

The background is a solid medium blue. It is decorated with several large, light blue, organic, and wavy shapes that resemble cells or fluid droplets. Some of these shapes contain concentric circles or smaller circles, creating a layered or cellular effect. A large, white, sans-serif number '1' is centered on the page.

1

การตรวจหาปริมาณสารแคนนาบินอยด์ในเครื่องดื่มจากกัญชง ด้วยเทคนิคอัลตราไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิด โครมาโทกราฟี-แทนเดมแมสสเปกโทรเมตรี

The determination of cannabinoids in hemp beverages by ultra-high
performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

1

จุฑาทิพย์ ลาภวิบูลย์สุข¹, พัฒนินา วงศ์พิชัย¹, สมภพ ลาภวิบูลย์สุข¹

Jutathip Lapviboonsuk¹, Patnipa Wongpichai¹, Sompop Lapviboonsuk¹

รับบทความ: 25 ตุลาคม 2565 แก้ไขบทความ: 23 พฤศจิกายน 2565 ยอมรับตีพิมพ์: 20 กุมภาพันธ์ 2566

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ได้ศึกษาการเตรียมตัวอย่างและความเหมาะสมของเทคนิคลิควิดโครมาโทกราฟี-แทนเดมแมสสเปกโทรเมตรีในการตรวจหาปริมาณสารแคนนาบินอยด์ในเครื่องดื่มจากกัญชง โดยทำการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีโดยใช้ In-house method based on AOAC (2020) 2018.11 และมีความถูกต้องอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับตาม Commission (EU) 2002/657/EC ได้ค่าร้อยละการคืนกลับเฉลี่ย สำหรับ cannabidiol (CBD) เท่ากับ 99.5 98.4 และ 98.0 (-)- Δ 9-tetrahydrocannabinol (Δ 9-THC) เท่ากับ 98.4 97.3 และ 96.9 (-)- Δ 8-tetrahydrocannabinol (Δ 8-THC) เท่ากับ 93.0 100.4 และ 100.0 (-)-trans-delta-9-THC carboxylic acid A (THCA-A) เท่ากับ 85.0 99.1 และ 100.8 ที่ระดับความเข้มข้น 0.10 50 และ 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ ความเที่ยงอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับ และค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์มีค่าอยู่ระหว่างร้อยละ 3.59 – 9.78 นอกจากนี้ขีดจำกัดของการตรวจพบ และขีดจำกัดของการหาปริมาณ เท่ากับ 0.010 และ 0.10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ จากผลการวิจัยแสดงว่าวิธีนี้มีความน่าเชื่อถือ และเหมาะสมสำหรับการตรวจหาปริมาณสารแคนนาบินอยด์ในเครื่องดื่มจากกัญชง ปริมาณสารแคนนาบินอยด์ที่ตรวจพบในตัวอย่าง อยู่ในช่วงไม่พบ ถึง 4.10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

คำสำคัญ: แคนนาบิไดออล เตตราไฮโดรแคนนาบินออล ซีบีดี ทีเอชซี เครื่องดื่ม ลิควิดโครมาโทกราฟี-แทนเดมแมสสเปกโทรเมตรี

¹ กองผลิตภัณฑ์อาหารและวัสดุสัมผัสอาหาร กรมวิทยาศาสตร์บริการ

Abstract

In this research, the suitability of sample preparation and liquid chromatography – tandem mass spectrometry for the determination of cannabinoids in hemp beverages was studied. The method validation was performed by using in-house method based on AOAC (2020) 2018.11 and accuracies were in acceptable range as following the EU Commission 2002/657/EC. The averages of recoveries were 99.5, 98.4 and 98.0% for cannabidiol (CBD), 98.4, 97.3 and 96.9% for (-)- Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC), 93.0, 100.4 and 100.00% for (-)- Δ^8 -tetrahydrocannabinol (Δ^8 -THC), 85.0, 99.1 and 100.8% for (-)-trans-delta-9-THC carboxylic acid A (THCA-A) at the concentration levels of 0.10, 50 and 100 mg kg⁻¹, respectively. The precision was also in the acceptable range. The relative standard deviations (RSDs) were in the range of 3.59 - 9.78%. Furthermore, the detection limit and quantitation limit were 0.010 and 0.10 mg kg⁻¹, respectively. These research results demonstrated that the method was reliable and suitable for the measurement of cannabinoids in hemp beverages. The cannabinoid concentrations in real samples ranged from not detected to 4.10 mg kg⁻¹.

Keywords: Cannabidiol, Tetrahydrocannabinol, CBD, THC, Beverages, Liquid chromatography – tandem mass spectrometry

¹ Food Products and Food Contact Materials Division, Department of Science Service

* Corresponding author e-mail address: jutathip@dss.go.th

1. บทนำ (Introduction)

กลุ่มสารแคนนาบินอยด์ (Cannabinoids) ที่สำคัญได้แก่ สาร Tetrahydrocannabinol (THC) และ สาร Cannabidiol (CBD) เป็นต้น โดยสาร THC เป็นสารที่พบได้มากในกัญชา (marijuana) พบในประมาณ 1-20% และสาร THC สามารถพบในกัญชาด้วย แต่มีในปริมาณน้อยกว่า 1% [1] ในทางการแพทย์สาร THC มีประโยชน์คือ เป็นสารที่ใช้ในการช่วยลดอาการปวด รักษาภาวะกล้ามเนื้อหดเกร็ง รักษาโรคลมชักที่ดื้อยา ลดอาการคลื่นไส้อาเจียนจากการได้ยาเคมีบำบัด แต่การใช้สารชนิดนี้ในการรักษาก็อาจจะทำให้ผู้ป่วยมีผลข้างเคียงในระยะสั้นต่อระบบประสาท เช่น มีความผิดปกติในการใส่ใจและสมาธิ เวียนศีรษะหรือมีศีรษะ ่วงงอนมากผิดปกติ เห็นภาพหลอนหรือหูแว่ว เป็นต้น รวมทั้งอาจส่งผลต่อความจำระยะยาว การวางแผน และความสามารถในการตัดสินใจ และอาจเพิ่มความเสี่ยงต่อการเกิดโรคหลอดเลือดสมองอีกด้วย [2] สำหรับสาร CBD ซึ่งเป็นสารที่พบได้ในกัญชา (Hemp) มากกว่ากัญชา คือพบประมาณ 2% [1] โดยในกัญชามีสารนี้อยู่น้อยมาก สารนี้จะไม่ทำให้มีอาการเมาหรือเคลิบเคลิ้มเหมือน THC และสาร CBD ออกฤทธิ์ตรงข้ามกับ THC เช่นต่อต้านการเกิดโรคจิตประสาท ความจำเสื่อมและลดความตื่นเต้นตกใจจากการใช้สาร THC ประโยชน์ของสาร CBD ในทางการแพทย์มีหลายประการ เช่น แก้อาการนอนไม่หลับ เพิ่มความอยากอาหาร บรรเทาอาการของโรคหลายชนิด เช่นโรคจิตเภท (Schizophrenia) โดยให้ผลข้างเคียงที่พบได้บ้างจากการใช้สาร CBD เช่น อุจจาระร่วง อ่อนเพลีย คลื่นไส้ [2]

