การแยกสารสำคัญในกัญชา

Separating Active Substances in Cannabis

จิราภรณ์ รสสุคนท์[1] และ มูฮำหมัด นิยมเดชา[1]

Jiraporn Rossukon[1] and Muhammad Niyomdecha[1]

สาขาวิชานิติวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร นครปฐม

Program Study of Forensic Science Faculty of Science, Silpakorn University, Nakhonpathom, Thailand

Corresponding Author, E-mail: [1]jiraporn.rskn@gmail.com

Received November 20, 2022; **Revised** March 7, 2023; **Accepted** May 9, 2023

บทคัดย่อ

กัญชา (Cannabis) มีสารสำคัญหลายชนิด ซึ่งสารสำคัญที่มีการศึกษามากที่สุดคือ กลุ่มแคนนาบินอยด์ (cannabinoids) ได้แก่ delta-9-tetrahydrocannabinol (THC) และ cannabidiol (CBD) โดย delta-9-tetrahydrocannabinol (THC) มีฤทธิ์ต่อจิตและประสาท ทำให้เกิดประสาทหลอน ความจำแย่ลง ส่วน cannabidiol (CBD) มีฤทธิ์ต่อจิตประสาทน้อยกว่าซึ่งจะไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์

การศึกษาวิธีการแยกสารสำคัญในกัญชามีวัตถุประสงค์เพื่อสกัดสารสำคัญของกัญชาด้วยเทคนิคที่แตกต่างกัน และหาตำแหน่งสาระสำคัญของกัญชาบนแผ่น TLC เพื่อนำมาใช้เป็นสารมาตรฐานทางนิติวิทยาศาสตร์ ผลการทดลองพบว่า พืชกัญชาสดจากการทดสอบโดยการนำส่วนของดอก และใบ มาสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล ทำการแยกด้วยเทคนิค TLC และพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิค ^{1}H-NMR พบว่าพืชกัญชาสดส่วนดอกแบนด์ C (Ff-C) เป็นสาร Δ^9-THC เมื่อเทียบกับ ^{1}H-NMR spectrum อ้างอิงของกัญชาจากงานวิจัยก่อนหน้า (Barthlott et al. 2021) ในพืชกัญชาแห้งจากการทดสอบโดยการนำส่วนของ ดอก และใบ มาสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล ทำการแยกด้วยเทคนิค TLC และพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิค ^{1}H-NMR พบว่ากัญชาแห้งส่วนดอกแบนด์ A (Fd-A) และส่วนใบแบนด์ B (Ld-B) เป็นสาร Δ^9-THC เมื่อเทียบกับ ^{1}H-NMR spectrum อ้างอิงของกัญชาจากงานวิจัยก่อนหน้า (Barthlott et al. 2021) และในส่วนของพืชกัญชาอัดแท่งจากการทดสอบโดยการนำพืชกัญชาอัดแท่งมาสกัดเอทานอลด้วยวิธี soxhlet extraction ทำการแยกด้วยเทคนิค TLC และพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิค ^{1}H-NMR พบว่าเป็นสาร CBN จากพืชกัญชาอัดแท่งแบนด์ A (S-A) เมื่อเทียบกับ ^{1}H-NMR spectrum อ้างอิงของกัญชาจากงานวิจัยก่อนหน้า (Barthlott et al. 2021)

คำสำคัญ: กัญชา; การแยกสาร; Δ^9-THC

Abstract

The study of the extraction of active substances in cannabis aims to extract the active substances of cannabis by different techniques. and locate the essence of cannabis on TLC sheets for use as a standard forensic science. The results showed that Fresh cannabis plants were tested by extracting parts of flowers and leaves with ethanol solvent. TLC isolates and ^{1}H–NMR identification were found to be Δ^{9}–THC in fresh cannabis plants compared to the reference ^{1}H–NMR spectrum of cannabis in previous studies (Barthlott I et al. 2021) in dried cannabis plants as a test by extracting flower and leaf parts with ethanol solvent. TLC isolation and identification by ^{1}H–NMR showed that the dried cannabis band A (Fd–A) and leaf band B (Ld–B) were Δ^{9}– THC as compared to ^{1}H–NMR. The reference spectrum of cannabis from previous research (Barthlott et al. 2021)

Keywords: Cannabis; Extraction; Δ^{9}–THC

บทนำ

ในส่วนกัญชา (Cannabis) เป็นพืชไม้ล้มลุก ใบรูปฝ่ามือ มีรอยหยักลึกเป็นแฉกแหลม 5–7 แฉกมีต้นกำเนิดอยู่ในแถบเอเชียกลาง (จักรกฤษณ์ สิงห์บุตร และชยันต พิเชียรสุนทร., 2562) มีทั้งหมด 3 สายพันธุ์ ได้แก่ 1. สายพันธุ์ซาติวา (Cannabis sativa) 2. สายพันธุ์อินดิกา (Cannabis indica) และ 3.สายพันธุ์รูเดอราลิส (Cannabis ruderalis) ในส่วนของประเทศไทยเป็นถิ่นกำเนิดของกัญชา (Cannabis Marijuana) ที่มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Cannabis sativa* L. subsp. indica อยู่ในวงศ์ Cannabidaceae (ประชาชาติธุรกิจ, 2565) กัญชา (Cannabis) มีส่วนประกอบทางเคมีมากกว่า 500 ชนิดในแต่ละสายพันธุ์จะพบสารเคมีและลักษณะทางกายภาพแตกต่างกันออกไป (Woodbridge, 2562) ซึ่งสารสำคัญในกัญชาจะมีหลายชนิด แต่สารสำคัญที่มีการศึกษามากที่สุดคือ กลุ่มแคนนาบินอยด์(cannabinoids) (Bang–orn, 2562) โดยสารสำคัญทั้ง 2 ชนิด มีรายงานวิจัยอย่างแพร่หลายได้แก่ delta–9–tetrahydrocannabinol (THC) และ cannabidiol (CBD) โดย delta–9–tetrahydrocannabinol (THC) มีฤทธิ์ต่อจิตและประสาท ทำให้เกิดประสาทหลอน ความจำแย่ลงส่วนสารสำคัญชนิดที่ 2 คือ cannabidiol (CBD) ซึ่งมีฤทธิ์ต่อจิตประสาทน้อยกว่าซึ่งจะไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ที่ใช้ทำลายยาอื่น ซึ่งสัดส่วนของสาร delta–9–tetrahydrocannabinol (THC) และ cannabidiol (CBD) มีเกณฑ์ในการจำแนกสายพันธุ์กัญชาได้ซึ่งปริมาณสารแคนนาบินอยด์ในกัญชา (Suwanna, 2562) หลังจากที่รัฐบาลมีนโยบายกัญชาเสรีไปเมื่อวันที่ 9 มิถุนายน พ.ศ. 2565พบเด็กและเยาวชนมากกว่า 37% มาทดลองสูบกัญชา ต่อมาคงเหลือ 22% ที่ยังคงสูบกัญชาอยู่โดยรวมแล้วกัญชานั้น

ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของร่างกายและพัฒนาการของสมองและระบบประสาทงานวิจัย The Effect of Medical Marijuanna Laws on Marijuana, Alcohol, and Hard Drug Use บ่งชี้ให้เห็นว่า การทำให้กัญชาและสารสกัดจากกัญชานั้นถูกกฎหมายทำให้มีการนำมาใช้อย่างไม่ถูกต้องเพิ่มขึ้น (Digital economic base, 2565) ประกาศกระทรวงสาธารณสุขเรื่อง ระบุชื่อยาเสพติดให้โทษในประเภท 5 (ฉบับที่ 8) พ.ศ. 2565 กำหนดไว้ว่าสารสกัดที่มีปริมาณสารเตตราไฮโดรแคนนาบินอล (tetrahydrocannabinol, THC) ไม่เกินร้อยละ 0.2 โดยน้ำหนัก ดังนั้นงานวิจัยนี้ ได้ศึกษาหาวิธีการแยกสาร delta–9–tetrahydro cannabinol (THC) และcannabidiol (CBD) ออกจากพืชกัญชา เพื่อให้ทราบตำแหน่งบน TLC และได้สารดังกล่าวในปริมาณที่มากพอเพื่อจะนำมาใช้เป็นสารมาตรฐานในงานทางนิติวิทยาศาสตร์ต่อไป

วัตถุประสงค์การวิจัย

เพื่อศึกษาเพื่อสกัดสารสำคัญของกัญชาด้วยเทคนิคที่แตกต่างกัน และหาตำแหน่งสารสำคัญของกัญชาบนแผ่น TLC เพื่อนำมาใช้เป็นสารมาตรฐานทางนิติวิทยาศาสตร์

การทบทวนวรรณกรรม

Burnier, Esseiva & Roussel (2019) ได้ศึกษาการหาปริมาณของ THC ในพืชกัญชา โดยวิธี fast–HPLC–DAD ทุกวันนี้ Gas Chromatography Mass Spectrometry (GC–MS) ถูกใช้เป็นวิธีหลักในด้านนิติวิทยาศาสตร์ แต่ต้องเผชิญกับข้อจำกัดเมื่อสารประกอบที่วิเคราะห์นั้นไม่เสถียรทางความร้อน เนื่องจากเป็นกรณีของTHC–A (Tetrahydrocannabinolic Acid) ซึ่งถูกแปลงเป็น Δ^9–THC (Δ^9 –Tetrahydrocannabinol) ที่ย่อยสลายได้บางส่วนในเวลาต่อมาวัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้ได้ศึกษาวิธีโครมาโตกราฟีของเหลวความดันสูงแบบเร็ว (Fast–HPLC–DAD) ซึ่งช่วยให้แยก CBN (Cannabinol), CBD (Cannabidiol), THC–A และ Δ^9–THC ซึ่งเป็นสารประกอบหลักของ cannabinoids ที่พบในพืชกัญชาได้อย่างมีประสิทธิภาพ น้อยกว่า 5 นาที วิธีการนี้จะช่วยให้สามารถหาปริมาณ Δ^9–THC ในสารสกัดจากพืชได้อย่างเหมาะสมโดยใช้วิธีการสอบเทียบภายนอกที่มีความแม่นยำดีมากตามที่ระบุไว้โดยการกู้คืน 100.53±3.12% นอกจากนี้ยังเป็นทางเลือกที่น่าสนใจในราคาประหยัดสำหรับ Ultra High Pressure Liquid Chromatography (UPLC) สำหรับการวิเคราะห์ตามปกติในนิติวิทยาศาสตร์

ธนวัฒน์ ทองจีน และคณะ (2021) ได้ศึกษาวิธีการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณแคนนาบินอยด์ในใบกัญชาด้วยวิธี Ultra High PerformanceLiquid Chromatography โดยการศึกษานี้มีวัตถุประสงคเพื่อพัฒนาวิธีการวิเคราะห์ปริมาณแคนนาบินอยด์ (CBD, CBN และ THC) ในใบกัญชาด้วยวิธี Ultra–High Performance LiquidChromatography (UHPLC) โดยการสกัดตัวอย่างใบกัญชาใน ethanol ด้วยวิธี reflux กรองและนำสาร

สกัดมาระเหยแห้ง จากนั้นละลายกลับและปรับปริมาตรด้วย methanolแล้วนำมาวิเคราะห์ด้วยเครื่อง UHPLC ผลการทดสอบความใช้ได้ของวิธี วิเคราะห์ดังกล่าว พบว่าcalibration curve ของ CBD, CBN และ THC มีลักษณะเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 1.07–106.89,1.00–99.60 และ 1.00–99.90 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ค่า correlation coefficient (r) เท่ากับ0.999, ค่า %recovery อยู่ในช่วง 96.83–100.89%, ค่า HORRAT อยู่ในช่วง 0.30–1.96, limit ofdetection (LOD) ของ CBD, CBN และ THC มีค่าเท่ากับร้อยละ 0.006, 0.009 และ 0.003 โดยน้ำหนักตามลำดับ ในขณะที่ limit of quantitation (LOQ) มีค่าเท่ากับ ร้อยละ 0.020, 0.032 และ 0.011 โดยน้ำหนัก ตามลำดับ ซึ่งวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นนี้ มีความเหมาะสมสามารถนำไปใช้เป็นวิธีตรวจวิเคราะห์ปริมาณสาร CBD, CBN และ THC ในวัตถุดิบและสารสกัดกัญชาได้

