อได้ทั้งประโยชน์และโทษ ขึ้นอยู่กับปริมาณที่รับเข้าไปและสภาพร่างกาย โดยพืชกัญชงและกัญชามีองค์ประกอบทางเคมีใกล้เคียงกัน แต่มีสัดส่วนของสารสำคัญที่ต่างกัน โดยพืชกัญชงจะมีปริมาณ CBD สูง และมีปริมาณ THC ในช่อดอกไม่เกิน 1.0% โดยน้ำหนักแห้ง ซึ่งต่ำกว่าพืชกัญชาที่มีปริมาณสาร THC ในช่อดอกมากกว่า 1.0% โดยน้ำหนักแห้ง (กรมวิชาการเกษตร, 2564; ศูนย์ความปลอดภัยอาชีวอนามัยและสิ่งแวดล้อม จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2565) นอกจากนี้ในพืชกัญชงและกัญชายังมีสารสำคัญอื่นๆ ในกลุ่ม cannabinoids ที่เริ่มถูกนำมาศึกษาและใช้ประโยชน์ในรูปแบบผสมผสาน เช่น cannabinol (CBN), cannabichromene (CBC), cannabigerol (CBG), cannabichromevarin (CBCV), cannabidivarin (CBDV), Δ9-tetrahydrocannabivarin (THCV) และ tetrahydrocannabinolic acid (THCA) เป็นต้น

ในปี 2562 ประเทศไทยเคยอนุญาตให้มีการนำกัญชงและกัญชามาศึกษาวิจัยและใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ และมีการส่งเสริมการนำกัญชงและกัญชามาใช้ประโยชน์ในผลิตภัณฑ์สุขภาพ เครื่องสำอาง และอาหารเพื่อการบำบัดรักษาโรคทั้งในคนและสัตว์ โดยในทางปศุสัตว์มีการนำกัญชามาใช้ประโยชน์ที่หลากหลาย เช่น ใช้บรรเทาปวดจากโรคข้อเข่าเสื่อม ใช้ระงับอาการชักในโรคลมชัก และใช้ร่วมกับการรักษาโรคมะเร็งเพื่อลดผลไม่พึงประสงค์จากการใช้ยาต้านมะเร็ง ได้แก่ บรรเทาการอาเจียนจากยาเคมีบำบัด กระตุ้นความอยากอาหารภายหลังการได้รับยาเคมีบำบัด และบรรเทาความเจ็บปวดจากมะเร็ง (ปิยะรัตน์ และคณะ, 2562) แต่ปัจจุบันประเทศไทยได้ยุติการใช้กัญชาเสรีและเปลี่ยนเข้าสู่การควบคุมอย่างเข้มงวด โดยให้เน้นการใช้ประโยชน์ในทางการแพทย์เท่านั้น ซึ่งกรมปศุสัตว์มีแนวทางการนำกัญชงกัญชามาใช้เป็นอาหารสัตว์ควบคุมเฉพาะหรือเป็นส่วนผสมในอาหารสัตว์ควบคุมเฉพาะ พ.ศ. 2565 โดยกำหนดให้การนำกัญชงกัญชามาใช้หรือเป็นส่วนผสมในอาหารสัตว์ควบคุมเฉพาะ ต้องมาจากพืชที่ปลูกภายในประเทศและมาจากแหล่งผลิตที่ได้รับอนุญาตเท่านั้น โดยห้ามใช้ส่วนของยอด ช่อดอก เมล็ด รวมถึงสารสกัดจากส่วนดังกล่าวโดยเด็ดขาด ส่วนของพืชหรือสารสกัดอื่นๆ ที่อนุญาตให้ใช้ จะต้องผ่านการตรวจวิเคราะห์จากห้องปฏิบัติการมาตรฐาน ซึ่งต้องไม่พบสาร THC และ CBD เว้นแต่มีงานวิจัยรองรับด้านประสิทธิภาพและความปลอดภัย โดยต้องมีปริมาณสาร THC ไม่เกินร้อยละ 0.2 โดยน้ำหนัก ดังนั้น การพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ปริมาณสาร CBD และTHC ที่มี

ความถูกต้องและแม่นยำ จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งในการควบคุมการนำกัญชง กัญชา รวมถึงสารสกัดของกัญชง กัญชา มาใช้ในทางปศุสัตว์ให้เป็นไปตามกฎหมายและมาตรฐานกำหนด

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การตรวจวิเคราะห์สารกลุ่ม cannabinoids ในพืชและผลิตภัณฑ์จากกัญชงและกัญชาโดยวิธีทางห้องปฏิบัติการมีหลากหลายเทคนิค 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) ซึ่งเทคนิคหลักที่นิยมใช้คือ HPLC และ GC แต่เทคนิค GC มีข้อจำกัดคือไม่สามารถแยกอนุพันธุ์ของ cannabinoids ในรูปกรดและกลางได้ เนื่องจากเมื่อ cannabinoid acid ได้รับความร้อนสูงจากกระบวนการตรวจวิเคราะห์จะเกิด decarboxylation สลายตัวเป็น natural cannabinoids ทำให้ผลวิเคราะห์ที่ได้จะเป็นผลรวมในรูปของ total cannabinoid contents หากต้องการวิเคราะห์โดยแยกชนิดสารจะต้องผ่านกระบวนการ derivatization ซึ่งมีความยุ่งยากและซับซ้อน (Lazarjani *et al.*, 2020, Kanabus *et al.*, 2023)

Christinat *et al.* (2020) ได้สกัดผลิตภัณฑ์อาหารที่มีส่วนผสมของกัญชงด้วย acetonitrile และใช้เทคนิค QuEChERS ร่วมกับส่วนผสมของเกลือ QuEChERS (Magnesium sulfate, Sodium chloride, Trisodium citrate dihydrate และ Disodium hydrogencitrate sesquihydrate) เพื่อช่วยในการแยกชั้นสาร ตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Liquid Chromatography – Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS) โดยใช้คอลัมน์ Waters ACQUITY UPLC BEH Shield RP18 1.7 µm ขนาด 100 x 2.1 mm ใช้สารละลายเฟสเคลื่อนที่ คือ 0.1% Formic acid ใน DI water และ Acetonitrile สามารถตรวจวัดสารสำคัญ 15 ชนิด ได้แก่ CBD, CBDA, CBN, Δ9-THC, THCA-A, CBC, CBCA, CBDVA, CBG, CBGA, CBDV, THCV, THCVA, THC-COOH, Δ8-TH ในเวลา 13 นาที และทดสอบวิธีการทำความสะอาดตัวอย่าง (Sample cleaning) ด้วยเทคนิค dispersive Solid Phase Extraction (d-SPE) ที่มีส่วนผสมของ $MgSO_4$ ร่วมกับตัวดูดซับชนิดต่างๆ ได้แก่ C18, Primary Secondary Amines (PSA) และ Zirconia-coated silica (Z-Sep) ผลการทดสอบพบว่า เมื่อใช้ d-SPE ที่มีส่วนผสมของ PSA มีค่าการคืนกลับ (Recovery) ของ cannabinoic acids ที่ต่ำมาก เนื่องจากกลุ่ม amine ถูกดักจับและเกิดอันตรกิริยากับหมู่ carboxylic acid ของสารเหล่านี้ ส่วนการใช้ $MgSO_4$ ร่วมกับ C18 หรือ Z-Sep ให้ผลการคืนกลับและผลกระทบจากเมทริกซ์ (Matrix effects) ที่น่าพึงพอใจ แต่เมื่อเปรียบเทียบตัวอย่างที่ผ่านการทำความสะอาดด้วย d-SPE และไม่ผ่านการทำความสะอาดด้วย d-SPE กับการเจือจางตัวอย่างลง 50 เท่า เพื่อจำกัดผลกระทบจากเมทริกซ์ พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้นจึงไม่จำเป็นต้องมีการใช้ขั้นตอนการทำความสะอาดตัวอย่างด้วย d-SPE เพื่อลดขั้นตอนและค่าใช้จ่ายในการทดสอบ