ปัจจุบันรัฐบาลได้ปลดล็อกให้มีการใช้ประโยชน์จากกัญชาและกัญชา เพื่อประโยชน์ทางการแพทย์และเศรษฐกิจ ซึ่งการปลดล็อกนี้หมายถึงการอนุญาตให้ใช้ประโยชน์ได้ภายใต้กรอบกฎหมาย โดยกระทรวงสาธารณสุขได้ออกประกาศกระทรวงฯ เรื่อง ระบุชื่อยาเสพติดให้โทษในประเภท 5 (ฉบับที่ 2) เมื่อวันที่ 15 ธันวาคม 2563 ให้บางส่วนของกัญชาและกัญชาไม่จัดเป็นยาเสพติด [3-4] ดังนั้นผลิตภัณฑ์ที่มีส่วนประกอบของกัญชาและกัญชาจึงเป็นที่แพร่หลายเพิ่มมากขึ้น การตรวจสอบปริมาณสาร THC และสาร CBD จึงมีบทบาทสำคัญในการควบคุมคุณภาพผลิตภัณฑ์ที่มีส่วนประกอบของกัญชาและกัญชา โดยเฉพาะผลิตภัณฑ์อาหารและเครื่องดื่มที่ปัจจุบันได้มีประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 424) พ.ศ. 2564 เรื่อง กำหนดอาหารที่ห้ามผลิต นำเข้า หรือจำหน่าย มีสาระสำคัญคือ อนุญาตให้ใช้ส่วนของกัญชาและกัญชาที่ไม่เป็นยาเสพติดในผลิตภัณฑ์อาหารได้ [5] และประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 425) พ.ศ. 2564 เรื่อง เมล็ดกัญชา น้ำมันจากเมล็ดกัญชา โปรตีนจากเมล็ดกัญชา และผลิตภัณฑ์อาหารที่มีส่วนประกอบของเมล็ดกัญชา น้ำมันจากเมล็ดกัญชา

หรือโปรตีนจากเมล็ดกัญชา มีสาระสำคัญคือ ให้เมล็ดกัญชา น้ำมันจากเมล็ดกัญชา โปรตีนจากเมล็ดกัญชา และผลิตภัณฑ์อาหารที่มีส่วนประกอบของเมล็ดกัญชา หรือน้ำมันจากเมล็ดกัญชา หรือโปรตีนจากเมล็ดกัญชา เป็นอาหารควบคุมเฉพาะ โดยสามารถใช้เมล็ดกัญชา และโปรตีนจากเมล็ดกัญชา ในผลิตภัณฑ์อาหารได้โดยมีการควบคุมปริมาณการปนเปื้อนของสาร THC และสาร CBD ซึ่งขึ้นอยู่กับชนิดอาหาร รวมทั้งควบคุมคุณภาพและมาตรฐานของเมล็ดกัญชา น้ำมันจากเมล็ดกัญชา และโปรตีนจากเมล็ดกัญชาอีกด้วย [6] นอกจากนี้ยังมีประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 427) พ.ศ. 2564 เรื่อง ผลิตภัณฑ์อาหารที่มีส่วนประกอบของส่วนของกัญชาหรือกัญชามีสาระสำคัญคือ ให้ผลิตภัณฑ์อาหารที่มีส่วนประกอบของส่วนของกัญชาหรือกัญชามีเป็นอาหารควบคุมเฉพาะ และห้ามมิให้ผลิต นำเข้า หรือจำหน่าย ผลิตภัณฑ์อาหารที่มีส่วนประกอบของส่วนของกัญชาหรือกัญชา ดังต่อไปนี้ (1) อาหารทารกและอาหารสูตรต่อเนื่องสำหรับทารกและเด็กเล็ก (2) นมดัดแปลงสำหรับทารกและนมดัดแปลงสูตรต่อเนื่องสำหรับทารกและเด็กเล็ก (3) อาหารเสริมสำหรับทารกและเด็กเล็ก (4) เครื่องดื่มที่ผสมกาเฟอีน (5) อาหารอื่นที่รัฐมนตรีประกาศกำหนด [7] โดยตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 428) พ.ศ. 2564 เรื่อง มาตรฐานอาหารที่มีสารปนเปื้อนชนิดสารเตตราไฮโดรแคนนาบินอยด์และสารแคนนาบินไดโอดอล ได้กำหนดปริมาณตกค้างสูงสุดคือ ไม่พบ ในหน่วย มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ในอาหารทารกและอาหารสูตรต่อเนื่องสำหรับทารกและเด็กเล็ก นมดัดแปลงสำหรับทารกและนมดัดแปลงสูตรต่อเนื่องสำหรับทารกและเด็กเล็ก อาหารเสริมสำหรับทารกและเด็กเล็กและเครื่องดื่มที่ผสมกาเฟอีน โดยมีการตรวจวิเคราะห์ได้น้อยกว่า 0.1 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมสำหรับ THC และ 0.2 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมสำหรับ CBD [8] และประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 429) พ.ศ. 2564 เรื่อง ผลิตภัณฑ์อาหารที่มีสารสกัดแคนนาบินไดโอดอลเป็นส่วนประกอบ มีสาระสำคัญคือ ให้ผลิตภัณฑ์อาหารที่มีสารสกัดแคนนาบินไดโอดอลเป็นส่วนประกอบ เป็นอาหารควบคุมเฉพาะ โดยมีการกำหนดคุณภาพหรือมาตรฐานของสารแคนนาบินไดโอดอลและสารเตตราไฮโดรแคนนาบินอยด์ในผลิตภัณฑ์อาหาร เช่น ผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร เครื่องดื่มแต่งกลิ่นรสอัดก๊าซและไม่อัดก๊าซ เฉพาะผลิตภัณฑ์พร้อมบริโภคเท่านั้น ยกเว้นผลิตภัณฑ์ในลักษณะเดียวกันที่มีส่วนประกอบของ ชา กาแฟ และกาเฟอีนทั้ง ธรรมชาติและสังเคราะห์ และเครื่องดื่มเกลือแร่ เครื่องดื่มจากธัญชาติเฉพาะผลิตภัณฑ์พร้อมบริโภคเท่านั้น ยกเว้น ชา กาแฟ ชาจากพืช และผลิตภัณฑ์ในลักษณะเดียวกัน [9] โดยปัจจุบันมีการปรับปรุงข้อกำหนดคุณภาพและมาตรฐานดังประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 438) พ.ศ. 2565 เรื่อง ผลิตภัณฑ์อาหารที่มีส่วนประกอบของส่วนของกัญชาหรือกัญชามี (ฉบับที่ 2) ซึ่งมีการควบคุมปริมาณ