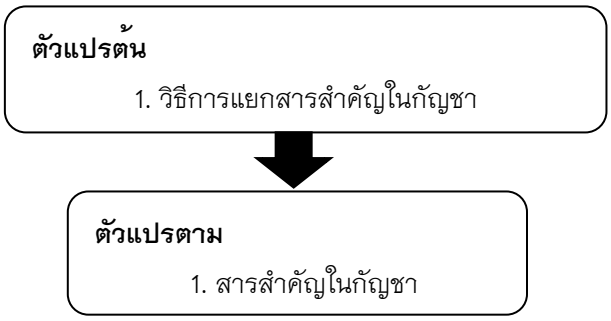
กรอบแนวคิดการวิจัย

งานวิจัยนี้ เป็นการวิจัยเชิงปริมาณและคุณภาพ ผู้วิจัยกำหนดกรอบแนวคิดการวิจัยตามแนวคิด โดยมีรายละเอียดดังนี้

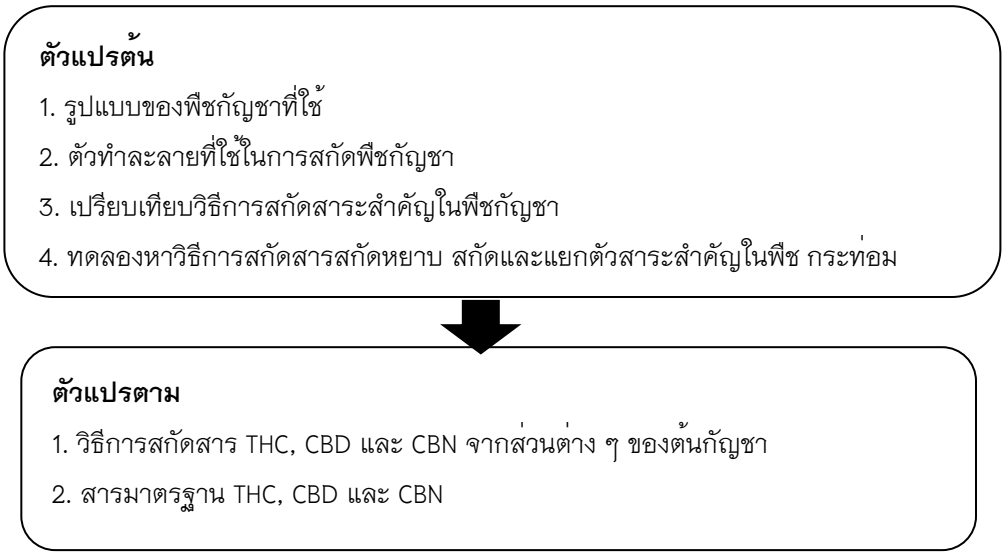
ตัวแปรต้น วิธีการแยกสาระสำคัญในกัญชา

ตัวแปรตาม สารสำคัญในกัญชา

- กรอบแนวคิดการวิจัยในพืชกระท่อม



- กรอบแนวคิดการวิจัยในพืชกัญชา



ระเบียบวิธีวิจัย

งานวิจัยนี้เป็นงานวิจัย เชิงปริมาณ และเชิงคุณภาพ พื้นที่วิจัย คือ คณะวิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยศิลปากร โดยมีขั้นตอนการวิจัยดังนี้

1. การเตรียมสารสกัดหยาบ (crude extract) จากใบพืชกัญชาสดนำส่วนดอกและใบของพืชกัญชามาสับให้ละเอียด จากนั้นชั่งส่วนดอกและใบ 27.45 g และ 20 g ตามลำดับ นำมาสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล 400 mL (ภาพที่ 14) หลังจากนั้นทำการกรองสารสกัด และนำสารสกัดที่ได้ ไปทำการระเหยเอาตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง rotary evaporator เมื่อแห้งแล้วนำไปชั่งน้ำหนัก คำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์ yield

2. วิธีการแยกสารแคนนาบินอยด์นำสารสกัดที่ได้ดูดออกมาจากขวดไวแอลให้พอประมาณ นำไปชั่งน้ำหนัก (ชั่งน้ำหนักขวดก่อน และหลัง) จากนั้นนำไประเหยให้แห้ง แล้วจึงนำไปทำการสพอท (spot) นำสารสกัดที่ได้มาสพอท (spot) ลงบนแผ่นเพลต TLC (Thin–layerchromatography) โดยควบคุมอัตราการสพอท (spot) เท่า ๆ กันอย่างสม่ำเสมอ โดยใช้หลอดแคพิลารี่(Capillary tube) ในการสพอท (spot) (ภาพที่ 16) ใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ (Mobile phase) คือ Hexane : Dichloromethane (1 : 1) ตามลำดับ แล้วปิดฝา จับเวลา 1 นาที เมื่อครบแล้วนำไปส่องภายใต้แสงยูวี (Ultraviolet) ที่ช่วงความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร ใช้ดินสอวงกลมหาตำแหน่งสารที่แยกได้ นำมาทำการขูดตำแหน่งแบนด์ของสารสำคัญ นำสารแต่ละแบรนด์ที่ขูดออกมากรองและชะล้างด้วยตัวทำละลาย Methanolจากนั้นนำสารที่ได้จากการกรองไประเหยเอาตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง rotary evaporator(จดน้ำหนักขวดก่อนและหลังระเหย)

