

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 วัสดุและอุปกรณ์ในการทดลอง

1. หลอดทดลอง
2. ปีกเกอร์
3. กระบอกตวง
4. หลอดหยด
5. โกร่ง
6. spatula
7. ขวดแยม
8. กระชอนาฬิกา
9. Thin Layer Chromatography (TLC) silica gel 60 F₂₅₄ 25 aluminium sheets 20×20
10. เครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge)
11. เครื่องชั่ง (balance)
12. โถดูดความชื้น (desiccator)

3.2 สารเคมีในการทดลอง

1. Methanol
2. Ethanol
3. Hexane
4. Diethyl ether
5. 0.1 M sodium hydroxide
6. Fast Blue B salt
7. Fast Red B salt
8. น้ำกลั่น
9. สารมาตรฐาน tetrahydrocannabinol (THC) Sigma® USA ความเข้มข้น 0.3 mg/ml

10. สารมาตรฐาน cannabidiol (CBD) Sigma® USA ความเข้มข้น 0.3 mg/ml

3.3 การเตรียมตัวอย่างพืช

3.3.1 กัญชาและกัญชง

นำตัวอย่างใบกัญชาสด จากพืชพันธุ์หลักฐาน จังหวัดแม่ฮ่องสอน และใบกัญชงสายพันธุ์ RPF₁ และ RPF₄ แบบสด อายุ 90 วัน จากสถานีเกษตรหลวงปางดะ ความสูง 720 เมตรจากระดับน้ำทะเลปานกลาง มาตากแดดให้แห้ง จากนั้นนำไปกัญชาและกัญชงที่แห้งแล้วมาอบที่อุณหภูมิ 60-70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง แล้วนำมาบดด้วยโม่ร่อนละเอียด เก็บใส่ในถุงซิปล็อกกันแสง ใส่ไว้ในโถดูดความชื้น (desiccator)

3.3.2 พืชอื่นๆ ทั่วไป

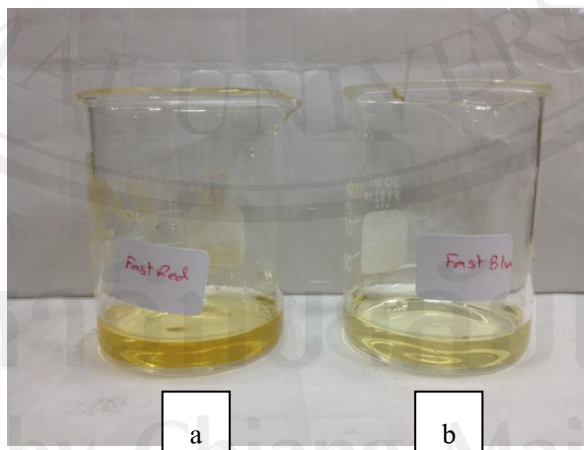
พืชอื่นๆ ทั่วไป ได้แก่ โหระพา ยี่ห่วย กระเพรา ยาสูบ ชา ออริกาโน หนุ่ยหวาน ใบเตย ดอกคำฝอย และ หอมแขก โดยนำมาตากแดดให้แห้ง แล้วอบที่อุณหภูมิ 60-70 องศาเซลเซียส จากนั้นบดให้ละเอียด ใส่ถุงซิปล็อก เก็บไว้ในโถดูดความชื้น

3.4 การเตรียมน้ำยาให้สี

3.4.1 สำหรับหยด

3.4.1.1 เตรียมสีน้ำยาให้สี Fast Blue B salt โดยชั่งผง Fast Blue B salt หนัก 25 มิลลิกรัม ละลายด้วยน้ำปริมาตร 10 มิลลิลิตร ได้สารละลายสีเหลือง ดังรูปที่ 3.1(b)