CBD และ THC ในปริมาณที่แตกต่างกันโดยขึ้นอยู่กับชนิดอาหาร เช่น ผลิตภัณฑ์ปรุงรส ซอส น้ำปลา และเกลือ ที่กำหนดปริมาณที่แนะนำให้บริโภคต่อครั้ง ต้องมี THC ไม่เกิน 1.6 มิลลิกรัมต่อ 50 กรัม และ CBD ไม่เกิน 1.41 มิลลิกรัมต่อ 50 กรัม [10] นอกจากนี้ประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 439) พ.ศ. 2565 ได้ปรับปรุงแก้ไขเรื่อง ผลิตภัณฑ์อาหารที่มีสารสกัดแคนนาบิไดโอยด์เป็นส่วนประกอบ (ฉบับที่ 2) โดยกำหนดปริมาณในผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร CBD ไม่เกิน 55 มิลลิกรัมต่อวันและ THC ไม่เกิน 2 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือ มิลลิกรัมต่อลิตร และเครื่องดื่ม เช่น เครื่องดื่มจากธัญชาติ CBD ไม่เกิน 75 มิลลิกรัมต่อลิตรและ THC ไม่เกิน 0.15 มิลลิกรัมต่อลิตร [11] ดังนั้นการควบคุมคุณภาพและมาตรฐานของผลิตภัณฑ์อาหารจึงมีบทบาทสำคัญในการดูแลและคุ้มครองผู้บริโภค โดยเฉพาะการตรวจสอบหาปริมาณสาร THC และ CBD ปัจจุบันวิธีมาตรฐานเช่น AOAC เป็นวิธีที่ใช้ทดสอบหาปริมาณสารแคนนาบินอยด์ (Cannabinoids) ในพืช น้ำมัน และสารสกัด โดยเทคนิคไฮเพอร์ฟอร์แมนลิดโครมาโทกราฟี (High Performance Liquid Chromatography; HPLC) และลิดโครมาโทกราฟี แมสสเปกโตรเมตรี (Liquid Chromatography – Mass Spectrometry; LC-MS) [12-15] โดยมีการทดสอบสารกลุ่มแคนนาบินอยด์จำนวนมากถึง 17 ชนิด แต่ยังเป็นทดสอบในพืชกัญชาและกัญชง ที่ซึ่งใช้เทคนิคการสกัดแบบ Liquid-solid extraction [16] นอกจากนี้ได้มีการพัฒนาวิธีการทดสอบในอาหารของสารกลุ่มแคนนาบินอยด์ด้วยเทคนิค QuEChERS (Quick Easy Cheap Effective Rugged Safe) โดยทำการทดสอบในกลุ่มอาหารจำพวกเมล็ดธัญพืช โปรตีนจากกัญชง น้ำมันเมล็ดธัญพืช น้ำมันดิบและนมผง เป็นต้น และพบว่าได้มีการศึกษาในเมทริกซ์ของมายองเนสและกาแฟ แต่มีผลการทดสอบหนึ่งค่าที่ออกนอกช่วงการยอมรับ (ค่าร้อยละการคืนกลับ (%recovery) อยู่ที่ 122) [17] ในปี 2564 กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ได้มีการพัฒนาวิธีทดสอบสารกลุ่มแคนนาบินอยด์ในน้ำมันพริก โดยใช้การเตรียมตัวอย่างด้วย SPE Oasis HLB และให้ค่าร้อยละการคืนกลับอยู่ในช่วงร้อยละ 60 – 120 และมีการทำ Matrix-matched calibration curve เนื่องจากวิธีการทดสอบมีหลายขั้นตอน และยังมีข้อจำกัดในการเตรียมกราฟมาตรฐานที่ต้องเตรียมให้มีความใกล้เคียงกับลักษณะตัวอย่างที่จะทำการทดสอบ (Matrix-matched calibration curve) [18] โดยใช้เทคนิคเดียวกันนี้ในการสำรวจปริมาณสาร THC และสารแคนนาบินอยด์ที่เกี่ยวข้อง (เช่น CBD Cannabigerol (CBG) Cannabinol (CBN) เป็นต้น) ในผลิตภัณฑ์อาหาร เครื่องดื่ม และอาหารสัตว์ [19] นอกจากนี้พบว่ามีการใช้เทคนิคการเตรียมตัวอย่างแบบโตนิกซ์ชัน ซึ่งใช้การสันตะเหือนของคลื่นอัลตราโซนิกจึงอาจทำให้เกิดความร้อนที่อาจส่งผล

ให้เกิดการเปลี่ยนแปลงรูปแบบของสาร THC และสาร CBD รวมทั้งผลการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธียังให้ค่าร้อยละการคืนกลับของสาร THCA-A สูงถึงร้อยละ 206.3 และสาร CBDA อยู่ในช่วงร้อยละ 114.7-182.3 [20] จากข้อจำกัดของวิธีการทดสอบดังกล่าวงานวิจัยนี้จึงได้พัฒนาวิธีทดสอบสารแคนนาบินอยด์ที่ครอบคลุมตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข จำนวน 5 ชนิด ได้แก่ cannabidiol (CBD) (-)- Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC) (-)- Δ^8 -tetrahydrocannabinol (Δ^8 -THC) และ (-)-*trans*-delta-9-THC carboxylic acid A (THCA-A) ในตัวอย่างเครื่องดื่ม โดยใช้เทคนิคลิดโครมาโทกราฟี แทนเดมแมสสเปกโตรเมตรี (Liquid Chromatography – Tandem Mass Spectrometry; LC-MS/MS)

2. วิธีการวิจัย (Experimental methods)

2.1 สารเคมีและวัสดุวิทยาศาสตร์

สารมาตรฐาน Cannabidiol (CBD) (CAS No. 13956-29-1) มีความบริสุทธิ์อย่างน้อยร้อยละ 99.6 สารมาตรฐาน (-)- Δ^9 -Tetrahydrocannabinol (dronabinol) solution (Δ^9 -THC) (CAS No. 1972-08-3) ความบริสุทธิ์อย่างน้อยร้อยละ 97.0 สารมาตรฐาน (-)- Δ^8 -Tetrahydrocannabinol solution (Δ^8 -THC) (CAS No. 5957-75-5) ความบริสุทธิ์อย่างน้อยร้อยละ 97.0 และสารมาตรฐาน (-)-*trans*-delta-9-THC carboxylic acid A (THCA-A) (CAS No. 23978-85-0) ความบริสุทธิ์อย่างน้อยร้อยละ 97.0 สารมาตรฐานทั้งหมดผลิตโดย Lipomed ส่วนสารมาตรฐานภายใน (Internal standard) มี 2 ชนิด คือ สารมาตรฐานภายใน Cannabidiol- D_3 (CBD- D_3) (CAS No. N/A) ความบริสุทธิ์อย่างน้อยร้อยละ 98.5 และสารมาตรฐานภายใน (-)- Δ^9 -Tetrahydrocannabinol- D_3 solution (Δ^9 -THC- D_3) (CAS No. 81586-39-2) ความบริสุทธิ์อย่างน้อยร้อยละ 96.0 สารมาตรฐานภายในทั้งหมดผลิตโดย Lipomed เช่นกัน เมทานอลและอะซิโตรไนโตรลส์ มีชั้นคุณภาพวิเคราะห์ HPLC หรือ LC ผลิตโดย Merck รวมทั้งแอมโมเนียมฟอร์มเมท (Ammonium formate, NH_4HCO_2) ชั้นคุณภาพวิเคราะห์ AR และ กรดฟอร์มิก (Formic acid, FA) ชั้นคุณภาพวิเคราะห์ LC-MS ผลิตโดย Sigma การเตรียมสารละลายต่างๆ ใช้น้ำที่มีความบริสุทธิ์สูง มีค่าความต้านทานไฟฟ้าไม่น้อยกว่า $18.2 M\Omega \cdot cm$ โดยใช้เครื่องกรองน้ำ รุ่น Smart2Pure บริษัท Thermo Scientific

2.2 สารละลายและวิธีเตรียม

2.2.1 สารละลายแอมโมเนียมฟอร์มเมท (วัฏภาคเคลื่อนที่มีความเข้มข้น 20 mM และ pH 3.2)

ซึ่ง NH_4HCO_2 จำนวน 1.26 ± 0.01 กรัม ลงในขวดแก้วปริมาตรขนาด 1000 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำที่

มีความบริสุทธิ์สูง แล้วปรับความเป็นกรด-ด่าง (pH) ด้วยกรดฟอสฟอริก ให้มี pH เท่ากับ 3.2 (โดยใช้เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง รุ่น Orion 2 Star บริษัท Thermo Scientific) แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำที่มีความบริสุทธิ์สูง จนถึงขีดปริมาตร

2.2.2 สารละลายมาตรฐาน CBD (Stock standard solution) ความเข้มข้น 1.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ซึ่งสารมาตรฐาน CBD 10 มิลลิกรัมแล้วบันทึกน้ำหนักที่แน่นอน ละลายด้วยเมทานอล ถ่ายลงในขวดแก้วปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร เติมนเมทานอลจนถึงขีดปริมาตร เก็บในขวดแก้วสีชาในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

2.2.3 สารละลายมาตรฐาน Δ^9 -THC (Intermediate standard solution) ความเข้มข้น 1.26 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ปิเปตต์สารมาตรฐาน Δ^9 -THC 100 ไมโครลิตรของสารละลายมาตรฐาน Δ^9 -THC ความเข้มข้น 10.26 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วปิเปตต์เมทานอล 900 ไมโครลิตร ลงในขวดแก้วสีชาปริมาตรขนาด 2 มิลลิลิตร เก็บในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