3. การเตรียมสารสกัดหยาบ (crude extract) จากใบพืชกัญชาแห้งนำส่วนดอกและใบของพืชกัญชามาสับให้ละเอียด จากนั้นชั่งส่วนดอก และใบ 27.45 g และ 20 g ตามลำดับ นำมาสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล 400 mL หลังจากนั้นทำการกรองสารสกัด และนำสารสกัดที่ได้ ไปทำการระเหยเอาตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง rotary evaporator เมื่อแห้งแล้วนำไปชั่งน้ำหนัก คำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์ yield

4. การเตรียมสารสกัดหยาบ (crude extract) จากใบพืชกัญชาอัดแท่งนำตัวอย่างกัญชาอัดแท่งมาบดหยาบ ๆ นำไปชั่ง 100 g จากนั้นนำไปห่อด้วยผ้าขาวบางมัดให้แน่น จากนั้นนำไปใส่ในเครื่อง soxhlet extraction เติมตัวทำละลาย Ethanol 800 mL สกัดด้วยอุณหภูมิที่ 75 – 80°C สกัดไปเรื่อย ๆ จนกว่าตัวทำละลายจะมีสีใสจากนั้นนำสารสกัดที่ได้ ไปทำการระเหยเอาตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง rotary evaporator เมื่อแห้งแล้วนำไปชั่งน้ำหนัก คำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์ yield

5. วิเคราะห์ด้วยเทคนิค ^{1}H–NMR นำสารที่สกัดได้ ละลายใน $CDCl_3$ นำไปวิเคราะห์ด้วย NMR โดยสำหรับ ^{1}H–NMR ทำการ Run ที่ chemical shift 0–9 ppm นำ spectrum ที่ได้จากการทดลองมาเทียบเท่ากับ spectrum มาตรฐาน

ผลการวิจัย

วัตถุประสงค์เพื่อสกัดสารสำคัญของกัญชาด้วยเทคนิคที่แตกต่างกัน และหาตำแหน่งสาระสำคัญของกัญชาบนแผ่น TLC เพื่อนำมาใช้เป็นสารมาตรฐานทางนิติวิทยาศาสตร์

1. ปริมาณสารสกัดหยาบ (Crude extract) จากพืชกัญชาสด

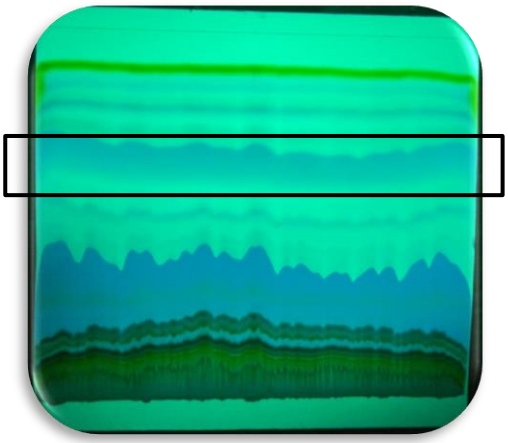
จากการศึกษานำส่วนดอกและใบของพืชกัญชา มาสับให้ละเอียด จากนั้นชั่งส่วนดอกและใบ 27.45 g และ 20 g ตามลำดับ นำมาสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล 400 mL จากนั้นทำการกรองสารสกัด และนำสารสกัดที่ได้ ไปทำการระเหยเอาตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง rotary evaporator เมื่อแห้งแล้วนำไปชั่งน้ำหนัก คำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์ yield (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ปริมาณชิ้นส่วนของพืชกัญชาสดที่ใช้ในการสกัดและสารสกัดหยาบที่ได้จากการสกัด

	น้ำหนัก (g)	**น้ำหนักสารสกัดหยาบ (g)**	**ร้อยละผลผลิต ของสารที่สกัดได้ (% Yield)**
ดอก	27.45	1.65	6.010
ใบ	20	1.05	5.25

2. ผลการตรวจสอบสารสกัดหยาบจากพืชกัญชาสดด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีแผ่นบาง (Thin Layer Chromatography; TLC)

จากการศึกษาโดยนำสารที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลมาทำการตรวจสอบสารสำคัญ ด้วยเทคนิค TLC โดยใช้ Mobile phase คือ Hexane : Dichloromethane (1 : 1) ทำให้เกิดแบนด์ (Band) (ภาพที่ 1) (ภาพที่ 2) ใช้ดินสอวงกลมหาตำแหน่งสารที่แยกได้ นำมาทำการขูดตำแหน่งแบนด์ในการหาสารสำคัญ

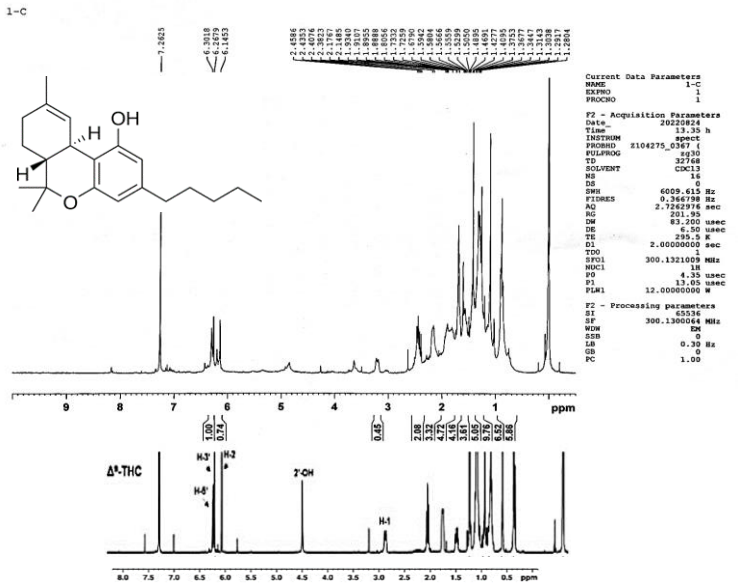


ภาพที่ 1 โครมาโทแกรมของสารสกัดหยาบจากพืชกัญชาสดส่วนดอก (Ff) เมื่อทำการแยกหาสารสำคัญด้วยเทคนิค TLC

ภาพที่ 2 โครมาโทแกรมของสารสกัดหยาบจากพืชกัญชาสดส่วนใบ (Lf)
เมื่อทำการแยกหาสารสำคัญด้วยเทคนิค TLC

3. ผลการตรวจสอบและวิเคราะห์ด้วยเทคนิค ^{1}H–NMR ของพืชกัญชาสด

จากการนำสารที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล มาทำการแยกเพื่อหาสารบริสุทธิ์ด้วยเทคนิค TLC plate และนำสารที่คาดว่าจะเป็นสารสำคัญในกัญชา มาพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิค ^{1}H–NMR พบว่าสารสกัดหยาบจากพืชกัญชาสดส่วนดอกแบนด์ C (Ff–C) มีแบนด์ที่เป็นสารสำคัญคือ Δ^{9}–THC (ภาพที่ 3) ที่แยกได้เทียบกับ spectrum ^{1}H–NMR จากงานวิจัยก่อนหน้า (Barthlott et al. 2021) ในส่วนสารสกัดหยาบจากพืชกัญชาสดส่วนใบในการทดลองนี้ยังไม่พบสารสำคัญ Δ^{9}–THC และ CBD เมื่อเทียบกับ spectrum ^{1}H–NMR จากงานวิจัยก่อนหน้า (Barthlott et al. 2021)



ภาพที่ 3 แสดง ^{1}H–NMR spectrum สารสกัดหยาบจากพืชกัญชาสดส่วนดอกแบนด์ C (Ff–C)

ที่แยกได้เทียบกับ spectrum ^{1}H–NMR จากงานวิจัยก่อนหน้า (Barthlott et al. 2021)

4. ปริมาณสารสกัดหยาบ (Crude extract) จากพืชกัญชาแห้ง

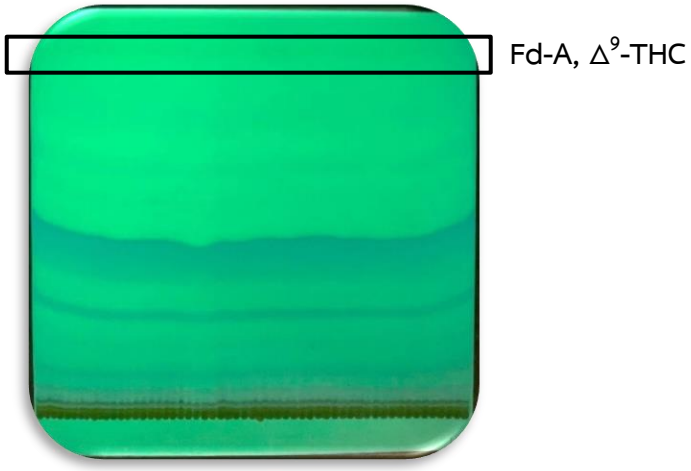
จากการศึกษานำส่วนดอกและใบของพืชกัญชา มาสับให้ละเอียด จากนั้นชั่งส่วนดอกและใบ 27.45 g และ 20 g ตามลำดับ นำมาสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล 400 mL จากนั้นทำการกรองสารสกัด และนำสารสกัดที่ได้ ไปทำการระเหยเอาตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง rotary evaporator เมื่อแห้งแล้วนำไปชั่งน้ำหนัก คำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์ yield (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 ปริมาณชิ้นส่วนของพืชกัญชาแห้งที่ใช้ในการสกัดและสารสกัดหยาบที่ได้จากการสกัด

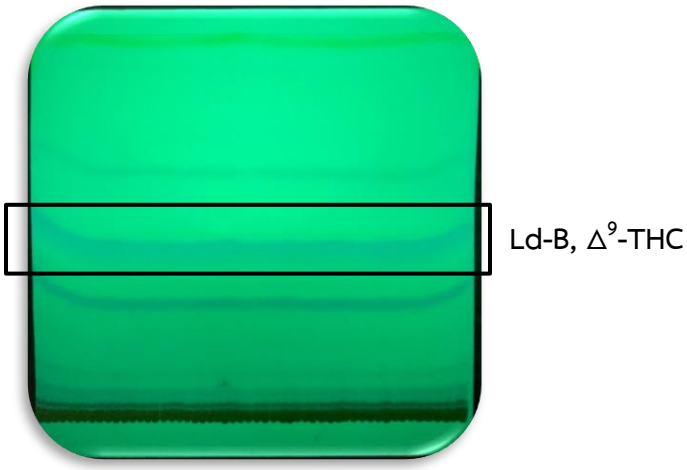
	น้ำหนัก (g)	**น้ำหนักสารสกัดหยาบ (g)**	**ร้อยละผลผลิต ของสารที่สกัดได้ (% Yield)**
ดอก	27.45	2.28	8.306
ใบ	20	1.7	8.5

5. ผลการตรวจสอบสารสกัดหยาบจากพืชกัญชาแห้งด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีแผ่นบาง (Thin Layer Chromatography; TLC)

จากการศึกษาโดยนำสารที่สกัดด้วยตัวทำละลายแต่ละชนิดมาทำการตรวจสอบสารสำคัญ ด้วยเทคนิค TLC โดยใช้ Mobile phase คือ Hexane : Dichloromethane (1 : 1) ทำให้เกิดแบนด์ (Band) (ภาพที่ 4) (ภาพที่ 5) ใช้ดินสอวงกลมหาตำแหน่งสารที่แยกได้ นำมาทำการขูดตำแหน่งแบนด์ในการหาสารสำคัญ