3.4.1.2 เตรียมสีน้ำยาให้สี Fast Red B salt โดยชั่งผง Fast Red B salt หนัก 34 มิลลิกรัม ละลายด้วยน้ำปริมาตร 10 มิลลิลิตร ได้สารละลายสีส้ม ดังรูปที่ 3.1 (a)

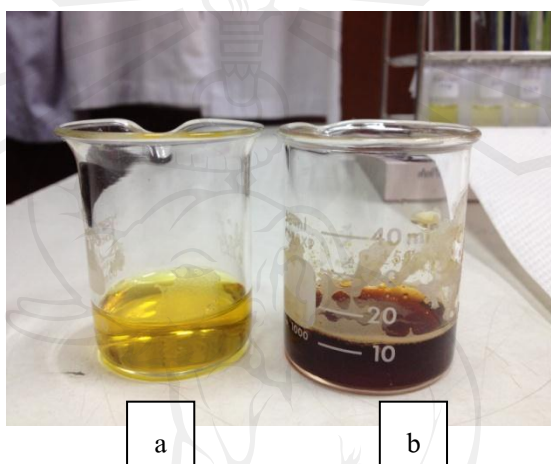


รูปที่ 3.1 น้ำยาให้สีสำหรับหยด Fast Red B salt (a) และ Fast Blue B salt (b)

3.4.2 สำหรับซ่อมแผ่น TLC

3.4.2.1 เตรียมน้ำยาให้สี Fast Blue B salt โดยชั่งผง Fast Blue B salt หนัก 50 มิลลิกรัม ละลายด้วย 0.1 M NaOH ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ได้สารละลายสีแดง ดังรูปที่ 3.2 (b)

3.4.2.2 เตรียมน้ำยาให้สี Fast Red B salt โดยชั่งผง Fast Red B salt หนัก 68 มิลลิกรัม ละลายด้วย 0.1 M NaOH ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ได้สารละลายสีเหลือง ดังรูปที่ 3.2 (a)



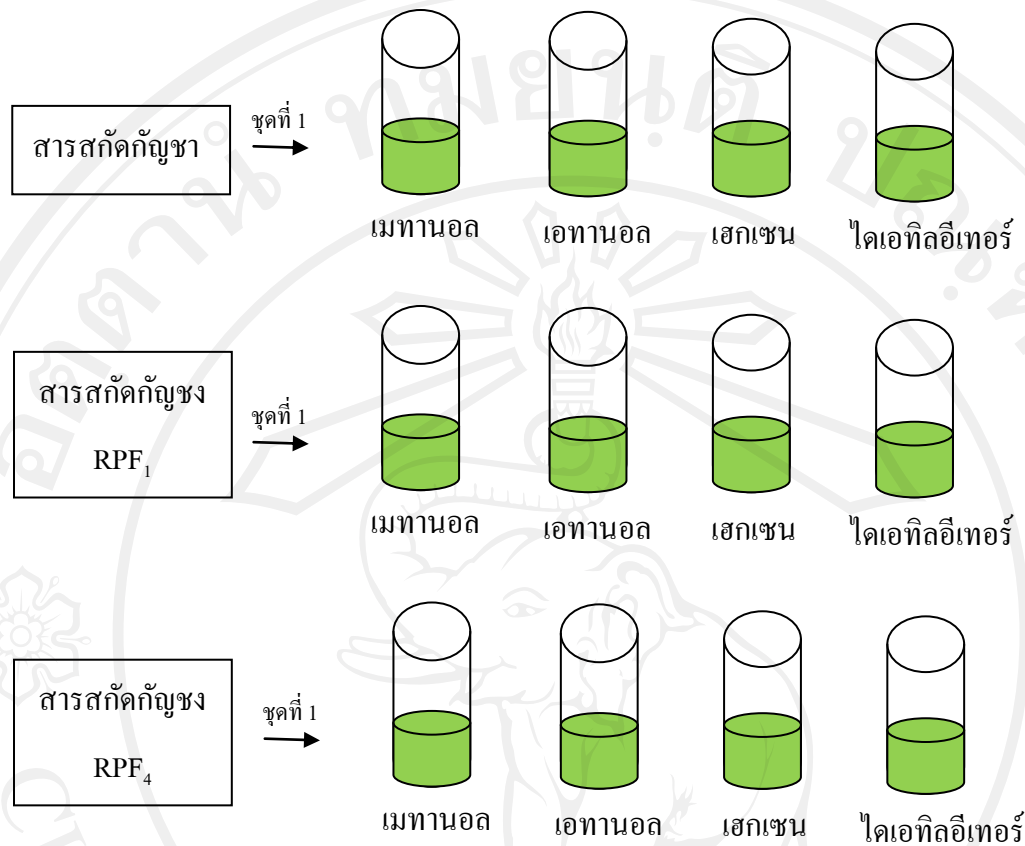
รูปที่ 3.2 น้ำยาให้สีสำหรับซ่อมแผ่น TLC Fast Red B salt (a) และ Fast Blue B salt (b)