2.2.4 สารละลายมาตรฐาน Δ^8 -THC (Intermediate standard solution) ความเข้มข้น 0.94 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ปิเปตต์สารมาตรฐาน Δ^8 -THC 100 ไมโครลิตรของสารละลายมาตรฐาน Δ^8 -THC ความเข้มข้น 9.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วปิเปตต์เมทานอล 900 ไมโครลิตร ลงในขวดแก้วสีชาปริมาตรขนาด 2 มิลลิลิตร เก็บในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

2.2.5 สารละลายมาตรฐาน THCA-A (Stock standard solution) ความเข้มข้น 1.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ซึ่งสารมาตรฐาน THCA-A 10 มิลลิกรัมแล้วบันทึกน้ำหนักที่แน่นอน ละลายด้วยเมทานอล ถ่ายลงในขวดแก้วปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร เติมนเมทานอลจนถึงขีดปริมาตร เก็บในขวดแก้วสีชาในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

2.2.6 สารละลายมาตรฐานภายใน CBD-D₃ (Stock standard solution) ความเข้มข้น 1.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ซึ่งสารมาตรฐาน CBD-D₃ 10 มิลลิกรัมแล้วบันทึกน้ำหนักที่แน่นอน ละลายด้วยเมทานอล ถ่ายลงในขวดแก้วปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร เติมนเมทานอลจนถึงขีดปริมาตร เก็บในขวดแก้วสีชาในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

2.2.7 สารละลายมาตรฐานภายใน Δ^9 -THC-D₃ (Intermediate standard solution) ความเข้มข้น 1.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ปิเปตต์สารมาตรฐาน Δ^9 -THC-D₃ 100 ไมโครลิตรของสารละลายมาตรฐาน Δ^9 -THC-D₃ ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วปิเปตต์เมทานอล 900 ไมโครลิตร ลงในขวดแก้วปริมาตรขนาด 2 มิลลิลิตร เก็บในขวดแก้วสีชาในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

2.3 การเตรียมสารละลายมาตรฐานผสม CBD เพื่อใช้สร้างกราฟมาตรฐาน

2.3.1 สารละลายมาตรฐานผสมของ CBD Δ^9 -THC Δ^8 -THC และ THCA-A ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ปิเปตต์สารละลายมาตรฐาน CBD ความเข้มข้น 1.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 100 ไมโครลิตร Δ^9 -THC ความเข้มข้น 1.26 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 100 ไมโครลิตร Δ^8 -THC ความเข้มข้น 0.94 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 100 ไมโครลิตร THCA-A ความเข้มข้น 1.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 100 ไมโครลิตร ลงในขวดแก้วปริมาตร 10 มิลลิลิตร เติมนเมทานอลจนถึงขีดปริมาตร

2.3.2 สารละลายมาตรฐานภายในผสมของ CBD-D₃ และ Δ^9 -THC-D₃ ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ปิเปตต์สารละลายมาตรฐาน CBD-D₃ ความเข้มข้น 1.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 100 ไมโครลิตร Δ^9 -THC-D₃ ความเข้มข้น 1.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 100 ไมโครลิตร ลงในขวดแก้วปริมาตร 10 มิลลิลิตร เติมนเมทานอลจนถึงขีดปริมาตร

2.3.3 สารละลายมาตรฐานผสม CBD Δ^9 -THC Δ^8 -THC และ THCA-A ความเข้มข้น 0 0.1 0.5 1.0 2.5 5.0 และ 9.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ปิเปตต์สารละลายมาตรฐานผสม CBD Δ^9 -THC Δ^8 -THC และ THCA-A ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ข้อ 2.3.1) จำนวน 0 10 50 100 250 500 และ 1000 ไมโครลิตร ตามลำดับ ลงในขวดแก้วสีชาสำหรับฉีดเข้ากับเครื่อง LC-MS/MS ขนาด 2 มิลลิลิตร เติมนสารละลายมาตรฐานภายในผสม CBD-D₃ และ Δ^9 -THC-D₃ ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ข้อ 2.3.2) จำนวน 50 ไมโครลิตร เติมนเมทานอลจำนวน 950 900 850 700 450 และ 0 ไมโครลิตร ตามลำดับ โดยมีรายละเอียดดังตารางที่ 1 และต้องคำนวณความเข้มข้นที่แน่นอนของแต่ละสารมาตรฐาน

ตารางที่ 1 การเตรียมกราฟมาตรฐานผสม CBD Δ 9-THC Δ 8-THC และ THCA-A

ระดับของกราฟมาตรฐาน	ความเข้มข้น (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	ปริมาตรของสารละลายมาตรฐาน (ไมโครลิตร)	ปริมาตรของเมทานอล (ไมโครลิตร)	ปริมาตรของสารละลายมาตรฐานภายในผสม (ไมโครลิตร)
1	0	0	950	50
2	0.5	50	900	50
3	1.0	100	850	50
4	2.5	250	700	50
5	5.0	500	450	50
6	9.5	950	0	50

2.4 การเตรียมตัวอย่าง

ซึ่งตัวอย่างประมาณ 1-5 กรัม แล้วบันทึกน้ำหนักที่แน่นอน โดยตัวอย่างที่ใช้ในการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีคือ เครื่องดื่มน้ำผสมวิตามิน และเติมสารมาตรฐานภายในผสมข้อ 2.3.2 CBD-D₃ และ Δ 9-THC-D₃ จำนวน 500 ไมโครลิตร เพื่อให้มีระดับความเข้มข้นเท่ากับที่เติมในสารมาตรฐานข้อ 2.3.3 และเติมเมทานอลเพื่อเจือจางให้ได้ระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับตรวจวัดด้วย LC-MS/MS แล้วปรับปริมาตรด้วยเมทานอลเป็น 10 มิลลิลิตร (หากตัวอย่างมีปริมาณสารที่สนใจในปริมาณมากสามารถเจือจางได้ตามความเหมาะสม) หลังจากนั้นหากมีตะกอนเกิดขึ้นในสารละลายตัวอย่างให้นำเข้าเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3000 g เวลา 5 นาทีและกรองผ่านแผ่นเมมเบรนขนาด 0.20 หรือ 0.22 ไมโครเมตรลงในขวดแก้วขนาดเล็กสี่ขาสำหรับฉีดเข้าเครื่อง LC-MS/MS

2.5 การควบคุมคุณภาพ

การเตรียม Standard check สารละลายมาตรฐาน Cannabinoids โดยเลือกเตรียมที่ระดับความเข้มข้น 1 ระดับจาก 2.5 หรือ 5.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งเตรียมเช่นเดียวกันกับข้อ 2.3.1 และกรองผ่านแผ่นเมมเบรนขนาด 0.20 หรือ 0.22 ไมโครเมตรลงในขวดขนาดเล็กสำหรับฉีดเข้ากับเครื่อง LC-MS/MS

2.6 การตรวจวัดด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรเมตรี

2.6.1 นำสารละลายมาตรฐานผสม CBD Δ 9-THC Δ 8-THC และ THCA-A ที่ความเข้มข้นระหว่าง 0.5 ถึง 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเมทานอลที่กรองผ่านแผ่นเมมเบรน ขนาด 0.20 หรือ 0.22 ไมโครเมตร ลงในขวดขนาดเล็กสี่ขา ฉีดเข้าเครื่อง LC-MS/MS รุ่น Agilent 1290/6460 บริษัท Agilent Technologies ตามสภาวะเครื่อง LC-MS/MS ที่เหมาะสมในการทดสอบ Cannabinoids ตาม AOAC (2020) 2018.11 [21] ดังนี้