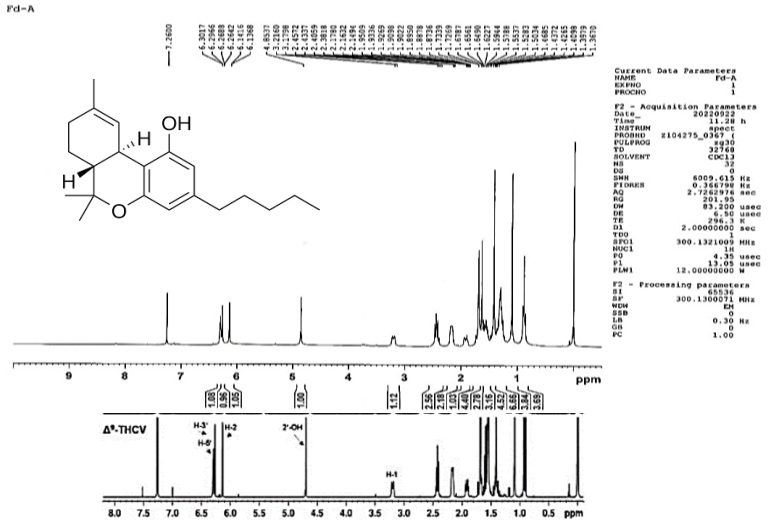
ภาพที่ 4 โครมาโทแกรมของสารสกัดหยาบจากพืชกัญชาแห้งส่วนของดอก (Fd) เมื่อทำการแยกหาสารสำคัญด้วยเทคนิค TLC



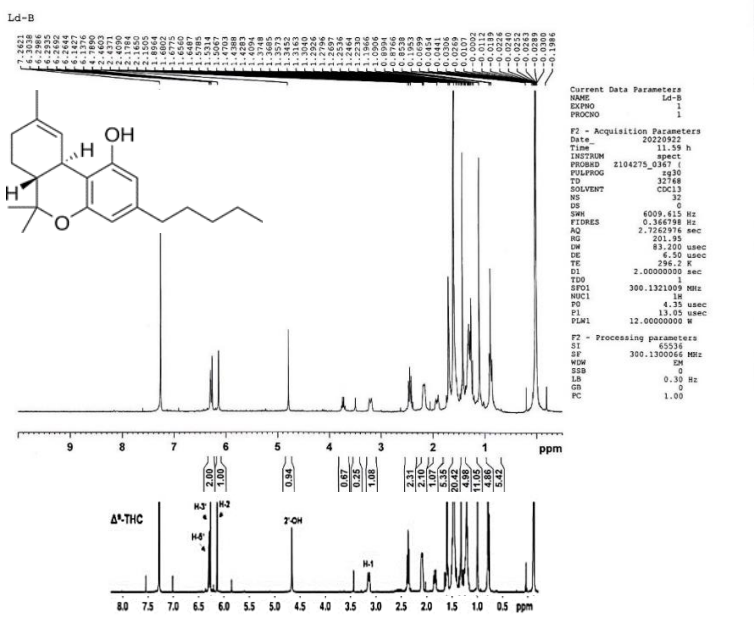
ภาพที่ 5 โครมาโทแกรมของสารสกัดหยาบจากพืชกัญชาแห้งส่วนของใบ (Ld) เมื่อทำการแยกหาสารสำคัญด้วยเทคนิค TLC

6. ผลการตรวจสอบและวิเคราะห์ด้วยเทคนิค ^{1}H–NMR ของพืชกัญชาแห้ง

จากการศึกษาโดยนำสารที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล มาทำการแยกเพื่อหาสารบริสุทธิ์ด้วยเทคนิค TLC plate และนำสารที่คาดว่าจะเป็นสารสำคัญในกัญชา มาพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิค ^{1}H–NMR พบว่าสารจากพืชกัญชาแห้งส่วนดอกแบนด์ A (Fd–A) เป็นสารสำคัญคือ Δ^{9}–THC (ภาพที่ 6) เทียบกับ spectrum ^{1}H–NMR งานวิจัยก่อนหน้า (Barthlott et al. 2021) ในส่วนสารพืชกัญชาแห้งส่วนใบแบนด์ B (Ld–B) เป็นสารสำคัญคือ Δ^{9}–THC (ภาพที่ 7) เทียบกับ spectrum 1H–NMR งานวิจัยก่อนหน้า (Barthlott et al. 2021)



ภาพที่ 6 แสดง ^{1}H–NMR spectrum สารจากพืชกัญชาแห้งส่วนดอกแบนด์ A (Fd–A) ที่แยกได้เทียบกับ spectrum ^{1}H–NMR จากงานวิจัยก่อนหน้า (Barthlott et al. 2021)



ภาพที่ 7 แสดง ^{1}H–NMR spectrum สารสกัดหยาบจากพืชกัญชาแห้งส่วนใบแบนด์ B (Ld–B) ที่แยกได้เทียบกับ spectrum ^{1}H–NMR จากงานวิจัยก่อนหน้า (Barthlott et al. 2021)

7. ปริมาณสารสกัดหยาบ (Crude extract) จากพืชกัญชาอัดแท่ง

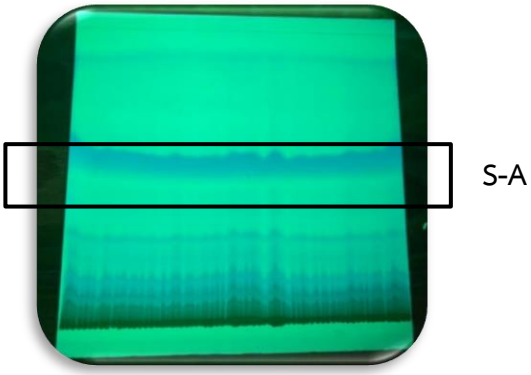
จากการศึกษาโดยนำตัวอย่างกัญชาอัดแท่งมาบดหยาบ ๆ นำไปชั่ง 100 g จากนั้นนำไปห่อด้วยผ้าขาวบางมัดให้แน่น จากนั้นนำไปใส่ในเครื่อง Soxhlet extraction สกัดด้วยตัวทำละลาย Ethanol ด้วยอุณหภูมิที่ 75 – 80°C สกัดไปเรื่อย ๆ จนกว่าตัวทำละลายจะมีสีใส นำสารสกัดมากรอง จากนั้นทำการระเหยเอาตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง rotary evaporator เมื่อแห้งแล้วนำไปชั่งน้ำหนัก คำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์ yield

ตารางที่ 3 ปริมาณชิ้นส่วนของพืชกัญชาอัดแท่งที่ใช้ในการสกัดและสารสกัดหยาบที่ได้จากการสกัด

	น้ำหนัก (g)	**น้ำหนักสารสกัดหยาบ (g)**	**ร้อยละผลผลิต ของสารที่สกัดได้ (% Yield)**
กัญชาอัดแท่ง	100	8.86	8.86

8. ผลการตรวจสอบสารสกัดหยาบจากพืชกัญชาอัดแท่งด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีแผ่นบาง (Thin Layer Chromatography; TLC)

จากการศึกษาโดยนำสารที่สกัดด้วยตัวทำละลายมาทำการตรวจสอบสารสำคัญ ด้วยเทคนิค TLC โดยใช้ Mobile phase คือ Hexane : Dichloromethane (1 : 1) ทำให้เกิดแบนด์ (Band) (ภาพที่ 8) ใช้ดินสอวงกลมหาตำแหน่งสารที่แยกได้ นำมาทำการขูดตำแหน่งแบนด์ในการหาสารสำคัญ

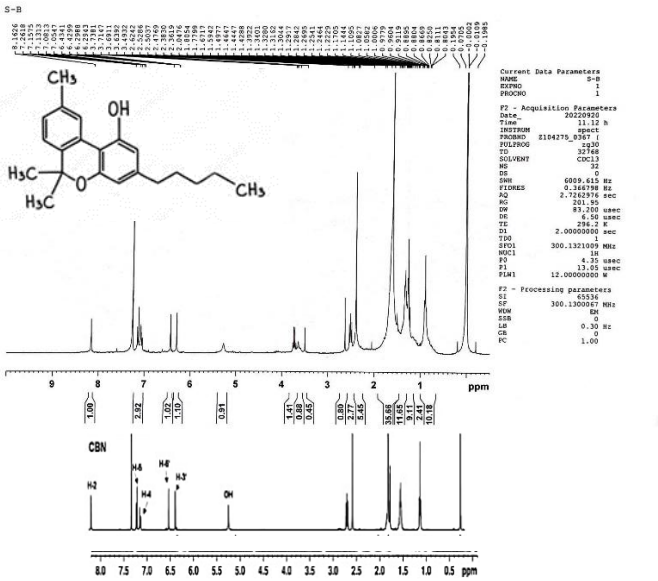


ภาพที่ 8 โครมาโทแกรมของสารสกัดหยาบจากพืชกัญชาอัดแท่ง (S)
เมื่อทำการแยกหาสารสำคัญด้วยเทคนิค TLC
(S–A = พืชกัญชาอัดแท่งแบนด์ A)

นำสารแต่ละแบนด์ที่ขูดออกมาชะล้างด้วยตัวทำละลาย Ethanol แล้วจึงกรอง จากนั้นนำสารที่ได้จากการกรองไประเหยเอาตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง rotary evaporator

9. ผลการตรวจสอบและวิเคราะห์ด้วยเทคนิค ^{1}H–NMR ของพืชกัญชาอัดแท่ง

จากการศึกษาโดยนำสารที่สกัดด้วยตัวทำละลาย (Crude products) เอทานอล มาทำการแยกเพื่อหาสารบริสุทธิ์ด้วยเทคนิค TLC plate และนำสารที่คาดว่าจะเป็นสารสำคัญในกัญชา มาพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิค ^{1}H–NMR พบว่ามีแบนด์ที่เป็นสารสำคัญคือ CBN เมื่อเทียบกับพีค ^{1}H–NMR spectrum ของกัญชาจากงานวิจัยก่อนหน้า (Barthlott et al. 2021) (ภาพที่ 9)



ภาพที่ 9 แสดง ^{1}H–NMR spectrum สารสกัดหยาบจากพืชกัญชาอัดแท่งแบนด์ A (S–A) ที่แยกได้เทียบกับ spectrum ^{1}H–NMR จากงานวิจัยก่อนหน้า (Barthlott et al. 2021)

อภิปรายผลการวิจัย

พืชกัญชาสด จากการทดสอบโดยการนำส่วนดอกและใบของพืชกัญชา มาสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล นำมาทำการแยกเพื่อให้ได้สารสำคัญในกัญชาด้วยเทคนิค TLC จากนั้นนำมาพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิค ^{1}H–NMR พบว่าพืชกัญชาสดส่วนดอกแบนด์ C (Ff–C) มีแบนด์ที่เป็นสารสำคัญคือ Δ^{9}–THC เมื่อเทียบกับพีค ^{1}H–NMR spectrum มาตรฐานของกัญชา (Barthlott et al. 2021)

พืชกัญชาแห้ง จากการทดสอบโดยการนำส่วนดอกและใบของพืชกัญชา มาสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล นำมาทำการแยกเพื่อให้ได้สารสำคัญในกัญชาด้วยเทคนิค TLC จากนั้นนำมาพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิค ^{1}H–NMR พบว่าพืชกัญชาแห้งส่วนดอกแบนด์ A (Fd–A) และ พืชกัญชาแห้งส่วนใบแบนด์ B (Ld–B) มีแบนด์ที่เป็นสารสำคัญคือ Δ^{9}–THC เมื่อเทียบกับพีค ^{1}H–NMR spectrum มาตราฐานของกัญชา (Barthlott et al. 2021)

พืชกัญชาอัดแท่ง จากการทดสอบโดยการนำพืชกัญชาอัดแท่งมาสกัดเอทานอลด้วยวิธี soxhlet extraction นำมาทำการแยกเพื่อให้ได้สารสำคัญในกัญชาด้วยเทคนิค TLC จากนั้นนำมาพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิค ^{1}H–NMR พบว่าพืชกัญชาอัดแท่งแบนด์ A (S–A) มีแบนด์ที่เป็นสารสำคัญคือ CBN เมื่อเทียบกับพีค ^{1}H–NMR spectrum มาตราฐานของกัญชา (Barthlott et al. 2021)