สกุลรัตน์ และคณะ (2021) ได้สกัดตัวอย่างกัญชาด้วย dichloromethane แล้ว clean-up ด้วย SPE HLB cartridge ตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค 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, Δ9-THC, Δ8-THC, THCA และ THCV ในเวลา 15 นาที

Garnet *et al.* (2021) ได้สกัดตัวอย่างกัญชงและกัญชาแห้ง และน้ำมันกัญชา ด้วย methanol ตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค LC-MS/MS ใช้คอลัมน์ Thermo Scientific Accucore C18 1.7 µm ขนาด 100 x 2.1 mm สารละลาย

เฟสเคลื่อนที่ คือ 0.1% formic acid ใน DI water และใน acetonitrile เพื่อแยกและตรวจวัดสารสำคัญ 17 ชนิด ได้แก่ Δ9-THC, Δ9-THCA, CBD, CBDA, Δ8-THC CBN, CBNA, CBG, CBGA, CBC, CBCA, THCV, THCVA, CBDV, CBDVA, CBL and CBLA ในเวลา 20 นาที

นอกจากนี้ประกาศกระทรวงสาธารณสุข พ.ศ.2564 ฉบับที่ 425 เรื่อง เมล็ดกัญชง น้ำมันจากเมล็ดกัญชง โปรตีนจากเมล็ดกัญชง และผลิตภัณฑ์อาหารที่มีส่วนประกอบของเมล็ดกัญชง น้ำมันจากเมล็ดกัญชง หรือโปรตีนจากเมล็ดกัญชง และฉบับที่ 427 เรื่อง ผลิตภัณฑ์อาหารที่มีส่วนประกอบของส่วนของกัญชาหรือกัญชง ระบุว่าการตรวจวิเคราะห์เพื่อหาปริมาณสาร Total THC (Δ9-THC, Δ8-THC, THC content) และ CBD ให้ใช้หลักเกณฑ์และวิธีการตรวจยืนยันที่ห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่องมือที่ใช้หลักการโครมาโตกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) หรือสูงกว่า

จากข้อมูลข้างต้น สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ในฐานะที่เป็นหน่วยงานตรวจสอบคุณภาพความปลอดภัยของสินค้าปศุสัตว์ จึงเตรียมความพร้อมในการจัดตั้งห้องปฏิบัติการทดสอบคุณภาพสมุนไพร โดยการศึกษานี้จะพัฒนาวิธีและตรวจสอบความใช้ได้ของการทดสอบสาร CBD และ Δ9-THC ซึ่งเป็นสารออกฤทธิ์ที่สำคัญในสมุนไพรกัญชงและกัญชาด้วยเทคนิค LC-MS/MS ตามแนวทางของมาตรฐานสากล Association of Official Analytical Chemists International 2023 (AOAC, 2023) ซึ่งใน appendix K มีการระบุแนวทางสำหรับการทดสอบผลิตภัณฑ์เสริมอาหารและสมุนไพร โดยการศึกษานี้ทดสอบความจำเพาะเจาะจง (selectivity) ผลกระทบจากเมทริกซ์ (matrix effect) ความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐานและช่วงของการวิเคราะห์ (linearity and range) ขีดจำกัดการตรวจพบ (limit of detection, LOD) ขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (limit of quantitation, LOQ) ความแม่นและความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์แบบทวนซ้ำได้ (repeatability) และความเที่ยงแบบทำซ้ำได้ (within laboratory reproducibility) และเข้าร่วมกิจกรรมทดสอบความชำนาญของห้องปฏิบัติการ (proficiency testing) เพื่อนำวิธีที่พัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้แล้วนี้มาใช้เป็นวิธีตรวจวิเคราะห์กัญชงกัญชาที่ใช้ในทางปศุสัตว์ต่อไป

1. **วัตถุประสงค์**

เพื่อแสดงผลการตรวจสอบความใช้ได้ของการทดสอบสาร CBD และ Δ9-THC ในพืชกัญชง โดยเทคนิค LC-MS/MS ในห้องปฏิบัติการกลุ่มตรวจสอบคุณภาพยาสัตว์และวัตถุอันตรายด้านการปศุสัตว์ สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ ว่ามีความถูกต้อง เหมาะสมในการนำไปใช้ เป็นไปตามข้อกำหนดและมาตรฐานสากล

2. **ขอบข่าย**

ใช้สำหรับตรวจสอบความใช้ได้ของการทดสอบสาร CBD และ Δ9-THC ในพืชกัญชง โดยเทคนิค LC-MS/MS ที่ช่วงระดับความเข้มข้นในช่วง 50 – 1000 ng/mL (ppb)

3. **แผนการดำเนินงาน**

วิธีดำเนินการ	ระยะเวลาดำเนินการ (เดือน)											
	ต.ค.68	พ.ย.68	ธ.ค.68	ม.ค.69	ก.พ.69	มี.ค.69	เม.ย.69	พ.ค.69	มิ.ย.69	ก.ค.69	ส.ค.69	ก.ย.69
1. ศึกษา ทบทวนเอกสารวิชาการที่เกี่ยวข้อง	◄	►										
2. วางแผนการทดสอบ	◄	►										
3. จัดเตรียมอุปกรณ์และสารเคมี		◄	►									
4. ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์				◄						►		
5. ทดสอบความชำนาญของห้องปฏิบัติการ									◄		►	
6. วิเคราะห์และสรุปผลการทดสอบ										◄		►

4. **อุปกรณ์และเครื่องมือ**

4.1 เครื่อง Ultra-High Performance Liquid Chromatography (UHPLC-MS/MS) ยี่ห้อ Shimadzu ประกอบด้วย degasser รุ่น DGU-405, binary pump รุ่น SIL-40B X3, autosampler รุ่น SIL-40C X3, column oven รุ่น CTO-40C, mass spectrometry รุ่น 8060RX โดยควบคุมการทำงานและประมวลผลด้วยโปรแกรม LabSolutions

4.2 เครื่อง Shaker ยี่ห้อ Yamato รุ่น SA 31

4.3 เครื่องปั่นเหวี่ยง ยี่ห้อ Thermo รุ่น Sorvall LYNX 4000

4.4 เครื่อง Ultrasonic bath ยี่ห้อ Branson รุ่น B5510E-DTH

4.5 เครื่องผลิตน้ำบริสุทธิ์ ยี่ห้อ Thermo รุ่น Lab Tower EDI 30

4.6 เครื่องระเหยตัวอย่างด้วยก๊าซไนโตรเจน ยี่ห้อ Zymark

4.7 เครื่องชั่งไฟฟ้า ความละเอียด 3 ตำแหน่ง ยี่ห้อ Mettler toledo รุ่น PB 503-S

4.8 เครื่องชั่งไฟฟ้า ความละเอียด 5 ตำแหน่ง ยี่ห้อ Mettler toledo รุ่น XP 205 DR

4.9 เครื่องผสมสาร Vortex mixer

4.10 ตู้ fume hood

4.11 Micropipette ขนาด 20 – 200 และ 100 – 1000 µL

4.12 Phenomenex, C18 1.7 µm, 2.1 mm. ID x100 mm length

4.13 Volumetric flask ขนาด 5, 10, 50 และ 100 mL

4.14 Centrifuge tube ชนิดแก้ว ขนาด 30 mL

4.15 Centrifuge tube ชนิดพลาสติก ขนาด 50 mL

4.16 PTFE syringe filter ขนาด 13 mm, 0.2 µm

4.17 Syringe ไม่มีหัวเข็ม ขนาด 1-3 mL

4.18 Solution bottle ขนาด 100, 250 และ 500 mL พร้อมฝา

4.19 Beaker แก้ว ขนาด 10, 50 และ 100 mL

4.20 Vial ใส with screw cap ขนาด 2 mL

4.21 Pasture pipette

4.22 ลูกยางซิลิโคน

4.23 ช้อนตักสารเคมีและช้อนตักสารมาตรฐาน

5. **สารเคมี**

5.1 Formic acid, LC grade

5.2 Acetonitrile, LC grade

5.3 Methanol, LC grade

5.4 Methanol, AR grade

5.5 DI water

6. **สารมาตรฐาน**

6.1 cannabidiol (CBD) ($C_{21}H_{30}O_2$) ยี่ห้อ Dr.Ehrenstorfer, Lot No. 2-H497018ME, CAS. 13956-29-1

6.2 Δ9-trans-tetrahydrocannabinol (Δ9-THC) ($C_{21}H_{30}O_2$) ยี่ห้อ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ (DMScRS), Lot No. 02A66244, CAS. 1972-08-3

6.3 cannabidiolic acid (CBDA) ($C_{22}H_{30}O_4$) ยี่ห้อ Chiron, Lot No. 27530, CAS. 1244-58-2

6.4 cannabigerol (CBG) ($C_{21}H_{32}O_3$) ยี่ห้อ Chiron, Lot No. 27532, CAS. 25654-31-3

6.5 cannabinol (CBN) ($C_{21}H_{26}O_2$) ยี่ห้อ Chiron Lot, No.26861, CAS 521-35-7

6.6 cannabicyclol (CBL) ($C_{21}H_{30}O_2$) ยี่ห้อ Dr.Ehrenstorfer, Lot No. 2-H515547AL, CAS 21366-63-2

6.7 cannabichromene (CBC) ($C_{21}H_{30}O_2$) ยี่ห้อ Dr.Ehrenstorfer, Lot No. 2-H526642ME, CAS 20675-51-8

6.8 cannabicyclolic acid (CBLA) ($C_{22}H_{30}O_4$) ยี่ห้อ Dr.Ehrenstorfer, Lot No. 2-H498909AL, CAS 40524-99-0

6.9 cannabichromenic acid (CBCA) ($C_{22}H_{30}O_4$) ยี่ห้อ Dr.Ehrenstorfer, Lot No. 2-H514488AL, CAS185505-15-1

7. ขั้นตอนการปฏิบัติงาน

7.1 ขั้นตอนการเตรียมสารละลายมาตรฐาน

7.1.1 เตรียม intermediate standards solution จากสารมาตรฐานที่เป็นของเหลว

ปิเปตสารละลายมาตรฐาน Δ9-THC, CBD, CBC ,CBCA และ CBL ที่เป็นของเหลว ความเข้มข้น 1000 µg/mL แยกชนิด ปริมาตรชนิดละ 250 µl ลงใน volumetric flask ขนาด 5 mL และปิเปตสารมาตรฐาน CBLA ที่เป็นของเหลว ความเข้มข้น 500 µg/mL ปริมาตร 500 µl ลงใน volumetric flask ขนาด 5 mL จากนั้นปรับปริมาตรด้วย 80% methanol เพื่อให้ได้ intermediate standards solution ความเข้มข้น 50 µg/mL เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสหรือต่ำกว่า

7.1.2 เตรียม intermediate standards solution จากสารมาตรฐานที่เป็นผง

ชั่งน้ำหนักสารมาตรฐาน CBG, CBN, CBDA ที่เป็นผง รวมน้ำหนักขวด แล้วละลายสารทั้งขวดด้วย 80% methanol ดูดสารละลายทั้งหมดใส่ volumetric flask ขนาด 10 mL ปรับปริมาตรด้วย 80% methanol รอจนขวดแห้ง ชั่งน้ำหนักขวดเปล่า คำนวณความเข้มข้นของสารสารมาตรฐานที่เตรียมได้ จากนั้นเตรียม intermediate standards solution ของสารมาตรฐานแต่ละชนิด ให้มีความเข้มข้น 20 μg/mL เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสหรือต่ำกว่า แต่เนื่องจากสารแต่ละชนิดมี %purity ที่แตกต่างกัน ต้องคำนวณปริมาณสารมาตรฐานผงที่ต้องใช้ในกรณีที่ %purity น้อยกว่า 99% ดังนี้

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

จากนั้นเจือจางด้วย 80% methanol เพื่อให้ได้ intermediate standards solution ความเข้มข้น 50 μg/mL เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสหรือต่ำกว่า

7.1.3 เตรียมสารมาตรฐานผสม

ปิเปตสารมาตรฐาน CBD และ Δ9-THC ความเข้มข้น 50 μg/mL ปริมาตรขนิดละ 2 mL ลงใน volumetric flask เดียวกัน ขนาด 5 mL จากนั้นปรับปริมาตรด้วย 80% methanol เพื่อให้ได้สารมาตรฐานผสมความเข้มข้น 20 μg/mL จากนั้นเจือจางด้วย 80% methanol ให้ได้ความเข้มข้น 7 ระดับ ได้แก่ 10, 25, 50, 100, 250, 500 และ 1000 ng/mL กรองด้วย nylon syringe PTFE, 13 mm, 0.2 μm ลงใน vial ขนาด 2 mL

7.2 ขั้นตอนการเตรียมสารเคมี

7.2.1 Mobile phase A คือ 0.1% formic acid in DI water

เตรียมโดยเติม formic acid 1 mL ใส่ลงไป ปรับปริมาตรเป็น 1000 mL ด้วย DI water กรองผ่าน nylon syringe filter, 13 mm, 0.2 μm และนำไป sonicate เพื่อไล่ฟองอากาศ

7.2.2 Mobile phase B คือ 0.1% formic acid in acetonitrile

เตรียมโดยเติม formic acid 1 mL ใส่ลงไป ปรับปริมาตรเป็น 1000 mL ด้วย acetonitrile กรองผ่าน nylon syringe filter, 13 mm , 0.2 μm และนำไป sonicate เพื่อไล่ฟองอากาศ

7.2.3 80% methanol

เตรียมโดยตวง methanol 800 mL ด้วย cylinder และตวงน้ำบริสุทธิ์ 200 mL ด้วย cylinder ลงรวมกันใน solution bottle และเขย่าให้เข้ากัน

7.3 ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง

7.3.1 ขั้นตอนการสกัดตัวอย่าง

ชั่งตัวอย่างรากพืชกัญชง 0.5 g ± 2% ลงใน centrifuge tube พลาสติกขนาด 50 mL เติม methanol 10 mL นำไปเขย่าเครื่องเขย่าแนวตั้ง 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 methanol ปริมาตร 1 mL และกรองผ่าน PTFE syringe filter, 13 mm, 0.2 µm ลงใน vial ขนาด 2 mL (ดัดแปลงจาก Thai Herbal Pharmacopoeia 2021; Kanabus *J. et al*, 2023) เพื่อนำไปทดสอบด้วยเทคนิค LC-MS/MS ซึ่งแสดงเป็นขั้นตอนได้ดังนี้

ชั่งตัวอย่างรากพืชกัญชง 0.5 g ± 2% ลงใน centrifuge tube พลาสติกขนาด 50 mL

⬇

เติม methanol ปริมาตร 10 mL

⬇

เขย่าด้วยเครื่องเขย่าแนวตั้ง เป็นเวลา 30 นาที speed 9

⬇

centrifuge ความเร็วรอบ 5,000 rpm อุณหภูมิ 20 °C เป็นเวลา 10 นาที

⬇

เทส่วนใสทั้งหมดลงในหลอดแก้ว ขนาด 30 mL

นำไประเหยด้วยเครื่องระเหยตัวอย่างด้วยก๊าซไนโตรเจน อุณหภูมิ 25 °C จนแห้ง

ทำซ้ำอีก 2 รอบ

⬇

ละลายด้วย methanol ปริมาตร 1 mL

⬇

กรองด้วย PTFE syringe filter, 0.2 µm

⬇

ฉีดเข้าเครื่อง LC-MS/MS

โดยสามารถคำนวณย้อนกลับไปยังน้ำหนักแห้งของพืช (% w/w) ได้ดังนี้

$$\text{Cannabinoid Content (\% w/w)} = \frac{C \times V \times DF}{W \times 10^{7}}$$

เมื่อ c = ความเข้มข้นของสาร CBD หรือ Δ9-THC ที่อ่านได้จากกราฟมาตรฐาน (ng/mL)

v = ปริมาตรสุทธิของสารละลายที่ใช้ละลายกลับหลังการสกัด (mL)

DF = ปัจจัยการเจือจาง (Dilution Factor) ในกรณีที่มีการเจือจางสารสกัดก่อนฉีดเข้าเครื่อง (หากไม่มีการเจือจาง DF = 1)

w = น้ำหนักแห้งของตัวอย่างพืชกัญชงที่ใช้สกัด (g)

7.3.2 ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง blank sample

ชั่งตัวอย่างรากและลำต้นพืชกัญชงที่ตรวจไม่พบ CBD และ Δ9-THC หรือมีสาร CBD และ Δ9-THC ปะปนในระดับต่ำมาก (มีสัญญาณรบกวนต่ำกว่า 10% ของสัญญาณที่ระดับ LOQ) ปริมาณ 0.5 g ลงใน centrifuge tube พลาสติก ขนาด 50 mL แล้วนำไปสกัดเช่นเดียวกับข้อ 7.3.1

7.4. การพัฒนาวิธีทดสอบ

ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการวิเคราะห์สารด้วยเครื่อง LC-MS/MS โดยฉีดสารมาตรฐาน Δ9-THC, CBD, CBDA, CBG, CBN, CBC, CBCA, CBL และ CBLA ที่ความเข้มข้น 10 ng/mL เข้าส่วน mass spectrometer แหล่งกำเนิดไอออน (ion source) แบบ electrospray ionization (ESI) ตรวจวัดแบบไอออนบวก (positive ionization) และตั้งค่าดังแสดงในตารางที่ 1 เพื่อหาค่า collision energy (CE), Q1 pre bias, Q3 pre bias และค่ามวลต่อประจุ (m/z) ของ precursor ion และ product ion ที่ให้สัญญาณสูงสุดในการวิเคราะห์แบบ multiple reaction monitoring (MRM)

ตารางที่ 1 MS/MS พารามิเตอร์สำหรับการวิเคราะห์สารกลุ่มแคนนาบินอยด์

parameter	condition
Ionization mode	ESI, positive
Ion spray voltage	5500 eV
Temp TEM	500 °C
Collision activated dissociation (CAD)	Nitrogen, 7 psi
curtain gas	25 psi
GS1	60 psi
GS2	60 psi

จากนั้นฉีดสารมาตรฐาน Δ9-THC, CBD, CBDA, CBG, CBN, CBC, CBCA, CBL และ CBLA ที่ความเข้มข้น 10 ng/mL เพื่อทดสอบความสามารถในการแยกสาร โดยใช้ LC condition ตามตารางที่ 2

ตารางที่ 2 LC conditions สำหรับการวิเคราะห์สารกลุ่มแคนนาบินอยด์ (ดัดแปลงจาก Garnet *et al.*, 2021)

parameter	condition		
equipment	Shimadzu LC-MS/MS รุ่น LCMS 8060		
stationary phase	C18 1.7 µm, 2.1x100 mm		
injection volume	2 µl		
flow rate	0.5 mL/min		
column temperature	40 °C		
run time	15 min		
mobile phase	A: 0.1% formic acid in DI water, B: 0.1% formic acid in Acetonitrile		
gradient profile	time (min)	mobile phase A (%)	mobile phase B (%)
	0	40	60
	8.0	32	68
	13.5	32	68
	13.6	5	95
	14.5	5	95
	14.6	40	60
	15.0	40	60

7.5 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ CBD และΔ9-THC

7.5.1 ความจำเพาะหรือความสามารถในการแยกสาร (selectivity)

ทดสอบ reagent blank, sample blank และ spiked matrix sample ที่เติมสารละลายมาตรฐาน Δ9-THC ที่ความเข้มข้น 10 ng/mL เพื่อตรวจการรบกวน โดยพิจารณาสัญญาณที่ปรากฏใน reagent blank และ sample blank เทียบกับ spiked matrix sample เกณฑ์การยอมรับคือ ต้องไม่พบสัญญาณที่มีค่าตรงกับพีคของสาร CBD และ Δ9-THC หรือถ้าพบสัญญาณจะต้องพบน้อยกว่าใน spiked matrix sample ที่ระดับ 10 ng/mL

7.5.2 ผลกระทบจากเมทริกซ์ (matrix effect)

ทดสอบสารละลายมาตรฐาน CDB และ Δ9-THC ในตัวทำละลาย (Solvent Standard) สารละลายมาตรฐาน CDB และ Δ9-THC ในเมทริกซ์ (Matrix-Matched Standard) ที่ความเข้มข้น 50-1000 ng/mL ตามตารางที่ 3 และ 4 ประเมินผลกระทบของ matrix ต่อสัญญาณของสารจาก %matrix effect (ME) ซึ่งคำนวณจากสัดส่วนความชันจากกราฟมาตรฐาน ดังนี้

$$\% \text{ Matrix Effect} = \left(\frac{\textbf{Slope Matrix Standard}}{\textbf{Slope Solvent Standard}} - 1\right) \textbf{x } 100$$

ซึ่งกำหนดเกณฑ์การยอมรับไม่เกิน ±10% (AOAC appendix K, 2023) เพื่อเลือกกราฟมาตรฐานที่มีความแม่นยำและเหมาะสมที่สุดในการทดสอบ

ตารางที่ 3 การเตรียม Solvent Standard curve

level	stock std. mix CBD and Δ9-THC 20 µg/mL (µL)	final volume (mL)	final conc. CBD/Δ9-THC (ng/mL)
1	12.5	5	50
2	25	5	100
3	62.5	5	250
4	125	5	500
5	250	5	1000

ตารางที่ 4 การเตรียม Matrix-Matched standard curve

level	sample blank (g)	stock std. mix CBD/Δ9-THC 20 µg/mL (µL)	sample blank (mL)	fnal conc. CBD/Δ9-THC (ng/mL)
1	0.5	12.5	5	50
2	0.5	25	5	100
3	0.5	62.5	5	250
4	0.5	125	5	500
5	0.5	250	5	1000

7.5.3 ทดสอบความเป็นเส้นตรงและช่วงการทดสอบ (linearity and range)

ทดสอบสารละลายมาตรฐาน CDB และ Δ9-THC ที่ 7 ระดับความเข้มข้น สร้างกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานและพื้นที่ใต้กราฟของแต่ละสาร ประเมินความเป็นเส้นตรงจากค่า r หรือ r^2 โดยกำหนดเกณฑ์การยอมรับค่า $r > 0.995$ หรือ ค่า r^2 อยู่ในช่วง 0.990 (AOAC appendix K, 2023)

7.5.4 ทดสอบความแม่น (accuracy) และความเที่ยง (precision)

ทดสอบโดยเติมสารมาตรฐานที่ความเข้มข้น 5 ระดับ คือ 50, 100, 250, 500 และ 1000 ng/mL ลงใน sample blank ความเข้มข้นละ 6 ซ้ำ ดังแสดงในตารางที่ 5 ทดสอบต่างวัน ซึ่งแสดงขั้นตอนการทดสอบได้ดังนี้

ชั่งตัวอย่างพืชกัญชงปริมาณ 0.5 g

⬇

Spike สารมาตรฐานความเข้มข้น 20 µg/mL ที่ปริมาตรต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 เตรียม standard addition ที่ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ

Level	sample blank(g)	spike std. CBD/Δ9-THC 20 µg/mL (µL)	Final volume (µL)	Final conc. CBD/Δ9-THC (ng/mL)
1	0.5	12.5	5	50
2	0.5	25	5	100
3	0.5	62.5	5	250
4	0.5	125	5	500
5	0.5	250	5	1000

⬇

เติม methanol ปริมาตร 10 mL

⬇

เขย่าด้วยเครื่องเขย่าแนวตั้งนาน 30 นาที speed 9

⬇

Centrifuge ความเร็วรอบ 5,000 rpm อุณหภูมิ 20 °C นาน 10 นาที

⬇

เทส่วนใสทั้งหมดลงใน Tube แก้ว ขนาด 30 mL

ทำซ้ำอีก 2 รอบ

นำไประเหยด้วยเครื่องระเหยตัวอย่างด้วยก๊าซไนโตรเจน อุณหภูมิ 25 °C จนแห้ง

⬇

ละลายกลับด้วย 80% methanol และปรับปริมาตรใน VF 5 มิลลิลิตร

⬇

กรองด้วย Nylon syringe membrane filter, 0.2 um

⬇

ฉีดเข้าเครื่อง LC-MS/MS โดยทำการสกัดและทดสอบวันเดียวกัน และทดสอบต่างวันหรือต่างผู้วิเคราะห์

⬇

ประเมินความแม่นโดยพิจารณาจากค่า %MR และความเที่ยงพิจารณาจาก $\%RSD_r$ ของแต่ละระดับความเข้มข้น โดยกำหนดเกณฑ์ยอมรับดังตารางที่ 6 (AOAC, 2023)

⬇

เตรียมตัวอย่างเช่นเดิมอีกจำนวน 1 ชุด แต่ทำการสกัดและทดสอบต่างวัน ประเมินความเที่ยงและแม่นของตัวอย่างทั้ง 2 ชุด โดยพิจารณาจากค่า %MR และ $\%RSD_R$ ของแต่ละระดับความเข้มข้น กำหนดเกณฑ์การยอมรับดังตารางที่

7.5.5 ทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจพบได้ (limit of detection; LOD) และความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถหาปริมาณได้ (limit of quantitation; LOQ)

ทดสอบหาค่า LOD และ LOQ โดยประมาณด้วยการทดสอบ spike sample ของสาร CDB และ Δ9-THC ที่ความเข้มข้น 50 ng/mL จำนวน 10 ซ้ำ แล้วคำนวณหาค่า standard deviation (S_0) และคำนวณค่า LOD และค่า LOQ จากสมการ (AOAC appendix K, 2023) ดังนี้

$LOD = 3S'_0$ และ $LOQ = 10S'_0$

เมื่อ $S'_0 = \frac{S_0}{\sqrt{n}}$ และ $S_0 = SD$

n = จำนวนซ้ำของตัวอย่าง

เมื่อได้ค่า LOD และ LOQ โดยประมาณแล้ว ทดสอบ spiked sample ที่ความเข้มข้นใกล้เคียงกับค่าที่คำนวณได้ ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ เพื่อเป็นการยืนยันค่า LOD และ LOQ โดยแต่ละความเข้มข้นทดสอบภายในวันเดียวกัน โดยการยืนยันค่า LOD และ LOQ โดยกำหนดเกณฑ์การยอมรับ ค่า signal to noise ratio (S/N) ≥ 3 สำหรับค่า LOD และ ค่า signal to noise ratio (S/N) ≥ 10 สำหรับค่า LOQ หากไม่ได้ ให้ยืนยันระดับความเข้มข้นที่สูงขึ้น

7.6 ทดสอบความชำนาญของห้องปฏิบัติการ (proficiency testing)

ทำการวิเคราะห์ตัวอย่างในกิจกรรมทดสอบความชำนาญของห้องปฏิบัติการ รายการการตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญในพืชกัญชากัญชง กับศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 1 เชียงใหม่ ประเมินผลจากค่าสถิติ z-score โดยเกณฑ์การตัดสิน คือ $|z| \leq 2$ แสดงว่าผลการทดสอบนั้นน่าพอใจ (satisfactory)

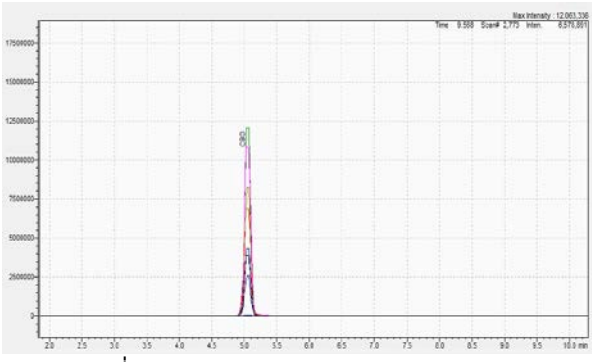
8. สรุปผลการทดสอบ

8.1 ผลการพัฒนาวิธีทดสอบ

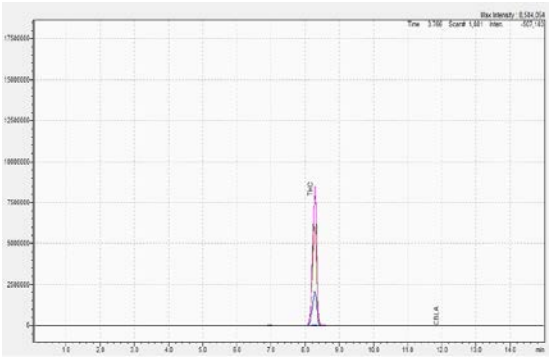
เมื่อฉีดสารมาตรฐาน Δ9-THC, CBD, CBDA, CBG, CBN, CBC, CBCA, CBL และ CBLA ที่ความเข้มข้น 10 ng/mL เข้าส่วน mass spectrometer เพื่อหา precursor ion ที่เหมาะสม โดยทำ precursor ion scan ในช่วง 300-450 m/z และหา product ion โดยใช้ค่า m/z ของ precursor ion ที่ให้ intensity สูงสุด ภายใต้สภาวะแบบ ESI ใน positive mode ตามตารางที่ 1 แล้วหาสภาวะของ MRM transitions สำหรับการทดสอบ พบว่ามีค่าพลังงาน collision energy (CE), dwell time, Q1 และ Q3 ดังแสดงในตารางที่ 6 และเมื่อฉีดสารมาตรฐาน CBD และ Δ9-THC ที่ความเข้มข้น 10 ng/mL โดยใช้ LC condition ตามตารางที่ 2 พบว่าแต่ละสารมีค่า retention time ที่แตกต่างกัน ตามแสดงในรูปที่ 1-3 จึงใช้สภาวะที่พัฒนาวิธีได้นี้ในการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบต่อไป

ตารางที่ 6 MRM transitions ของ Δ9-THC, CBD, CBDA, CBG, CBN, CBC, CBCA, CBL และ CBLA

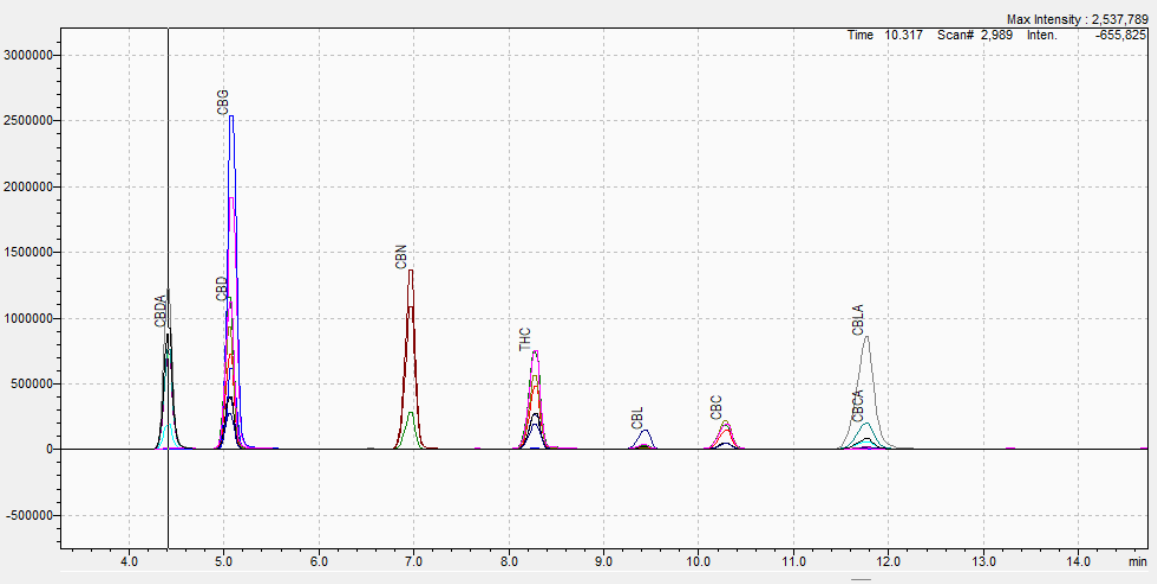
compound	+/-	precursor m/z	product m/z	Dwell Time (ms)	Q1 pre bias (V)	CE	Q3 pre bias (V)	RT (min)
CBDA	+	341.20	219.05	100	-24	-27.6	-21	4.46
		341.20	261.05	100	-24	-20.5	-26	
CBD	+	315.20	193.10	100	-22	-22.4	-18	5.03
		315.20	123.00	100	-22	-31.1	-21	
CBG	+	317.15	193.10	100	-22	-18.2	-20	5.10
		317.15	123.00	100	-22	-31.5	-11	
CBN	+	311.15	223.15	100	-22	-21.6	-23	6.90
		311.15	241.05	100	-22	-19.9	-23	
THC	+	315.20	123.00	100	-22	-34.9	-21	8.23
		315.20	193.05	100	-22	-23.8	-18	
CBL	+	315.15	235.15	100	-22	-17.4	-22	9.39
		315.15	81.10	100	-22	-31.7	-15	
CBC	+	315.20	193.10	100	-22	-19.6	-18	10.26
		315.20	259.10	100	-22	-15.1	-17	
CBLA	+	359.20	261.15	100	-25	-27.1	-17	11.79
		359.20	219.05	100	-26	-33.3	-21	
CBCA	+	359.15	219.15	100	-26	-29.3	-21	12.14
		359.20	233.10	100	-24	-24.8	-13	



รูปที่ 1 chromatogram ของสารมาตรฐาน CBD



รูปที่ 2 chromatogram ของสารมาตรฐาน Δ9-THC



รูปที่ 3 chromatogram ของสารมาตรฐานผสม 9 สาร (CBDA, CBD, CBG, CBN, Δ9-THC, CBL, CBC, CBLA, และ CBCA)

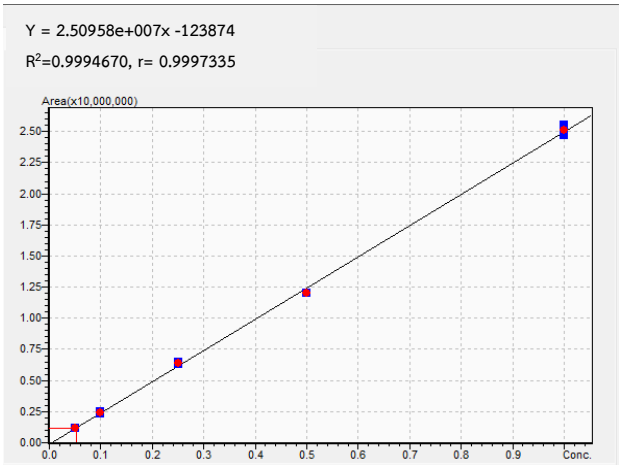
8.2 ผลการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ

8.2.1 ผลการทดสอบความจำเพาะเจาะจงต่อสารที่ทดสอบ (selectivity)

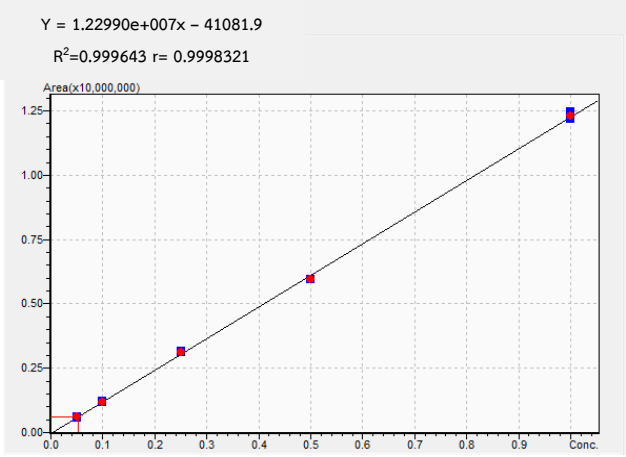
จากการทดสอบและเปรียบเทียบสัญญาณของ reagent blank, sample blank และ spiked matrix sample ที่เติมสารละลายมาตรฐานที่ผสม 9 ชนิด คือ Δ9-THC, CBD, CBDA, CBG, CBN, CBC, CBCA, CBL และ CBLA ที่ความเข้มข้น 10 ng/mL โดยใช้สภาวะที่พัฒนาได้ พบว่าไม่พบสัญญาณรบกวนจากสารอื่นที่อยู่ใน reagent และ matrix ที่ให้สัญญาณหรือมีพีคตรงกับสาร CBD และ Δ9-THC เมื่อเทียบกับ RT ของสารมาตรฐานในช่วง ± 0.1 นาที เป็นไปตามเกณฑ์ของ AOAC appendix K (2023) แสดงว่าวิธีการทดสอบนี้มีความจำเพาะต่อสาร CBD และ Δ9-THC

8.2.2 ผลการทดสอบผลกระทบจากเมทริกซ์ (matrix effect)

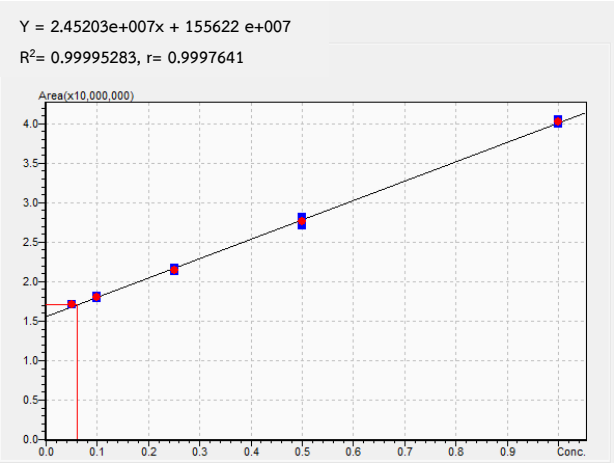
จากผลการทดสอบความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐานแบบ solvent standard curve เทียบกับ matrix-matched standard curve พบว่า กราฟของสารมาตรฐานผสม CBD และ Δ9-THC มีความเป็นเส้นตรงตั้งแต่ความเข้มข้น 50-1000 ng/mL โดยค่า $r^2 \geq 0.995$ และมีค่าความชันตามตารางที่ 7 ซึ่งเมื่อนำค่าความชันของกราฟมาตรฐานแบบ matrix-matched standard curve มาคำนวณเทียบกับกราฟมาตรฐานแบบ solvent standard curve เพื่อตรวจสอบผลกระทบจากเมทริกซ์ (%matrix effect, %ME) พบว่ามีร้อยละของผลกระทบจากเมทริกซ์ของ CBD และ Δ9-THC -2.29% และ -1.60% ตามลำดับ ซึ่งต่ำกว่า ±10% ตามเกณฑ์ยอมรับ (AOAC 2023) ถือว่าสารรบกวนในเมทริกซ์ไม่มีผลกระทบต่อการตรวจวัดสัญญาณอย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้น จึงสามารถใช้กราฟมาตรฐานแบบ solvent standard curve ในการคำนวณปริมาณสาร Δ9-THC และ CBD ได้ โดยไม่จำเป็นต้องเตรียมแบบ matrix-matched standard curve



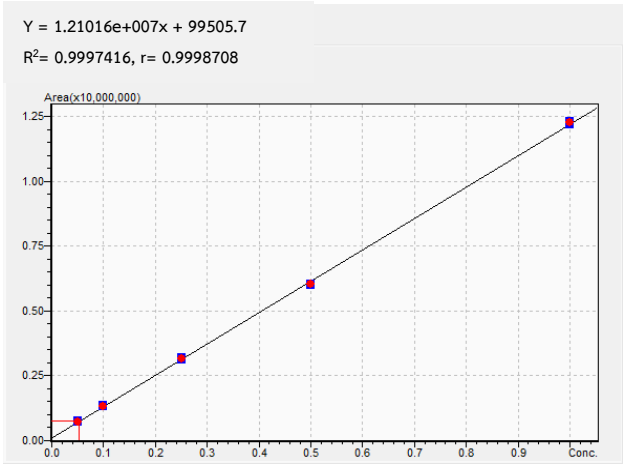
รูปที่ 4 solution standard of CBD



รูปที่ 5 solution standard of Δ9-THC



รูปที่ 6 matrix-matched standard of CBD



รูปที่ 7 matrix-matched standard of Δ9-THC

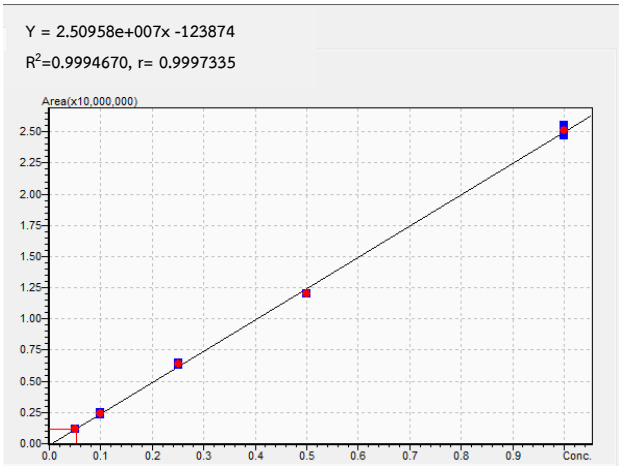
ตารางที่ 7 ผลการทดสอบ matrix effect ของ CBD และ Δ9-THC

	calibration curve	slope	r^2	calibration range (ng/mL)	%ME
CBD	matrix-matched standard	24,520,300	0.9999	50-1000	-2.29%
	standard solution	25,095,800	0.9995	50-1000	
Δ9-THC	matrix-matched standard	12,101,600	0.9997	50-1000	-1.60%
	standard solution	12,299,000	0.9996	50-1000	

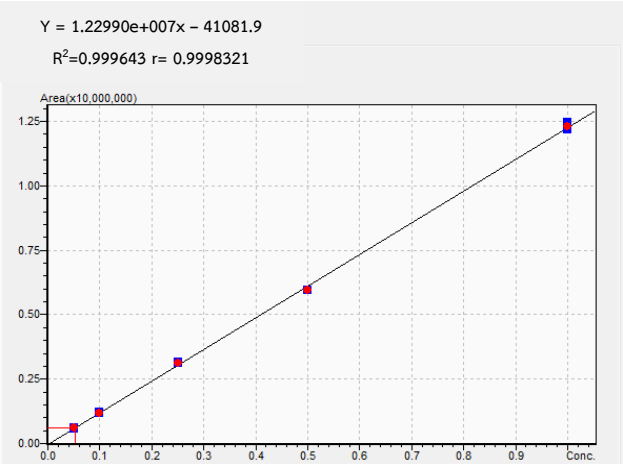
8.2.3 ผลการทดสอบความเป็นเส้นตรงและช่วงของการวิเคราะห์ (linearity and range)

จากการทดสอบสาร CBD และ Δ9-THC ที่ความเข้มข้น 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000 ng/mL ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ และสร้างกราฟมาตรฐานของสารแต่ละชนิด โดยให้แกน X เป็นความเข้มข้นของสารที่เติมลงในตัวอย่าง และแกน Y เป็นความเข้มข้นของสารที่ตรวจพบ เมื่อคำนวณสมการเส้นตรงและตรวจสอบค่า r^2 พบว่า กราฟมาตรฐานของ CBD และของ Δ9-THC มี r^2 เท่ากับ 0.999 ดังแสดงในรูปที่ 6 และ 7 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ยอมรับของค่า $r^2 \geq 0.995$ แสดงว่าวิธีทดสอบนี้

มีช่วงการวิเคราะห์ที่ความเข้มข้น 50-1000 ng/mL ดังแสดงในตารางที่ 8 แต่หากคำนวณย้อนกลับตามน้ำหนักตัวอย่างจะเทียบเท่ากับช่วงการวิเคราะห์ในตัวอย่างพืชจริงที่ 0.0001 – 0.002 %w/w ดังนั้น หากตัวอย่างมีปริมาณ CBD หรือ Δ9-THC สูงกว่าช่วง working range นี้ จะต้องนำสารสกัดมาเจือจาง (dilution) ก่อนนำไปฉีดวิเคราะห์



รูปที่ 6 calibration curve of CBD



รูปที่ 7 calibration curve of Δ9-THC

ตารางที่ 8 ค่า Coefficient of determination (r^2), correlation coefficient (r) และ working range ของ CBD และ Δ9-THC

compound	r^2	r	working range (ng/mL)
CBD	0.9994	0.9995	50-1000
Δ9-THC	0.9996	0.9996	50-1000

8.2.4 ผลการทดสอบความแม่น (accuracy) และความเที่ยง (precision)

จากการทดสอบโดยเติมสารมาตรฐานที่ความเข้มข้น 5 ระดับ ลงใน sample blank ความเข้มข้นละ 6 ซ้ำ ทดสอบต่างวัน เป็นระยะเวลา 2 วัน ประเมินความแม่นของวิธีทดสอบจากค่า %MR และความเที่ยงแบบทวนซ้ำได้ (repeatability) จากค่า $\%RSD_r$ และประเมินความเที่ยงแบบทำซ้ำได้ (within-laboratory reproducibility) จาก $\%RSD_R$ พบว่าผลการประเมินความแม่นและความเที่ยงแบบทวนซ้ำได้มีค่า %MR และ $\%RSD_r$ อยู่ในช่วงเกณฑ์ยอมรับตาม AOAC (2023) เช่นเดียวกับผลการประเมินความแม่นและความเที่ยงแบบการทำซ้ำได้ก็ให้ค่า %MR และ $\%RSD_R$ ของ CBD และ Δ9-THC เป็นไปตามเกณฑ์กำหนด ตามตารางที่ 9 และ 10

ตารางที่ 9 เกณฑ์การยอมรับของค่า %recovery และ %RSD (AOAC appendix K, 2023)

ระดับความเข้มข้น	%MR	repeatability ($\%RSD_r$)	reproducibility ($\%RSD_R$)
50 ng/mL	60 – 115	32	21
100 ng/mL	80 – 110	22	15
250 ng/mL	80 – 110	22	15
500 ng/mL	80 – 110	22	15
1000 ng/mL	80 – 110	16	11

ตารางที่ 10 ค่า %MR และ %RSD ของการวิเคราะห์

compound	spike level (ng/ml)	repeatability (n=6)				within-lab reproducibility (n=12)	
		$\%RSD_r$		%MR			
		day 1	day 2	day 1	day 2	$\%RSD_R$	%MR
CBD	50	3.92	1.47	95.21	94.59	2.83	94.90
	100	2.33	1.58	91.52	95.79	3.27	93.65
	250	1.58	0.33	93.21	99.50	4.00	96.35
	500	1.62	0.31	96.35	93.95	6.92	95.15
	1000	0.80	0.13	91.48	99.61	0.58	95.54
Δ9-THC	50	1.28	0.69	93.08	91.44	1.15	92.26
	100	1.74	0.33	91.35	99.37	1.61	95.36
	250	0.73	0.89	94.80	97.12	4.76	95.96
	500	0.87	0.38	92.09	98.10	1.88	95.09
	1000	0.94	0.46	98.80	97.93	5.08	98.37

8.2.5 ผลการทดสอบค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจพบได้ (limit of detection; LOD) และความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถหาปริมาณได้ (limit of quantitation; LOQ)

จากการทดสอบ spike sample ที่ความเข้มข้น 50 ng/mL จำนวน 10 ซ้ำ คำนวณค่า LOD สำหรับ CBD และ Δ9-THC จาก $3S_0'$ ได้เท่ากับ 5.87 และ 1.66 ng/mL ตามลำดับ และคำนวณค่า LOQ สำหรับ CBD และ Δ9-THC จาก $10S_0'$ ได้เท่ากับ 19.57 และ 5.53 ng/mL ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 11

ตารางที่ 11 ผลการทดสอบหาค่า LOD และ LOQ

compound	spiked sample 50 ng/mL (n=10)		
	S'_0	LOD ($3S'_0$)	LOQ ($10S'_0$)
CBD	1.96	5.87	19.57
Δ9-THC	0.55	1.66	5.53

และเมื่อทำการทดสอบยืนยันค่า LOD ที่ความเข้มข้นของ CBD และ Δ9-THC เท่ากับ 25 ng/mL พบว่ามีค่า S/N ≥ 3 และทำการทดสอบยืนยันค่า LOQ ที่ความเข้มข้นของ CBD และ Δ9-THC เท่ากับ 50 ng/mL พบว่าสาร CBD และ Δ9-THC มีค่า S/N ≥ 10 มีค่า %MR เท่ากับ 95.25% และ 94.77% และมีค่า %RSD เท่ากับ 4.11 และ 1.17% ตามลำดับ ซึ่งค่า %RSD ต่ำกว่า 15% ตามเกณฑ์การยอมรับ (AOAC, 2023) ดังแสดงในตารางที่ 12 แสดงว่าวิธีทดสอบที่ได้พัฒนาขึ้นนี้มีค่า LOD เท่ากับ 25 ng/mL และมีค่า LOQ เท่ากับ 50 ng/mL

ตารางที่ 12 ผลการยืนยันค่า LOD และ LOQ

compound	LOD (25 ng/mL, n=10)	LOQ (50 ng/mL, n=10)	
	mean S/N	%MR	%RSD
CBD	413.97	95.25	4.11
Δ9-THC	13.05	94.77	1.17

8.3 ผลการทดสอบความชำนาญของห้องปฏิบัติการ (proficiency testing)

จากการทดสอบความชำนาญของห้องปฏิบัติการ รายการการตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญในพืชกัญชา กัญชง กับศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 1 เชียงใหม่ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ซึ่งมีห้องปฏิบัติการเข้าร่วมจำนวน 29 ห้องปฏิบัติการ โดยได้รับตัวอย่างพืชกัญชาหรือกัญชงแห้งบดละเอียด จำนวน 2 ตัวอย่าง คือ ตัวอย่างรหัส H01 และ H02 ทดสอบด้วยวิธีที่พัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้นี้ และรายงานผลทดสอบในรูปของ Total THC และ Total CBD พบว่า ผลการทดสอบทั้ง 2 ตัวอย่าง มีค่า $|z| \leq 2.0$ ซึ่งเป็นผลการทดสอบที่น่าพอใจ (satisfactory) ดังแสดงในตารางที่ 13

ตารางที่ 13 ผลการเข้าร่วมกิจกรรมทดสอบความชำนาญของห้องปฏิบัติการ

sample	test	assigned value (median ± NIQR*) (%w/w)	measured value (%w/w)	z-score
H01	Total THC	0.22 ± 0.04	0.18	-1.00
	Total CBD	0.40 ± 0.09	0.49	1.00
H02	Total THC	1.22 ± 0.14	1.05	-1.21
	Total CBD	1.06 ± 0.11	1.14	0.73

*nIQR (Normalized interquartile range) คือ robust statistic ที่ใช้วัดการกระจายตัวของข้อมูล ซึ่งเท่ากับค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดสอบความชำนาญ หรือ σ_{pt}

สรุปผลการทดสอบ

การพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ CBD และ Δ9-THC ในพืชกัญชงและกัญชา โดยเทคนิค liquid chromatography mass spectrometry ทำให้ได้วิธีทดสอบที่มีความจำเพาะ มีช่วงความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐานและช่วงของการทดสอบที่ 50-1000 ng/ml มีความเที่ยงและความแม่นอยู่ในเกณฑ์ยอมรับของ AOAC (2023) โดยมีค่า LOD เท่ากับ 25 ng/ml และมีค่า LOQ เท่ากับ 50 ng/ml มีความแม่นจากค่าร้อยละการกลับคืนเฉลี่ยอยู่ในช่วง 93.65 – 96.35 สำหรับสาร CBD และร้อยละ 92.26-98.37 สำหรับสาร Δ9-THC มีความเที่ยงของการทวนซ้ำโดยพิจารณาจากค่า $\%RSD_r$ เฉลี่ยอยู่ในช่วง 0.13 – 3.92% สำหรับสาร CBD และ 0.33 – 1.74% สำหรับสาร Δ9-THC ตามลำดับ และการทำซ้ำมีค่า $\%RSD_R$ เฉลี่ยอยู่ในช่วง 0.58 – 6.92% สำหรับสาร CBD และ 1.15 – 5.08% สำหรับสาร Δ9-THC รวมทั้งมีผลการทดสอบความชำนาญของห้องปฏิบัติการเป็นที่น่าพอใจ แสดงให้เห็นว่าวิธีทดสอบนี้มีความเหมาะสมสำหรับนำมาใช้เป็นวิธีทดสอบในห้องปฏิบัติการ เพื่อควบคุมการ

นำกัญชงกัญชา รวมถึงสารสกัดของกัญชงกัญชามาใช้ในทางปศุสัตว์ ให้เป็นไปตามกฎหมายและมาตรฐานกำหนด และสามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลประกอบการขอรับรองความสามารถของห้องปฏิบัติการตามระบบคุณภาพ ISO/IEC 17025 ต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณผู้อำนวยการสำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ ที่พิจารณาให้ดำเนินการในปีงบประมาณ 2569 ขอขอบคุณนายสัตวแพทย์ชูศักดิ์ อาจสูงเนิน ผู้เชี่ยวชาญด้านการตรวจสอบคุณภาพนมและผลิตภัณฑ์นม ที่ให้คำแนะนำและข้อมูลทางวิชาการที่เป็นประโยชน์ และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่กลุ่มตรวจสอบคุณภาพยาสัตว์และวัตถุอันตรายด้านการปศุสัตว์ ที่ให้คำแนะนำและให้ความช่วยเหลือในการปฏิบัติงานให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

Appendix K: Guidelines for Dietary Supplements and Botanicals, Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL (2023) 22nd Ed., AOAC INTERNATIONAL, Rockville, MD, USA. Available at: http://www.eoma.aoac.org/app_k.pdf

Christinat N., Savoy, MC. and Mottier, P. (2020). Development, validation and application of a LC-MS/MS method for quantification of 15 cannabinoids in food. Food Chemistry. 318: 126469.

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.

Lazarjani, M. P., Torres, S., Hooker, T., Fowlie, C., Young, O. and Seyfoddin, A. (2020). Methods for quantification of cannabinoids: a narrative review. *Journal of Cannabis Research*, *2*(1), 35

McRae, G., Melanson, JE. (2021) Quantitation of seventeen cannabinoids in dried cannabis, hemp and vape oils by LC-MS/MS. Customer Application Note 000108. Thermo Fisher Scientific

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.

กรมวิชาการเกษตร. (2564). คู่มือสำหรับเกษตรกรสำหรับการผลิตพืชสกุลกัญชา (Cannabis sativa L.) เพื่อประโยชน์ทางการแพทย์และอุตสาหกรรม. [เอกสารอิเล็กทรอนิกส์]. แหล่งที่มา: https://www.doa.go.th/th/category/%e0%b8%81%e0%b8%b1%e0%b8%8d%e0%b8%8a%e0%b8%87-%e0%b8%81%e0%b8%b1%e0%b8%8d%e0%b8%8a%e0%b8%b2/. [2 มิถุนายน 2568]

ปิยะรัตน์ จันทร์ศิริพรชัย 2562. ความก้าวหน้าของการใช้กัญชาในทางสัตวแพทย์. Vet Pract News 17 (206): 32–33.

ปิยะรัตน์ จันทร์ศิริพรชัย 2562. ภาวะพิษจากยาที่ใช้ในคนต่อสุนัขและแมว: แอสไพริน กัญชา และพาราเซตตามอล. Vet Pract News 17 (206): 36 – 37

สกุลรัตน์ สมสันติสุข, อัจฉรี อินแก้ว, เสาวนีย์ วาจาสิทธิ์, สุวิมล หมวดม๊ะ, กัญญารัตน์ เชื้อกูลชาติ, วิทวัส วังแก้วหิรัญ และทองสุข 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)

ศูนย์ความปลอดภัย อาชีวอนามัยและสิ่งแวดล้อม จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. (2565). ข้อควรรู้เกี่ยวกับกัญชา. แหล่งที่มา: https://www.shecu.chula.ac.th/home/content.asp?Cnt=753. [12 ธันวาคม 2568]