คอลัมน์:	คอลัมน์ LC-MS/MS ชนิด stainless steel ขนาด 2.1 x 150 มิลลิเมตร และการดัดคอลัมน์ 2.1 x 5 มิลลิเมตร บรรจุด้วย C18 ขนาดอนุภาค 2.0 ไมโครเมตร (Supelco Ascentis Express C18)
อุณหภูมิคอลัมน์:	25 องศาเซลเซียส
ปริมาตรที่ฉีด:	3 ไมโครลิตร
วัฏภาคเคลื่อนที่และอัตราการไหล:	ตามตารางที่ 2
เครื่องตรวจวัด:	MS detector ตามตารางที่ 3

ตารางที่ 2 วัฏภาคเคลื่อนที่และอัตราการไหล

เวลา (นาที)	A, % 20 mM NH ₄ HCO ₂ , pH 3.2	B, % ACN	อัตราการไหล (มิลลิลิตรต่อนาที)
0.00	40	60	0.400
12.00	5	95	0.400
12.01	5	95	0.600
14.00	5	95	0.600
14.01	40	60	0.400
16.00	40	60	0.400

ตารางที่ 3 สภาวะของเครื่อง MS detector

Analytes	Retention time (RT; min)	MRM traces		Fragment energy (Frag; V)	Collision energy (CE; V)
		Precursor ion (MS1)	Product ion (MS2)		
CBD	5.504	315.3	193.2	88	20
		315.3	135.0	88	20
		315.3	259.1	88	20
Δ ⁹ -THC	8.219	315.3	193.1	88	20
		315.3	123.0	88	20
		315.3	259.1	88	20
Δ ⁸ -THC	8.398	315.3	193.2	88	20
		315.3	123.0	88	20
		315.3	259.1	88	20
THCA-A	8.580	359.2	341.2	85	25
		359.2	219.1	85	25
			261.2	85	25
CBD-D ₃	5.482	318.3	196.1	85	20
Δ ⁹ -THC-D ₃	8.188	318.3	196.1	85	20

2.6.2 ตรวจสอบสมรรถนะของเครื่อง LC-MS/MS โดยการฉีดสารมาตรฐานที่ระดับความเข้มข้น 1 ระดับเลือกจาก 2.5 หรือ 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวนอย่างน้อย 3 ซ้ำ เพื่อกำหนดค่า System suitability ตาม US Pharmacopoeia โดยมีเกณฑ์การยอมรับดังนี้

- ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (Relative Standard Deviation; RSD) of area < 2%
- RSD of RT < 2%

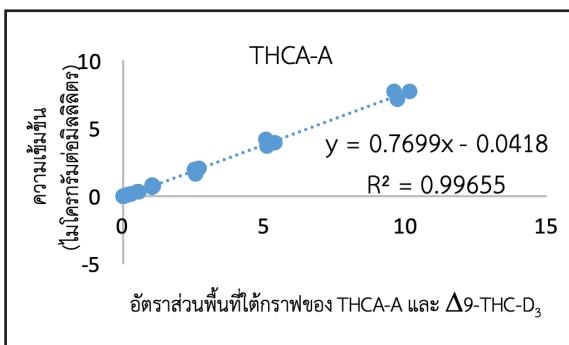
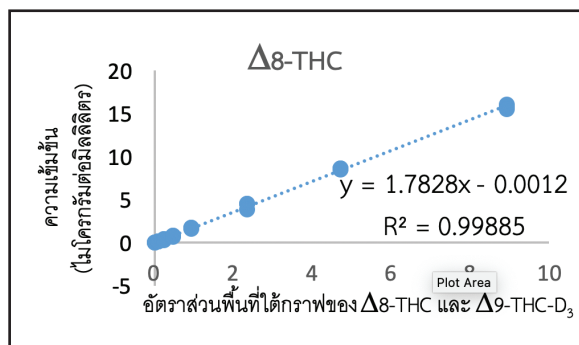
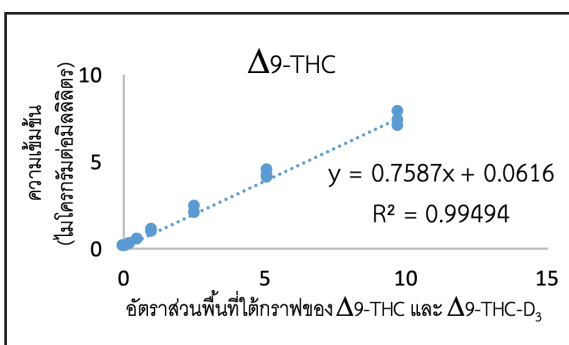
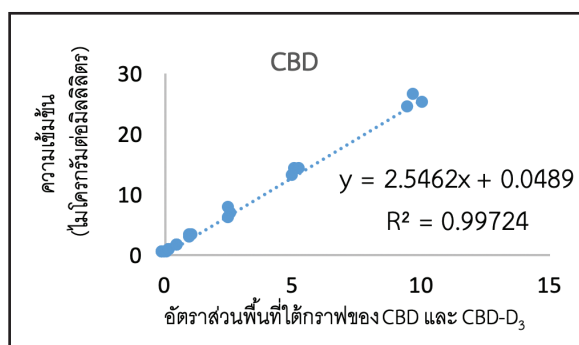
2.7 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี โดยดำเนินการตาม In-house method based on AOAC (2020) 2018.11 [21]

การทดสอบตัวอย่างแบบลบล้างหรือตัวอย่างน้ำผสมวิตามิน (Blank sample) และตัวอย่างที่มีการเติมสารละลายมาตรฐาน (Spiked sample) ที่ระดับความเข้มข้นต่ำ ๆ หรือใกล้เคียงศูนย์ จำนวน 10 ซ้ำ เพื่อประมาณค่าขีดจำกัดของการตรวจพบและขีดจำกัดของการหาปริมาณ ซึ่งในที่นี้ทำการเติมที่ระดับความเข้มข้น 0.10 และ 0.50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และเตรียมตัวอย่างที่เติมสารมาตรฐานอีก 2 ระดับความเข้มข้น คือ 50 และ 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เพื่อทดสอบความเข้มข้นที่ระดับกลางและสูงของช่วงการวัด แล้วคำนวณร้อยละการคืนกลับและค่าความเบี่ยงเบนสัมพัทธ์เพื่อพิสูจน์ความถูกต้องและความเที่ยงของวิธีทดสอบ นอกจากนี้ได้ดำเนินการทดสอบช่วงความเป็นเส้นตรง โดยทดสอบที่ความเข้มข้น 7 ระดับ ดังนี้ 0 0.10 0.50 1.00 2.50 5.00 และ 10.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และระดับความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ

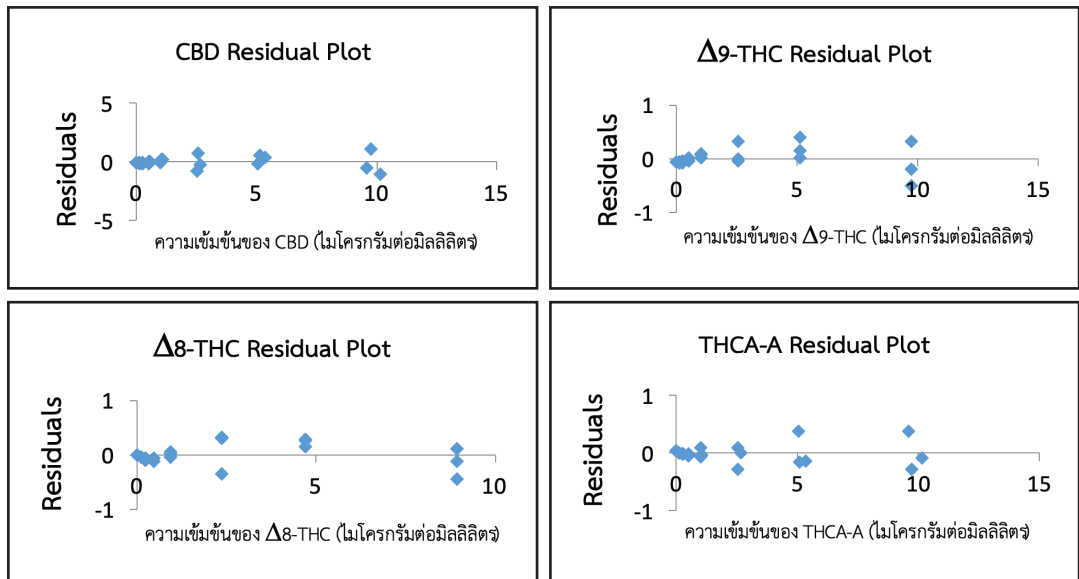
3. ผลและวิจารณ์ (Results and discussion)

3.1 การทดสอบความเป็นเส้นตรง (Linearity) ของสารมาตรฐาน Cannabinoids

ศึกษาโดยการทดสอบสารมาตรฐานที่ 7 ระดับความเข้มข้น ดังนี้ 0 0.10 0.50 1.00 2.50 5.00 และ 10.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ระดับความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ ได้กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารที่สนใจ และพื้นที่ใต้กราฟซึ่งตรวจวัดด้วยดีเทคเตอร์ ชนิด MS detector ดังรูปที่ 1 และรูปที่ 2 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารที่สนใจและการตกค้าง (Residual)



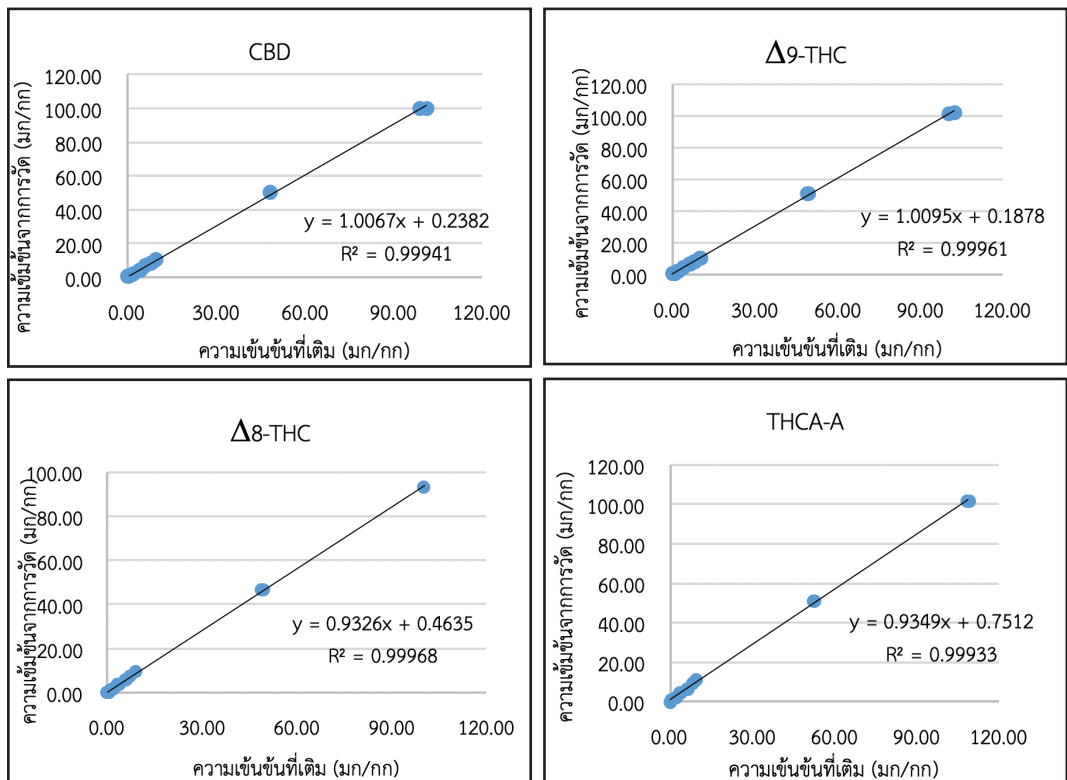
รูปที่ 1 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ CBD Δ9-THC Δ8-THC THCA-A และพื้นที่ใต้กราฟซึ่งตรวจวัดด้วยดีเทคเตอร์ ชนิด MS detector



รูปที่ 2 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ CBD Δ9-THC Δ8-THC THCA-A และการตกค้าง (residual)

3.2 การทดสอบช่วงการใช้งาน (Working range) ในเครื่องตีมน้ำผสมวิตามิน

ศึกษาโดยทดสอบตัวอย่างแบบลงค์ และตัวอย่างที่เดิมสารมาตรฐานในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ดังนี้ 0.10 0.50 1.00 2.00 4.00 6.00 8.00 10.0 50.0 และ 100.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ระดับความเข้มข้นละ 2 ซ้ำ โดยมีเกณฑ์การยอมรับในช่วงของค่าร้อยละการคืนกลับ CBD เท่ากับร้อยละ 91.28 – 104.93 Δ9-THC เท่ากับร้อยละ 84.37 – 103.74 Δ8-THC เท่ากับร้อยละ 84.35 – 107.48 และ THCA-A เท่ากับร้อยละ 84.66 – 107.11 รูปที่ 3 แสดงช่วงการใช้งานของการตรวจวัดสารที่สนใจระหว่างความสัมพันธ์ของความเข้มข้นที่เดิมและค่าที่วัดได้ในหน่วย มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม



รูปที่ 3 กราฟแสดงช่วงการใช้งานของการตรวจวัด CBD Δ9-THC Δ8-THC และ THCA-A ระหว่างความสัมพันธ์ของความเข้มข้นที่เดิมและค่าที่วัดได้ ในหน่วย มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

3.3 การหาขีดต่ำสุดที่ตรวจวัดได้ (Limit of Detection; LOD) และขีดจำกัดของการหาปริมาณ (Limit of Quantitation; LOQ)

ศึกษาโดยทดสอบตัวอย่างแบบลงค์ จำนวน 10 ซ้ำ และตัวอย่างที่เติมสารมาตรฐานที่ระดับความเข้มข้นต่ำ คือ 0.10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม จำนวน 10 ซ้ำ ดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ผลการทดสอบ CBD Δ 9-THC Δ 8-THC และ THCA-A ของตัวอย่างแบบลงค์และตัวอย่างที่เติมสารมาตรฐานที่ระดับ 0.10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

ลำดับ	ตัวอย่าง แบบลงค์	ปริมาณที่ตรวจวัดได้ มิลลิกรัม/กิโลกรัม				ค่าร้อยละการคืนกลับ (Recovery, %)			
			Δ 9-THC	Δ 8-THC	THCA-A	CBD	Δ 9-THC	Δ 8-THC	THCA-A
1	ไม่พบ	0.101	0.095	0.081	0.084	95.5	91.4	84.4	81.8
2	ไม่พบ	0.108	0.096	0.082	0.088	103.0	92.4	86.2	85.7
3	ไม่พบ	0.095	0.097	0.083	0.085	90.7	92.8	87.2	83.2
4	ไม่พบ	0.105	0.106	0.089	0.086	101.2	102.5	93.8	84.3
5	ไม่พบ	0.108	0.106	0.088	0.085	103.5	101.9	92.7	81.2
6	ไม่พบ	0.096	0.106	0.099	0.088	93.2	101.4	103.7	84.7
7	ไม่พบ	0.101	0.105	0.091	0.095	98.5	101.4	95.6	90.9
8	ไม่พบ	0.108	0.109	0.096	0.089	104.7	104.8	101.1	86.6
9	ไม่พบ	0.099	0.096	0.088	0.089	97.9	91.7	92.4	86.0
10	ไม่พบ	0.109	0.108	0.089	0.089	107.0	104.2	92.4	86.1
	ค่าเฉลี่ย	0.103	0.102	0.089	0.088				
	SD	0.005	0.006	0.006	0.003				
	S ₀	0.004	0.004	0.004	0.002				
	LOD	0.011	0.012	0.012	0.007				
	LOQ	0.038	0.040	0.041	0.022				

จากการคำนวณตามสูตร Eurachem guide: The fitness for purpose of analytical methods, 2014 [22] และตรวจสอบความถูกต้องและความเที่ยง พบว่าค่า LOD มีระดับความเข้มข้นที่ 0.010 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และ LOQ ที่ระดับ 0.10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ซึ่งมีค่าร้อยละการคืนกลับอยู่ระหว่าง CBD: 90.7 – 107.0 Δ 9-THC: 91.4 – 104.8 Δ 8-THC: 84.4 – 103.7 และ THCA-A: 81.2 – 90.9 เป็นไปตามเกณฑ์การยอมรับ 80 - 110%

3.4 ความถูกต้อง (Accuracy) และความเที่ยง (Precision)

การตรวจสอบความถูกต้องและความเที่ยงที่ 3 ระดับความเข้มข้น (ต่ำ กลาง และสูง) ดังนี้ 0.10 50 และ 100 มิลลิกรัม ต่อกิโลกรัม จำนวน 10 - 11 ซ้ำ โดยผลการทดสอบดังตารางที่ 5 พบว่า ค่าร้อยละการคืนกลับหรือ %recovery มีในช่วงเกณฑ์การยอมรับ คือ 80 - 110% และ %RSDR (Relative Standard Deviation of Reproducibility) ไม่เกิน 16% ตาม 2002/657/EC [23]

ตารางที่ 5 ผลการทดสอบ CBD Δ 9-THC Δ 8-THC และ THCA-A ของตัวอย่างแบลงค์และตัวอย่างที่เติมสารมาตรฐานที่ระดับ 0.10 50 และ 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

ชนิดของสาร	ความเข้มข้นที่เติม (มิลลิกรัม/กิโลกรัม)	ปริมาณที่ตรวจวัดได้ (\pm SD) (มิลลิกรัม/กิโลกรัม)	ค่าร้อยละการคืนกลับ (\pm SD) (%Recovery)	%RSD _R
CBD	0.10	0.103 (\pm 0.005)	99.52 (\pm 5.28)	5.22
	50	49.65 (\pm 3.74)	98.35 (\pm 7.31)	7.49
	100	98.45 (\pm 9.70)	97.98 (\pm 9.41)	9.78
Δ 9-THC	0.10	0.102 (\pm 0.006)	98.45 (\pm 5.61)	5.47
	50	49.92 (\pm 1.87)	97.28 (\pm 3.63)	3.73
	100	99.01 (\pm 7.51)	96.90 (\pm 7.01)	7.53
Δ 8-THC	0.10	0.089 (\pm 0.006)	92.95 (\pm 6.17)	6.48
	50	47.19 (\pm 2.17)	100.35 (\pm 4.74)	4.60
	100	93.58 (\pm 6.05)	99.98 (\pm 6.43)	6.45
THCA-A	0.10	0.087 (\pm 0.003)	85.05 (\pm 2.76)	3.59
	50	50.68 (\pm 1.99)	99.13 (\pm 4.06)	3.93
	100	102.54 (\pm 4.43)	100.76 (\pm 4.34)	4.32

วิธีที่พัฒนาขึ้นนี้ตาม In-house method based on AOAC (2020) 2018.11 [21] พบว่า มีขีดจำกัดของการตรวจพบเท่ากับ 0.010 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และขีดจำกัดของการหาปริมาณ เท่ากับ 0.10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ซึ่งมีค่าสูงกว่าการหาสารกลุ่มแคนนาบินอยด์ในน้ำมะพร้าวที่พัฒนาวิธีโดยกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ [18] ที่มีค่ามีขีดจำกัดของการตรวจพบ และขีดจำกัดของการหาปริมาณ เท่ากับ 0.002 และ 0.003 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ แต่วิธีที่พัฒนาขึ้นนี้มีความถูกต้องที่แสดงด้วยค่าร้อยละการคืนกลับที่ใกล้เคียงกับร้อยละ 100 และความเที่ยงที่แสดงด้วยค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ที่ไม่เกินร้อยละ 10 ดังนั้นวิธีที่พัฒนาขึ้นนี้จึงมีความเหมาะสมเป็นไปตามที่กฎหมายกำหนด [8] ในการใช้หาปริมาณสารกลุ่มแคนนาบินอยด์ในเครื่องดื่มได้เช่นกัน

3.5 การทดสอบในตัวอย่างเครื่องดื่ม

วิธีทดสอบ In-house method based on AOAC (2020) 2018.11 [21] ได้นำมาใช้ในการทดสอบในตัวอย่างเครื่องดื่มจำนวน 5 ตัวอย่าง พบว่า CBD มีค่าอยู่ในช่วง ไม่พบ ถึง 1.35 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และ Δ 9-THC มีค่าอยู่ในช่วง ไม่พบถึง 4.10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม สำหรับ Δ 8-THC ในทุกตัวอย่างมีค่าเท่ากับ ไม่พบ มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และ THCA-A มีค่าอยู่ในช่วง ไม่พบ ถึง 1.11 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม โดยมีค่าร้อยละการคืนกลับอยู่ในเกณฑ์การยอมรับ 80 - 110 [23]

4. สรุป (Conclusion)

การศึกษาวิธีหาปริมาณสารแคนนาบินอยด์ในตัวอย่างเครื่องดื่มจากกัญชง ดำเนินการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีพบว่าวิธีทดสอบ In-house method based on AOAC (2020) 2018.11 [21] มีความถูกต้องอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับ โดยให้ค่าร้อยละการคืนกลับเฉลี่ยสำหรับ CBD ร้อยละ 99.5 98.4 และ 98.0 Δ 9-THC ร้อยละ 98.4 97.3 และ 96.9 Δ 8-THC ร้อยละ 93.0 100.4 และ 100.0 THCA-A ร้อยละ 85.0 99.1 และ 100.8 ที่ระดับความเข้มข้น 0.10 50 และ 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ และความเที่ยง แสดงด้วยค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ โดยค่าเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 3.59 – 9.78 นอกจากนี้ขีดจำกัดของการตรวจพบ เท่ากับ 0.010 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และขีดจำกัดของการหาปริมาณ 0.10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม โดยปริมาณสารแคนนาบินอยด์ที่ตรวจพบในตัวอย่างอยู่ในช่วง ไม่พบ ถึง 4.10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

5. กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgement)

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากกรมวิทยาศาสตร์บริการ ปีงบประมาณ 2564-2565

6. เอกสารอ้างอิง (References)

- [1] กัญชง-กัญชา และประวัติความเป็นมา [อินเทอร์เน็ต]. [ม.ป.ป.] [เข้าถึงเมื่อ 17 กรกฎาคม 2564]. เข้าถึงได้จาก: <https://www.oncb.go.th/ncsmi/hemp7/กัญชง-กัญชา.pdf>
- [2] คำแนะนำสำหรับแพทย์ การใช้กัญชาทางการแพทย์ [อินเทอร์เน็ต]. 2562 [เข้าถึงเมื่อ 1 สิงหาคม 2565]. เข้าถึงได้จาก: https://tmc.or.th/pdf/fact/guideline_cannabis_101062.pdf
- [3] เรื่องนำรู้กัญชาทางการแพทย์ กัญชงพืชเศรษฐกิจ [อินเทอร์เน็ต]. 2564 [เข้าถึงเมื่อ 1 สิงหาคม 2565]. เข้าถึงได้จาก: https://mnfda.fda.moph.go.th/narcotic/wp-content/uploads/2021/06/Ebook64_AW1CNB-Hemp.pdf
- [4] กระทรวงสาธารณสุข. ประกาศเรื่อง ระบุชื่อยาเสพติดให้โทษในประเภท 5 พ.ศ. 2563 [อินเทอร์เน็ต]. 2563 [เข้าถึงเมื่อ 15 สิงหาคม 2565]. เข้าถึงได้จาก: http://www.ratchakitcha.soc.go.th/DATA/PDF/2563/E/290/T_0033.PDF
- [5] กระทรวงสาธารณสุข. ประกาศ (ฉบับที่ 424) พ.ศ. 2564 เรื่อง กำหนดอาหารที่ห้ามผลิต นำเข้า หรือจำหน่าย [อินเทอร์เน็ต]. 2564 [เข้าถึงเมื่อ 22 สิงหาคม 2565]. เข้าถึงได้จาก: http://www.ratchakitcha.soc.go.th/DATA/PDF/2564/E/045/T_0032.PDF
- [6] กระทรวงสาธารณสุข. ประกาศ (ฉบับที่ 425) พ.ศ. 2564 เรื่อง เมล็ดกัญชง น้ำมันจากเมล็ดกัญชง โปรตีนจากเมล็ดกัญชง และผลิตภัณฑ์อาหาร ที่มีส่วนผสมของเมล็ดกัญชง น้ำมันจากเมล็ดกัญชง หรือโปรตีนจากเมล็ดกัญชง [อินเทอร์เน็ต]. 2564 [เข้าถึงเมื่อ 22 สิงหาคม 2565]. เข้าถึงได้จาก: <https://ratchakitcha2.soc.go.th/pdfdownload/?id=17159442>
- [7] กระทรวงสาธารณสุข. ประกาศ (ฉบับที่ 427) พ.ศ. 2564 เรื่อง ผลิตภัณฑ์อาหารที่มีส่วนผสมของส่วนของกัญชาหรือกัญชง [อินเทอร์เน็ต]. 2564 [เข้าถึงเมื่อ 22 สิงหาคม 2565]. เข้าถึงได้จาก: http://www.ratchakitcha.soc.go.th/DATA/PDF/2564/E/168/T_0022.PDF
- [8] กระทรวงสาธารณสุข. ประกาศ (ฉบับที่ 428) พ.ศ. 2564 เรื่อง มาตรฐานอาหารที่มีสารปนเปื้อนชนิดสารเตตราไฮโดรแคนนาบินอลและสารแคนนาบินไดออล [อินเทอร์เน็ต]. 2564 [เข้าถึงเมื่อ 22 สิงหาคม 2565]. เข้าถึงได้จาก: http://www.ratchakitcha.soc.go.th/DATA/PDF/2564/E/168/T_0025.PDF
- [9] กระทรวงสาธารณสุข. ประกาศ (ฉบับที่ 429) พ.ศ. 2564 เรื่อง ผลิตภัณฑ์อาหารที่มีสารสกัดแคนนาบินไดออลเป็นส่วนประกอบ [อินเทอร์เน็ต]. 2564 [เข้าถึงเมื่อ 22 สิงหาคม 2565]. เข้าถึงได้จาก: <https://ratchakitcha2.soc.go.th/pdfdownload/?id=138D198S00000000000900>
- [10] กระทรวงสาธารณสุข. ประกาศ (ฉบับที่ 438) พ.ศ. 2565 เรื่อง ผลิตภัณฑ์อาหารที่มีส่วนผสมของส่วนของกัญชาหรือกัญชง (ฉบับที่ 2) [อินเทอร์เน็ต]. 2565 [เข้าถึงเมื่อ 21 พฤศจิกายน 2565]. เข้าถึงได้จาก: <https://ratchakitcha2.soc.go.th/pdfdownload/?id=139D251S00000000003100>
- [11] กระทรวงสาธารณสุข. ประกาศ (ฉบับที่ 439) พ.ศ. 2565 เรื่อง ผลิตภัณฑ์อาหารที่มีสารสกัดแคนนาบินไดออลเป็นส่วนประกอบ (ฉบับที่ 2) [อินเทอร์เน็ต]. 2565 [เข้าถึงเมื่อ 21 พฤศจิกายน 2565]. เข้าถึงได้จาก: <https://ratchakitcha2.soc.go.th/pdfdownload/?id=139D251S00000000003400>

- [12] Vaclavik L, Benes F, Fenclova M, Hricko J, Krmela A, Svobodova V, et al. Quantitation of cannabinoids in cannabis dried plant materials, concentrates, and oils using liquid chromatography–diode array detection technique with optional mass spectrometric detection: Single-laboratory validation study, first action 2018.11. J AOAC Int. 2019;102:1822–33.
- [13] AOAC International. Cannabinoids in cannabis sativa dried flowers and oils. AOAC Official Method 2018.10. New York: AOAC Publication; 2020.
- [14] AOAC International Standard method performance requirements (SMPRs) for quantitation of cannabinoids in cannabis concentrates. AOAC SMPR® 2017.001 [Internet]. 2017 [cited 2022 Aug 24]. Available from: https://www.aoac.org/wp-content/uploads/2020/11/SMPR202017_001.pdf
- [15] AOAC International. Standard method performance requirements (SMPRs) for quantitation of cannabinoids in dried plant materials. AOAC SMPR® 2017.002 [Internet]. 2017 [cited 2022 Aug 24]. Available from: https://www.aoac.org/wp-content/uploads/2020/11/SMPR202017_002.pdf
- [16] Mcrae G, Melanson JE. Quantitative determination and validation of 17 cannabinoids in cannabis and hemp using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Anal Bioanal Chem. 2020;412:7381-93.
- [17] Christinat N, Savoy MC, Mottier P. Development, validation and application of a LC-MS/MS method for quantification of 15 cannabinoids in food. Food Chem. 2020;318:126469.
- [18] สกุลรัตน์ สมสันติสุข, อัจฉรี อินแก้ว, เสาวณีย์ วาจาสิทธิ์, สุวิมล หมวดหมีะ, ภัฏญารัตน์ เชื้อกุลชาติ, วิทวัส วังแก้วหิรัญ, และคณะ. การพัฒนาและทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์สารกลุ่มแคนนาบินอยด์ในน้ำมะพร้าว โดยเทคนิค LC-MS/MS. วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. 2564;63:556–70.
- [19] Pisciotto IDM, Guadagnuolo G, Soprano V, Esposito M, Gallo P. A survey of Δ^9 -THC and relevant cannabinoids in products from the Italian market: A study by LC–MS/MS of food, beverages and feed. Food Chem. 2021;346:128898.
- [20] Meng Q, Buchanan B, Zuccolo J, Poulin MM, Gabriele J, Baranowski DC. A reliable and validated LC-MS/MS method for the simultaneous quantification of 4 cannabinoids in 40 consumer products. PloS One. 2018;13:e0196396.
- [21] AOAC International. Quantitation of cannabinoids in Cannabis dried plant materials, concentrates, and oils. AOAC Official Method 2018.11. New York: AOAC Publication; 2020.
- [22] Magnusson B, Örnemark U, editors. Eurachem guide: The fitness for purpose of analytical methods – A laboratory guide to method validation and related topics. 2nd ed. [place unknown]: [publisher unknown]; 2014.
- [23] European Commission. Commission decision of 12 August 2002 implementing council directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results (2002/657/EC) [Internet]. 2002 [cited 2022 Aug 24]. Available from: <https://op.europa.eu/en/publication-detail/-/publication/ed928116-a955-4a84-b10a-cf7a82bad858/language-en>