องค์ความรู้ใหม่จากการวิจัย

จากผลการทดลองพืชกัญชาสดจากการทดสอบโดยการนำส่วนของดอก และใบ มาสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล ทำการแยกด้วยเทคนิค TLC และพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิค ^{1}H–NMR พบว่าสามารถหาตำแหน่งของสาระสำคัญของกัญชาคือ สาร Δ^{9}–THC บนแผ่น TLC ได้ นอกจากนี้วิธีการแยกสารสำคัญด้วยวิธีต่าง ๆ ในงานวิจัยนี้ยังสามารถแยกสารสำคัญจากกัญชาได้ ในกฎหมายฉบับใหม่กำหนดไว้ว่าอาหารหรือผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ จะสามารถมีปริมาณสารเตตราไฮโดรแคนนาบินอล (tetrahydrocannabinol, THC) ไม่เกินร้อยละ 0.2 โดยน้ำหนัก ดังนั้นงานวิจัยนี้ ได้ศึกษาหาวิธีการแยกสาร delta–9–tetrahydro cannabinol (THC) และcannabidiol (CBD) ออกจากพืชกัญชา จึงเป็นประโยชน์เพื่อให้ได้สารดังกล่าวในปริมาณที่มากพอเพื่อจะนำมาใช้เป็นสารมาตรฐานในงานทางนิติวิทยาศาสตร์ได้

	THC (tetrahydrocannabinol)	**CBN (cannabinol)**	**CBD (cannabidiol)**
พืชกัญชาสด – ส่วนดอกแบนด์ C	✓		
พืชกัญชาแห้ง – ส่วนดอกแบนด์ A – ส่วนใบแบนด์ B	✓ ✓		
พืชกัญชาอัดแท่ง – แบนด์ A		✓	

สรุป

พืชกัญชาสดจากการทดสอบโดยการนำส่วนของดอก และใบ มาสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล ทำการแยกด้วยเทคนิค TLC และพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิค 1H–NMR พบว่าพืชกัญชาสดส่วนดอกแบนด์ C (Ff–C) เป็นสาร Δ9–THC เมื่อเทียบกับ 1H–NMR spectrum อ้างอิงของกัญชาจากงานวิจัยก่อนหน้า (Barthlott et al. 2021) ในพืชกัญชาแห้งจากการทดสอบโดยการนำส่วนของ ดอก และใบ มาสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล ทำการแยกด้วยเทคนิค TLC และพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิค 1H–NMR พบว่ากัญชาแห้งส่วนดอกแบนด์ A (Fd–A) และส่วนใบแบนด์ B (Ld–B) เป็นสาร Δ9–THC เมื่อเทียบกับ 1H–NMR spectrum อ้างอิงของกัญชาจากงานวิจัยก่อนหน้า (Barthlott et al. 2021) และในส่วนของพืชกัญชาอัดแท่งจากการทดสอบโดยการนำพืชกัญชาอัดแท่งมาสกัดเอทานอลด้วยวิธี soxhlet extraction ทำการแยกด้วยเทคนิค

TLC และพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิค 1H–NMR พบว่าเป็นสาร CBN จากพืชกัญชาอัดแท่งแบนด์ A (S–A) เมื่อเทียบกับ 1H–NMR spectrum อ้างอิงของกัญชาจากงานวิจัยก่อนหน้า (Barthlott et al. 2021)

ข้อเสนอแนะ

จากผลการวิจัย ผู้วิจัยมีข้อเสนอแนะ ดังนี้

1. ข้อเสนอแนะในการนำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์

ควรศึกษาหาวิธีการแยกสารบริสุทธิ์ อย่างละเอียดมากขึ้น ที่สามารถนำไปใช้เพื่อหาสารสำคัญในกัญชา THC, CBD ให้ได้สารที่มีความบริสุทธิ์มากที่สุด เพื่อยืนยันคุณสมบัติของพืชกัญชาก่อนนำไปใช้ทางคลินิกต่อไป นอกจากนี้ กฎหมายฉบับใหม่กำหนดไว้ว่า อาหารหรือผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ จะสามารถมีปริมาณสารเตตราไฮโดรแคนนาบินอล (tetrahydrocannabinol, THC) ไม่เกินร้อยละ 0.2 โดยน้ำหนัก ดังนั้นงานวิจัยนี้ ได้ศึกษาหาวิธีการแยกสาร delta–9–tetrahydro cannabinol (THC) และcannabidiol (CBD) ออกจากพืชกัญชา จึงเป็นประโยชน์เพื่อให้ได้สารดังกล่าวในปริมาณที่มากพอเพื่อจะนำมาใช้เป็นสารมาตรฐานในงานทางนิติวิทยาศาสตร์ต่อไป

References

Arunpongpaisal, S. (2019). Using marijuana extract for patients with mental health problems. *Department of Medical Services, 44* (1),7–9.

Barthlott, I. et al. (2021). A Quantitative ^{1}H NMR Method for Screening Cannabinoids in CBD Oils. *Toxics, 9*(6), 136. https://doi.org/10.3390/toxics9060136

Burnier, C. Esseiva, P.& Roussel, C. (2019). Quantification of THC in Cannabis plants by fast–HPLC–DAD: A promising method for routine analyses. *Talanta, 192*, 135–141. https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.09.012

Business, P. (2565). *How many strains of cannabis are there? Is it different? What are the properties.* https://www.prachachat.net/general/news–951556.

Digital economic base. (2565). 'Free marijuana' is not worth it, why, how dangerous it is, how to fix it. https://www.thansettakij.com/general–news/529419

Singbutr, C and Phichiansoonthorn, C. (2019). *'Basic knowledge of cannabis plants.'* Royal Academy in Health Sciences Pharmacy School of Science Royal Institute of Thailand.