3.5 การสกัด

3.5.1 ชั่งน้ำหนักกัญชา กัญชงสายพันธุ์ RPF₁ และ RPF₄ อย่างละ 0.5 กรัม ใส่ในหลอดทดลอง ตัวอย่างละ 4 หลอด

3.5.2 เติมน้ำทำละลายที่จะใช้ในการสกัด ได้แก่ เมทานอล เอทานอล เฮกเซน และ ไดเอทิลอีเทอร์ ทำละลายละ 5 มิลลิลิตร แล้วนำเข้าเครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge) เป็นเวลา 20 นาที

3.5.3 คูณสารสกัดด้วยออคทีปเปต ใส่ในหลอดทดลอง โดยแบ่งตัวอย่างละ 3 ชุดหลอดทดลอง โดยตัวอย่างการแบ่งสารสกัดกัญชา กัญชง RPF₁ และ RPF₄ ในหลอดทดลองชุดที่ 1 ดังรูปที่ 3.3 ส่วนในหลอดทดลองชุดที่ 2 และ 3 จะมีลักษณะเช่นเดียวกับในหลอดทดลองชุดที่ 1



รูปที่ 3.3 ตัวอย่างการแบ่งสารสกัดกัญชา กัญชา RPF₁ และ RPF₄
ในหลอดทดลองชุดที่ 1

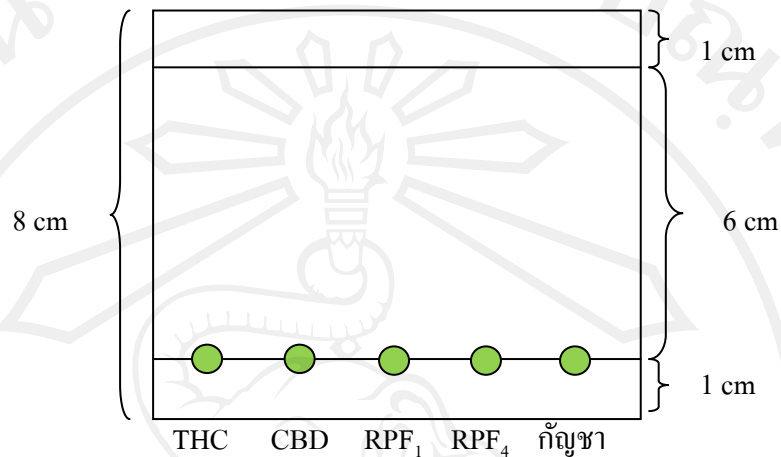
3.6 การตรวจพิสูจน์ด้วยน้ำยาให้สีแบบหยด

นำสารสกัดในหลอดทดลองชุดที่ 1 และ 2 ของกัญชา กัญชาสายพันธุ์ RPF₁ และ RPF₄ ที่ได้จากการสกัดด้วยตัวทำละลายจากข้อ 3.5.3 หยดด้วยน้ำยาให้สีที่เตรียมไว้จากข้อ 3.4.1.1 และ 3.4.1.2 หลอดทดลองละ 3 หยด ตามลำดับ จากนั้นสังเกตสีที่ปรากฏ

3.7 การตรวจพิสูจน์ด้วยเทคนิค Thin Layer Chromatography (TLC)

เตรียมแผ่น TLC ขนาด 6×8 เซนติเมตร แล้วนำสารสกัดกัญชาและกัญชาสายพันธุ์ RPF₁ และ RPF₄ จากข้อ 3.5.3 ในหลอดทดลองชุดที่ 3 มาจุดลงบนแผ่น TLC ที่เตรียมไว้ ดังรูปที่ 3.4 เทียบกับสารมาตรฐาน THC และ CBD (Sigma® USA) ความเข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในตัวทำละลายเอทานอล จากนั้นทดสอบสภาวะที่เหมาะสมของเฟสเคลื่อนที่โดยใช้ตัวทำละลาย เฮกเซน ต่อ ไดเอทิลอีเทอร์

อัตราส่วนดังนี้ 100:0 80:20 70:30 50:50 30:70 และ 0:100 แล้วย้อมสีแผ่น TLC ด้วยน้ำยาให้สี สำหรับย้อมแผ่น TLC จากข้อ 3.4.2.1 และ 3.4.2.2



รูปที่ 3.4 การจุดสารสกัดลงบนแผ่น TLC

3.8 ทดสอบน้ำยาให้สี Fast Red B salt กับพืชอื่นๆ ทัวไป

นำพืชอื่นๆ ทัวไปที่เตรียมไว้จากข้อ 3.3.2 ได้แก่ โหระพา ยี่ห่วย กะเพรา ยาสูบ ชา ออริกา โน หญ้าหวาน ใบเตย ดอกคำฝอย และหอมแขก มาทดสอบโดยหยดด้วยน้ำยาให้สี Fast Red B salt จากข้อ 3.4.1.2 แล้วสังเกตสีที่ปรากฏ

3.9 วิเคราะห์ปริมาณด้วยเครื่อง Gas Chromatography (GC)

3.9.1 เตรียมตัวอย่างพืชที่จะวิเคราะห์ โดยชั่งน้ำหนักกัญชา กัญชง RPF₁ และกัญชง RPF₄ ตัวอย่างละ 0.5 กรัม นำมาสกัดด้วยตัวทำละลายแต่ละชนิด ปริมาตร 5 มิลลิลิตร จากนั้นนำเข้าเครื่องหมุนเหวี่ยง เป็นเวลา 20 นาที (ทำ 3 ซ้ำ)

3.9.2 เตรียมสารละลายมาตรฐาน โดยเจือจางสารมาตรฐาน tetrahydrocannabinidiol และ cannabidiol ใน internal standard solution ให้ได้ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ จากนั้นทำการเตรียม internal standard solution โดยเจือจาง 2,2,2 triphenylacetophenone ในเมทานอลให้ได้ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

3.9.3 ตรวจวิเคราะห์เอกลักษณ์และปริมาณการสกัดสาร THC และ CBD ด้วยเครื่อง

Gas Chromatography ภายใต้สภาวะ

Column : CP sil 5CB 30 เมตร×0.32 มิลลิเมตร, DF=0.25 ไมโครเมตร

Injection temperature : 260 องศาเซลเซียส

Detector temperature : 270 องศาเซลเซียส

Oven temperature : คงไว้ที่ เวลา 7 นาที ที่อุณหภูมิ 230 องศาเซลเซียส จากนั้นเพิ่มอุณหภูมิเป็น 260 องศาเซลเซียส ที่ 10 องศาเซลเซียสต่อนาที แล้วคงไว้ที่อุณหภูมิ 256 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที