

บทที่ 4

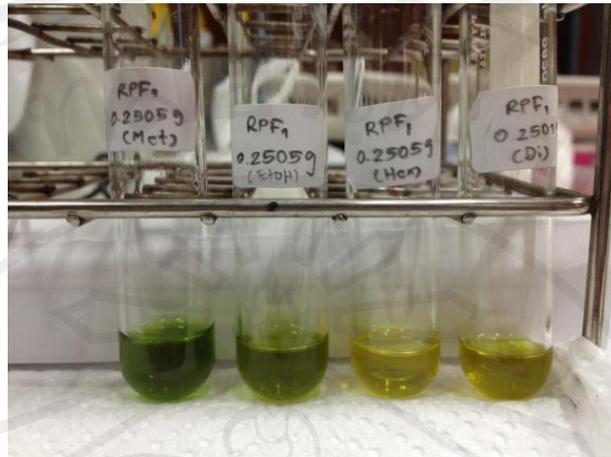
ผลการทดลองและอภิปรายผล

4.1 ประสิทธิภาพการสกัดและการใช้น้ำยาให้สีแบบหยด

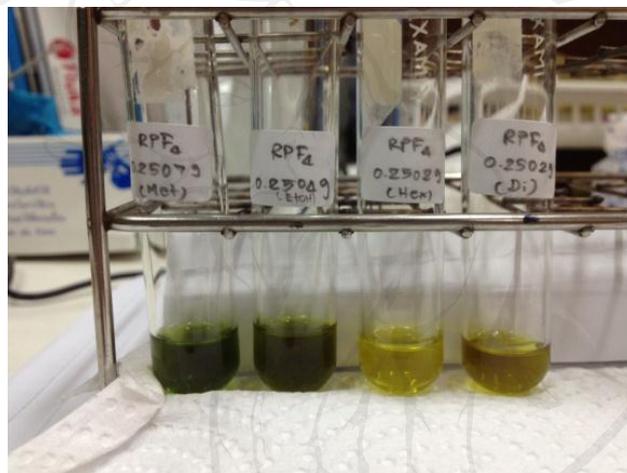
จากการทดลองสกัดสาร THC และ CBD ในพืชกัญชา กัญชงสายพันธุ์ RPF₁ และ RPF₄ ด้วยตัวทำละลาย 4 ชนิด ได้แก่ เมทานอล (ตัวทำละลายที่ใช้โดยทั่วไป) เอทานอล เฮกเซน และ ไดเอทิลอีเทอร์ โดยคุณสมบัติของตัวทำละลายที่มุ่งเน้นในงานวิจัยนี้จะต้องสกัดสารคลอโรฟิลล์ในพืชได้น้อย เพื่อไม่ให้สีของคลอโรฟิลล์รบกวนสีของสารสกัด ไม่แยกชั้นเมื่อหยดด้วยน้ำยาให้สี มีความเป็นพิษน้อย และสามารถสกัดสาร THC และ CBD ได้ปริมาณมากกว่าหรือใกล้เคียงกับตัวทำละลายที่ใช้โดยทั่วไป ซึ่งจากคุณสมบัติดังกล่าวทำให้ได้ผลการทดลองดังนี้

4.1.1 สีของสารสกัดด้วยตัวทำละลายต่าง ๆ

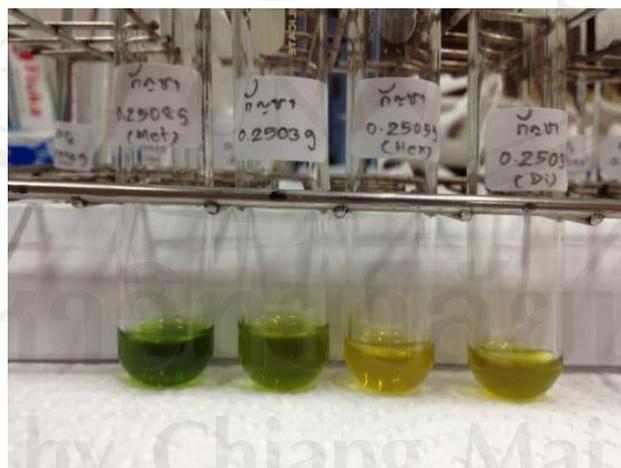
ซึ่งพืชกัญชา กัญชงสายพันธุ์ RPF₁ และ RPF₄ ตัวอย่างละ 0.5 กรัม ใส่หลอดทดลอง เติมตัวทำละลายเมทานอล เอทานอล เฮกเซน และ ไดเอทิลอีเทอร์ ลงไปอย่างละ 5 มิลลิลิตร ในแต่ละหลอด จากนั้นนำตัวอย่างเข้าเครื่องหมุนเหวี่ยงเป็นเวลา 20 นาที สังเกตสีของสารสกัดที่ได้ ดังรูปที่ 4.1 พบว่าตัวทำละลายเมทานอล (ตัวทำละลายที่ใช้โดยทั่วไป) ให้สีของสารสกัดสีเขียวเข้ม เนื่องจากตัวทำละลายเมทานอลมีคุณสมบัติในการสกัดสารคลอโรฟิลล์ออกมาได้มาก ทำให้สีสารสกัดที่ได้เข้ม อาจรบกวนการสังเกตสี ทำให้สังเกตสีได้ยากเมื่อหยดด้วยน้ำยาให้สี ในขณะที่เอทานอล เฮกเซน และเอทิลอีเทอร์ มีคุณสมบัติในการสกัดสารคลอโรฟิลล์ได้ปริมาณน้อยกว่า ส่งผลให้สีของสารสกัดอ่อน และรบกวนการสังเกตสีน้อยกว่า



(a)



(b)



(c)

รูปที่ 4.1 สีสารสกัดกัญชา RPF₁(a) RPF₄ (b) และกัญชา (c) ที่สกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอล

เอทานอล เฮกเซน และไดเอทิลอีเทอร์ ตามลำดับ

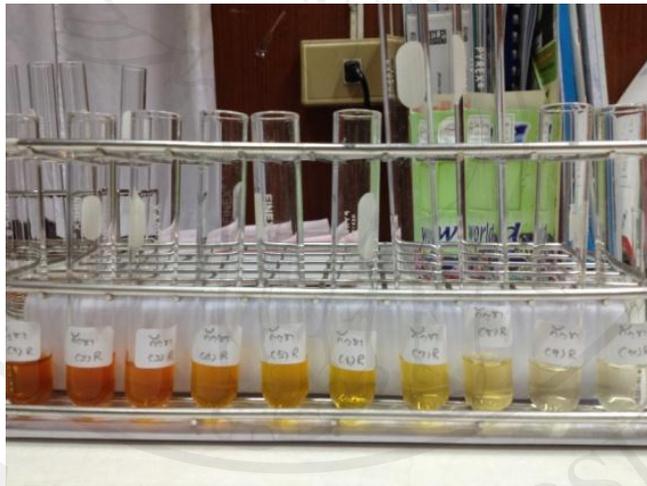
4.1.2 ทดสอบการหยดด้วยน้ำยาให้สี Fast Blue B salt เปรียบเทียบกับน้ำยาให้สี Fast Red

B salt

นำสารสกัดที่ได้มาทดสอบด้วยน้ำยาให้สี โดยหยดด้วยน้ำยาให้สี Fast Blue B salt เปรียบเทียบกับน้ำยาให้สี Fast Red B salt หลอดทดลองละ 3 หยด โดยน้ำยาให้สี Fast Blue B salt จะให้สีสารสกัดสีส้มถึงสีม่วงแดง ส่วน Fast Red B salt จะให้สีเหลืองถึงสีส้มแดง ดังรูปที่ 4.2 ซึ่งสีสารสกัดเมื่อหยดด้วย Fast Red B salt จะให้สีที่อ่อนกว่า ถึงแม้ความแตกต่างของสีสารสกัดกัญชา และกัญชงอาจจะไม่แตกต่างกันชัดเจนเท่ากับน้ำยาให้สี Fast Blue B salt แต่ก็สามารถสรุปได้ว่า น้ำยาให้สี Fast Red B salt สามารถทำปฏิกิริยากับพืชกัญชาและกัญชงได้เช่นเดียวกับ Fast Blue B salt โดยคาดว่าเกิดจาก diazonium salt ($R-N^+=N X^-$) ในสีย้อม Fast Red B salt เข้าทำปฏิกิริยากับ cannabinoid ของสาร THC และ CBD ที่มีอยู่ในตัวอย่างพืชกัญชาและกัญชง จึงทำให้ปรากฏสีขึ้น และมีข้อดีที่ว่า Fast Blue B salt คือราคาถูกกว่า ไม่เป็นสารก่อมะเร็ง และเมื่อหยดด้วยน้ำยาให้สี ทั้งสองชนิด พบว่าตัวอย่างพืชที่สกัดด้วยตัวทำละลายเฮกเซน และ ไดเอทิลอีเทอร์ เกิดการแยกชั้นของสารละลาย ดังรูปที่ 4.3 ทำให้สังเกตสีได้ยาก ในขณะที่ตัวทำละลายเมทานอล (ตัวทำละลายที่ใช้โดยทั่วไป) และตัวทำละลายเอทานอล สีสารสกัดเกิดการเปลี่ยนแปลง ดังตารางที่ 4.1 ไม่แยกชั้น ดังนั้นจากการทดสอบหาตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดสาร THC และ CBD ในตัวอย่างพืชกัญชา กัญชงสายพันธุ์ RPF₁ และ RPF₄ คือ เอทานอล เพราะสารสกัดที่ได้ให้ผลใกล้เคียงกับตัวทำละลายเมทานอล ไม่แยกชั้นเมื่อหยดด้วยน้ำยาให้สี ดังรูปที่ 4.4 และมีข้อดีที่ว่าตัวทำละลายเมทานอล คือ ตัวทำละลายเอทานอลสกัดสารคลอโรฟิลล์ได้น้อยกว่าเมทานอล ทำให้สีเขียวของคลอโรฟิลล์ไม่รบกวนสีสารสกัดที่ได้ มีความเป็นพิษน้อยกว่า ปลอดภัยสำหรับผู้ปฏิบัติงานและ ไม่เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อมเมื่อเทียบกับตัวทำละลายเมทานอล



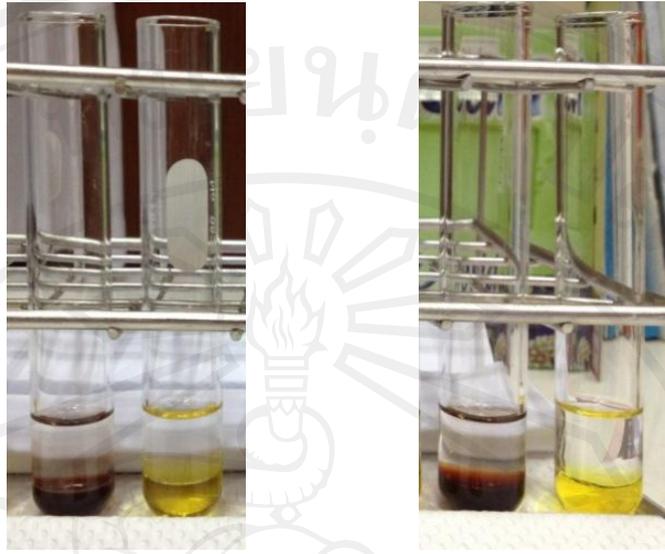
(a)



(b)

รูปที่ 4.2 การเปรียบเทียบสีสารสกัดหลังหยดด้วยน้ำยาให้สี Fast Blue B salt (a)

และ Fast Red B salt (b)



(a)

(b)

รูปที่ 4.3 การแยกชั้นของสารสกัดด้วยเฮกเซน (a) และ ไดเอทิลอีเทอร์ (b) เมื่อหยดด้วยน้ำยาให้สี

Fast Blue B salt และ Fast Red B salt



(a)

(b)

(c)

รูปที่ 4.4 สีสารสกัด กัญชง RPF₁ (a) กัญชง RPF₄ (b) และกัญชา (c) ในตัวทำละลายเอทานอล

เมื่อหยดด้วยน้ำยาให้สี Fast Red B salt

ตารางที่ 4.1 การตรวจพิสูจน์แบบหยดด้วยน้ำยาให้สี Fast Blue B salt และ Fast Red B salt ในสารสกัดตัวทำละลายต่างๆ

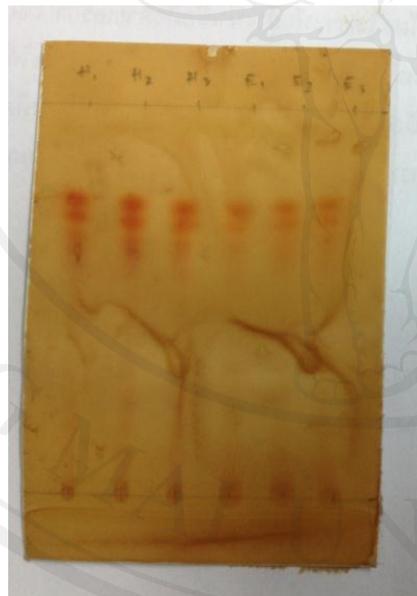
ตัวทำละลาย	ตัวอย่างพืช	สีที่สังเกตได้จากสารสกัดเมื่อหยดด้วย Fast Blue B salt		สีที่สังเกตได้จากสารสกัดเมื่อหยดด้วย Fast Red B salt	
		ก่อน	หลัง	ก่อน	หลัง
เมทานอล	กัญชา	เขียวอมเหลือง	แดง	เขียวอมเหลือง	ส้ม
	กัญชง RPF ₁	เขียวเข้ม	ม่วงแดง	เขียวเข้ม	ส้มแดง
	กัญชง RPF ₄	เขียวเข้ม	ม่วงแดง	เขียวเข้ม	ส้มแดง
เอทานอล	กัญชา	เขียวอมเหลือง	แดง	เขียวอมเหลือง	ส้ม
	กัญชง RPF ₁	เขียวอ่อน	ม่วงแดง	เขียวอ่อน	ส้มแดง
	กัญชง RPF ₄	เขียวอ่อน	ม่วงแดง	เขียวอ่อน	ส้มแดง
เฮกเซน	กัญชา	เหลือง	แยกชั้น*	เหลือง	แยกชั้น*
	กัญชง RPF ₁	เหลือง	แยกชั้น*	เหลือง	แยกชั้น*
	กัญชง RPF ₄	เหลือง	แยกชั้น*	เหลือง	แยกชั้น*
ไดเอทิลอีเทอร์	กัญชา	เขียวตอง	แยกชั้น*	เขียวตอง	แยกชั้น*
	กัญชง RPF ₁	เขียวตอง	แยกชั้น*	เขียวตอง	แยกชั้น*
	กัญชง RPF ₄	เขียวตอง	แยกชั้น*	เขียวตอง	แยกชั้น*

* หมายเหตุ แยกชั้น คือ สารสกัดไม่รวมเป็นเนื้อเดียวกันเมื่อหยดด้วยน้ำยาให้สี Fast Blue B salt และ Fast Red B salt ส่งผลให้ยากต่อการสังเกตสี

4.2 ผลการทดสอบด้วยเทคนิค Thin Layer Chromatography (TLC)

4.2.1 เปรียบเทียบการย้อมสีแผ่น TLC ด้วยน้ำยาให้สี Fast Blue B salt และ Fast Red B salt

จากการทดลองแยกสาร THC และ CBD ด้วยเทคนิค TLC ในตัวอย่างพืชกัญชา กัญชง สายพันธุ์ RPF₁ และ RPF₄ โดยใช้อัตราส่วนตัวทำละลาย เฮกเซน ต่อ ไดเอทิลอีเทอร์ แล้วย้อมสีแผ่น TLC ด้วยน้ำยาให้สี Fast Blue B salt และ Fast Red B salt ซึ่งผลการเปรียบเทียบการย้อมสีแผ่น TLC โดยใช้ที่ใช้น้ำยาให้สี Fast Blue B salt กับน้ำยาให้สี Fast Red B salt พบว่าเมื่อย้อมแผ่น TLC ด้วยน้ำยาให้สี Fast Blue B salt สีพื้นของแผ่น TLC จะเข้ม ทำให้สังเกตการแยกสาร THC และ CBD ในตัวอย่างพืชได้ยาก ในขณะที่ย้อมสีด้วยน้ำยาให้สี Fast Red B salt สีพื้นของแผ่น TLC จะอ่อน ไม่รบกวนการสังเกตการเคลื่อนที่ของสาร THC และ CBD ดังรูปที่ 4.5



(a)



(b)

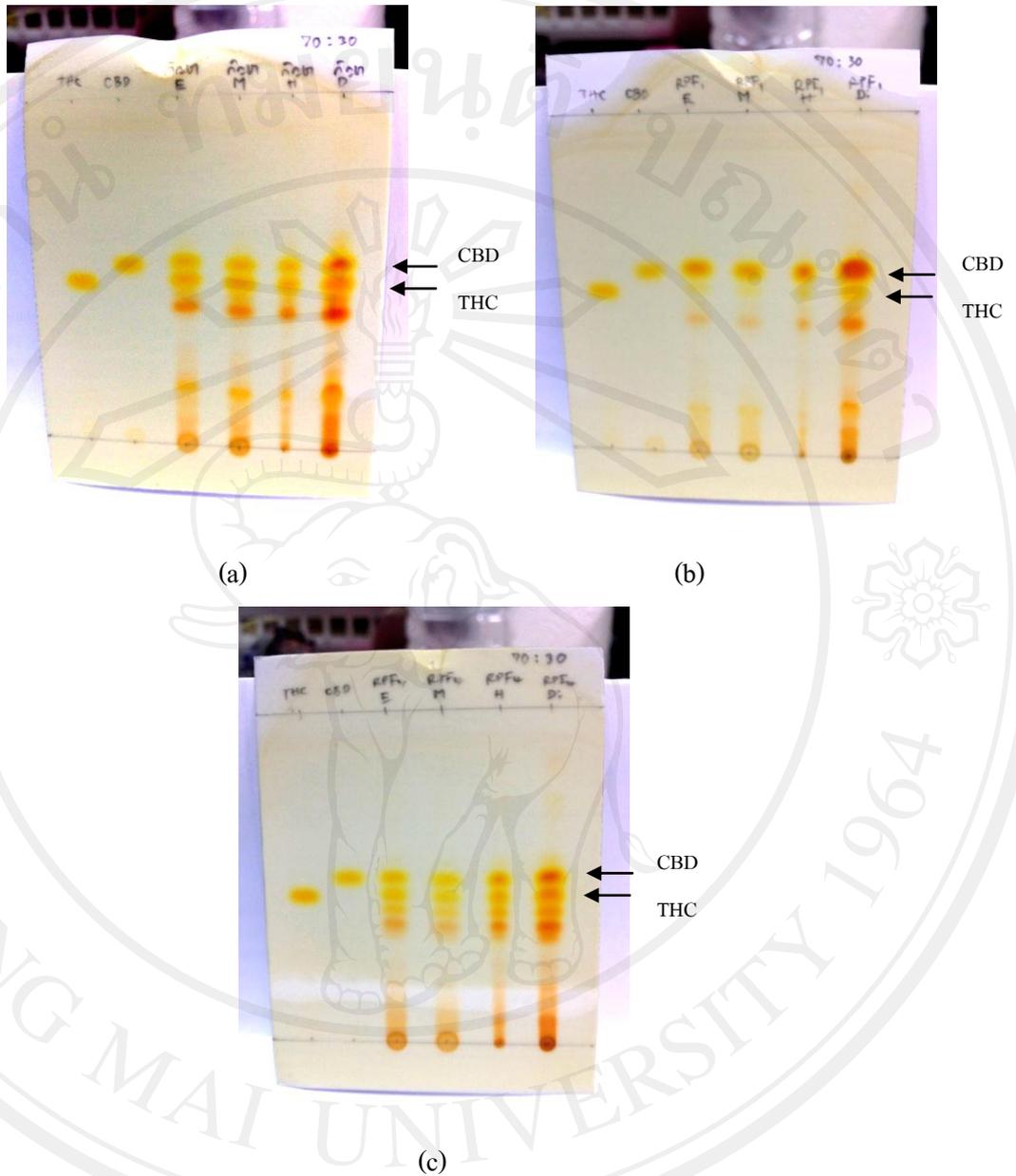
รูปที่ 4.5 เปรียบเทียบการย้อมสีแผ่น TLC ด้วยน้ำยาให้สี Fast Blue B salt (a) และ Fast Red B salt (b)

4.2.2 ทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมของเฟสเคลื่อนที่

นำสารสกัดที่ได้จากการสกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอล เอทานอล เฮกเซน และ ไดเอทิลอีเทอร์ มาจุดลงบนแผ่น TLC แล้วทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมของเฟสเคลื่อนที่ เพื่อเพิ่ม ประสิทธิภาพการแยกสาร THC และ CBD ในตัวอย่างพืชกัญชา กัญชงสายพันธุ์ RPF₁ และ RPF₄ โดยใช้อัตราส่วนของตัวทำละลาย เฮกเซน ต่อ ไดเอทิลอีเทอร์ ดังนี้ 100:0, 80:20, 70:30, 50:50, 30:70 และ 0:100 ซึ่งปรากฏผลการแยก ดังตารางที่ 4.2 พบว่าสภาวะที่เหมาะสมของเฟสเคลื่อนที่ในการทดลองนี้ คือ เฮกเซน ต่อ ไดเอทิลอีเทอร์ อัตราส่วน 70 : 30 ซึ่งมีค่า retention factor (R_f) ของสาร THC เท่ากับ 0.65 และ R_f ของสาร CBD เท่ากับ 0.70

ตารางที่ 4.2 การทดสอบสภาวะที่เหมาะสมของเฟสเคลื่อนที่ เฮกเซน ต่อ ไดเอทิลอีเทอร์ ที่อัตราส่วน ต่าง ๆ

อัตราส่วนเฟสเคลื่อนที่ เฮกเซน ต่อ ไดเอทิลอีเทอร์	ผลการเคลื่อนที่ของสาร THC และ CBD
100 : 0	แยกไม่ได้
80 : 20	แยกได้แต่มีบางส่วนที่ซ้อนทับกันอยู่
70 : 30	แยกได้ดี (ดังรูปที่ 4.6)
50 : 50	สารซ้อนทับกัน
30 : 70	แยกไม่ได้
0 : 100	แยกไม่ได้



รูปที่ 4.6 การเคลื่อนที่ของสาร THC และ CBD ในสภาวะเฟสเคลื่อนที่ เฮกเซน ต่อ ไดเอทิลอีเทอร์

(70:30) ในพืชกัญชา (a) กัญชง RPF₁ (b) และ กัญชง RPF₄ (c)

วิธีการคำนวณค่า Retention factor (R_f)

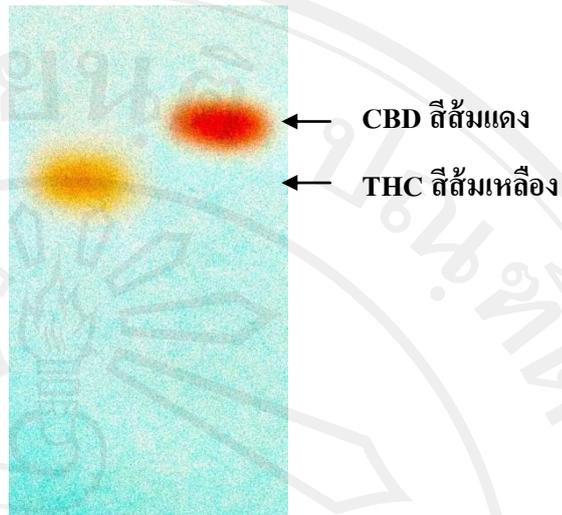
จากสมการ

$$R_f = \frac{\text{ระยะทางที่สารเคลื่อนที่ (cm)}}{\text{ระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่ (cm)}}$$

$$\begin{aligned} R_f \text{ ของสาร THC} &= \frac{3.9 \text{ cm}}{6.0 \text{ cm}} \\ &= 0.65 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} R_f \text{ ของสาร CBD} &= \frac{4.2 \text{ cm}}{6.0 \text{ cm}} \\ &= 0.70 \end{aligned}$$

และจากการทดลองนำสารสกัดพืชกัญชา กัญชงสายพันธุ์ RPF₁ และ RPF₄ ที่ได้จากตัวทำละลายต่างๆ พบว่า เมื่อย้อมสีแผ่น TLC ด้วยน้ำยาให้สี Fast Red B salt สารสกัดที่ได้จากตัวทำละลายไดเอทิลอีเทอร์ จะให้ความแตกต่างของสี THC และ CBD ที่ชัดเจนที่สุด โดยสาร CBD เมื่อทำปฏิกิริยากับสีย้อม Fast Red B salt จะได้สีส้มแดง ในขณะที่สาร THC จะปรากฏสีส้มเหลือง ดังรูปที่ 4.7 แต่เนื่องจากเมื่อทดลองหยดน้ำยาให้สีในสารสกัดด้วยตัวทำละลายไดเอทิลอีเทอร์เกิดการแยกชั้นของสารละลาย ทำให้ไม่เหมาะสมที่จะใช้ในการตรวจในภาคสนาม เพราะสังเกตสีได้ยาก แต่เหมาะสมในการตรวจในห้องปฏิบัติการด้วยเทคนิค TLC เพราะให้ความแตกต่างของสีสาร THC และ CBD ที่มีอยู่ในพืชกัญชาและกัญชงชัดเจน ส่วนตัวทำละลายเอทานอลจะปรากฏความต่างของสีสาร THC และ CBD อย่างชัดเจนหลังจากจุ่มแผ่น TLC ลงในน้ำยาให้สี Fast Red B salt แล้วประมาณ 3-4 นาที ซึ่งจะมีการตอบสนองต่อน้ำยาให้สี Fast Red B salt ช้ากว่าตัวทำละลายไดเอทิลอีเทอร์ ในสถานะเฟสเคลื่อนที่ เฮกเซนต่อไดเอทิลอีเทอร์ อัตราส่วน 70:30



รูปที่ 4.7 ความแตกต่างของสีสาร THC และ CBD เมื่อย้อมด้วยน้ำยาให้สี Fast Red B salt

4.3 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบและปริมาณของสารด้วยเครื่อง Gas Chromatography (GC)

จากผลการทดลองตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดสาร THC และ CBD ในพืชกัญชา กัญชงสายพันธุ์ RPF₁ และ RPF₄ พบว่าเป็น ตัวทำละลายเอทานอล ดังนั้นจึงนำสารสกัดจาก ตัวทำละลายเอทานอลมาวิเคราะห์องค์ประกอบและปริมาณเทียบกับตัวทำละลายเมทานอลที่ใช้ ทั่วไป โดยชั่งน้ำหนักพืชกัญชา กัญชง RPF₁ และกัญชง RPF₄ ตัวอย่างละ 0.5 กรัม นำมาสกัดด้วย ตัวทำละลาย เมทานอลและเอทานอล อย่างละ 5 มิลลิลิตร โดยทำ 3 ชั่วโมง จากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วย เครื่อง Gas Chromatography

4.3.1 การวิเคราะห์องค์ประกอบของตัวอย่างพืช

จากการวิเคราะห์องค์ประกอบของพืชกัญชา กัญชงสายพันธุ์ RPF₁ และ RPF₄ โดยพิจารณา สารสำคัญ 2 ชนิด ได้แก่ สาร Tetrahydrocannabinol (THC) และ Cannabidiol (CBD) ซึ่งเป็นสารสำคัญ ในการพิจารณาปริมาณเพื่อแยกความแตกต่างของพืชกัญชาและกัญชง โดยพบว่าประกอบด้วยสาร THC มีค่า retention time เฉลี่ยเท่ากับ 6.508 และสาร CBD มีค่า retention time เฉลี่ยเท่ากับ 5.194 ดังตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 Retention time ของสารมาตรฐาน Tetrahydrocannabinol (THC) และ Cannabidiol (CBD) ที่ความเข้มข้น 2.0 mg/ml และ 2.5 mg/ml ตามลำดับ (N = 4) (ดังภาคผนวกรูปที่ 1-8)

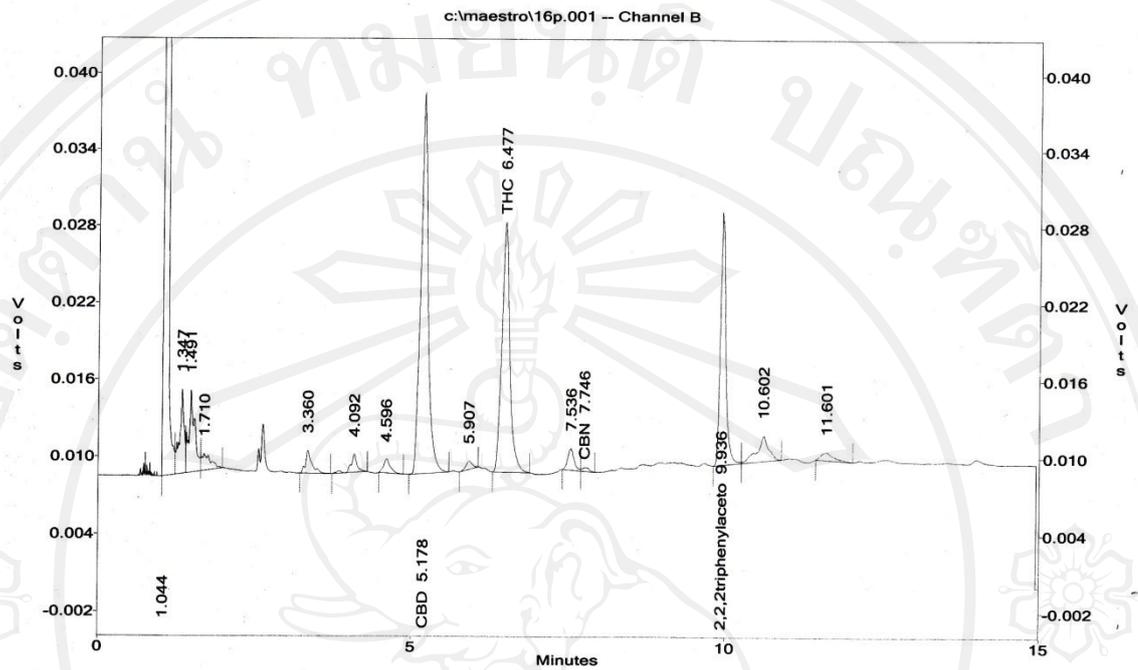
ครั้งที่	ค่า Retention time ของสารมาตรฐาน THC ความเข้มข้น 2.0 mg/ml	ค่า Retention time ของสารมาตรฐาน CBD ความเข้มข้น 2.5 mg/ml
1	6.516±0.019	5.172±0.038
2	6.525±0.019	5.199±0.038
3	6.516±0.019	5.223±0.038
4	6.477±0.019	5.184±0.038
เฉลี่ย	6.508±0.019	5.194±0.038

4.3.2 การวิเคราะห์ปริมาณ

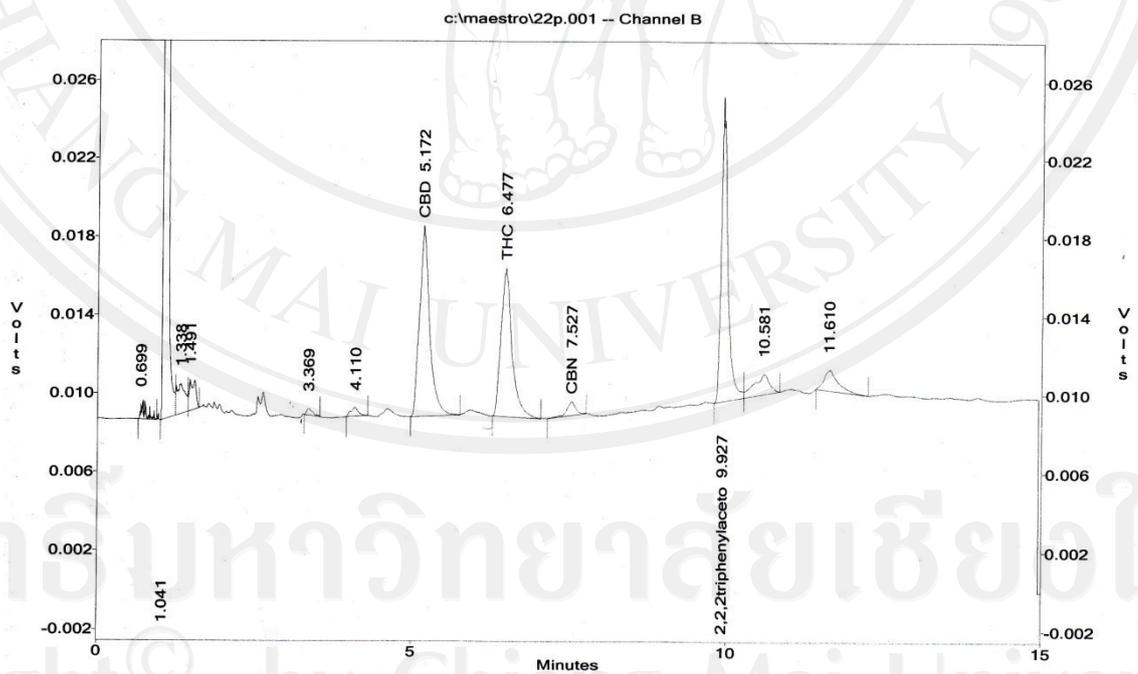
จากการวิเคราะห์หาปริมาณสาร THC และ CBD ในสารสกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอลและเอทานอล พบว่าจากโครมาโทแกรมของพืชกัญชา กัญชง RPF₁ และ กัญชง RPF₄ ดังรูปที่ 4.8-4.10 สารสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลให้ผลการสกัดสาร THC และ CBD ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% กับตัวทำละลายเมทานอล ที่ใช้โดยทั่วไปในงานตรวจพิสูจน์กัญชาและกัญชง ดังภาคผนวก ข และตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.4 ปริมาณสาร THC และ CBD ที่ได้จากการสกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอลและเอทานอล (N=3)

ตัวอย่างพืช	THC (%w/w)		CBD (%w/w)	
	เมทานอล	เอทานอล	เมทานอล	เอทานอล
กัญชา	0.4005±0.097	0.4141±0.11	0.2372±0.068	0.1688±0.087
กัญชง RPF ₁	0.0420±0.0039	0.0311±0.014	0.3280±0.032	0.2722±0.10
กัญชง RPF ₄	0.1025±0.016	0.1025±0.0022	0.1493±0.022	0.1399±0.011

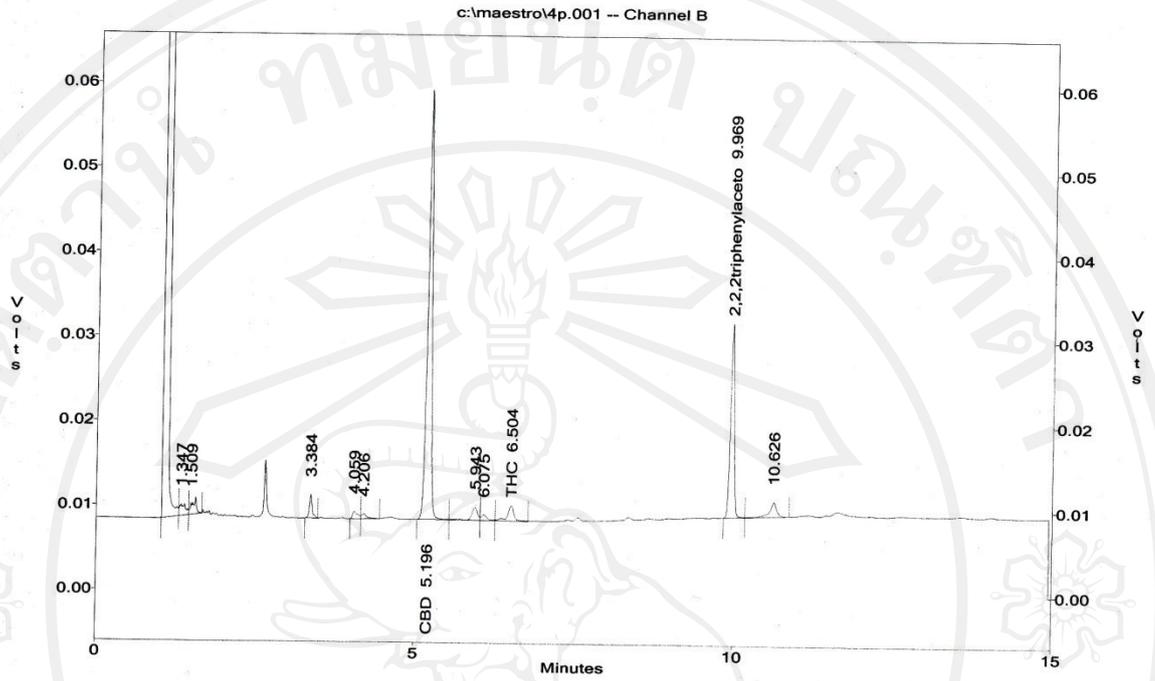


(a)

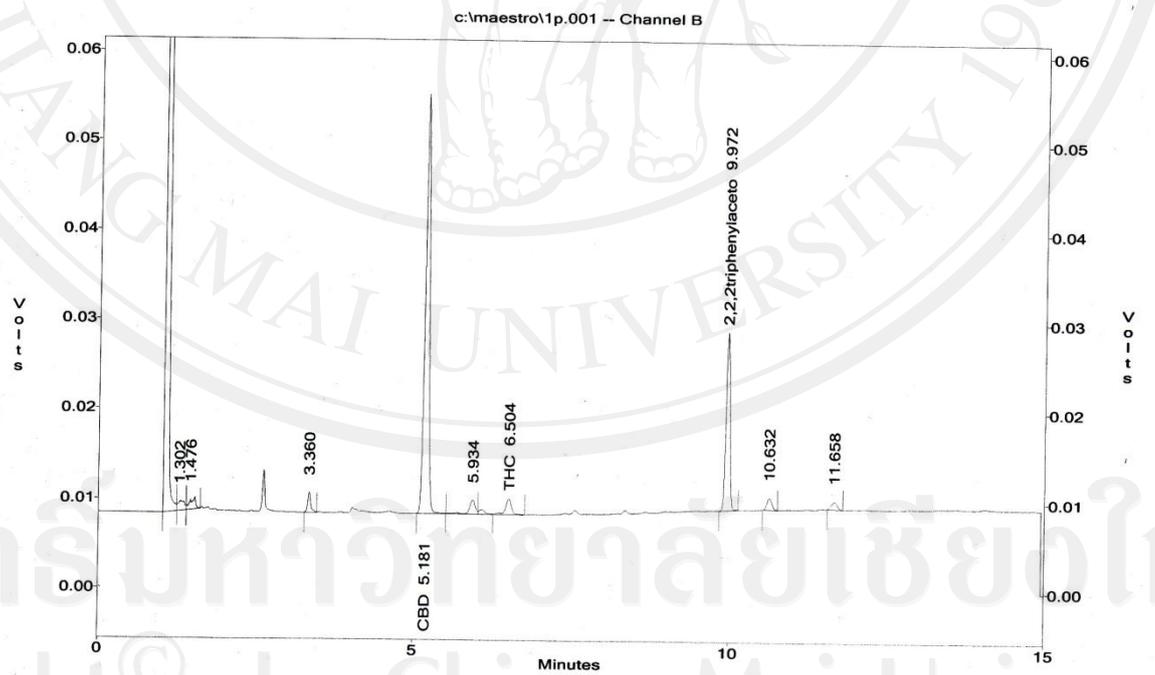


(b)

รูปที่ 4.8 โครมาโทแกรมของพืชกัญชาในตัวทำละลายเมทานอล (a) และเอทานอล (b)

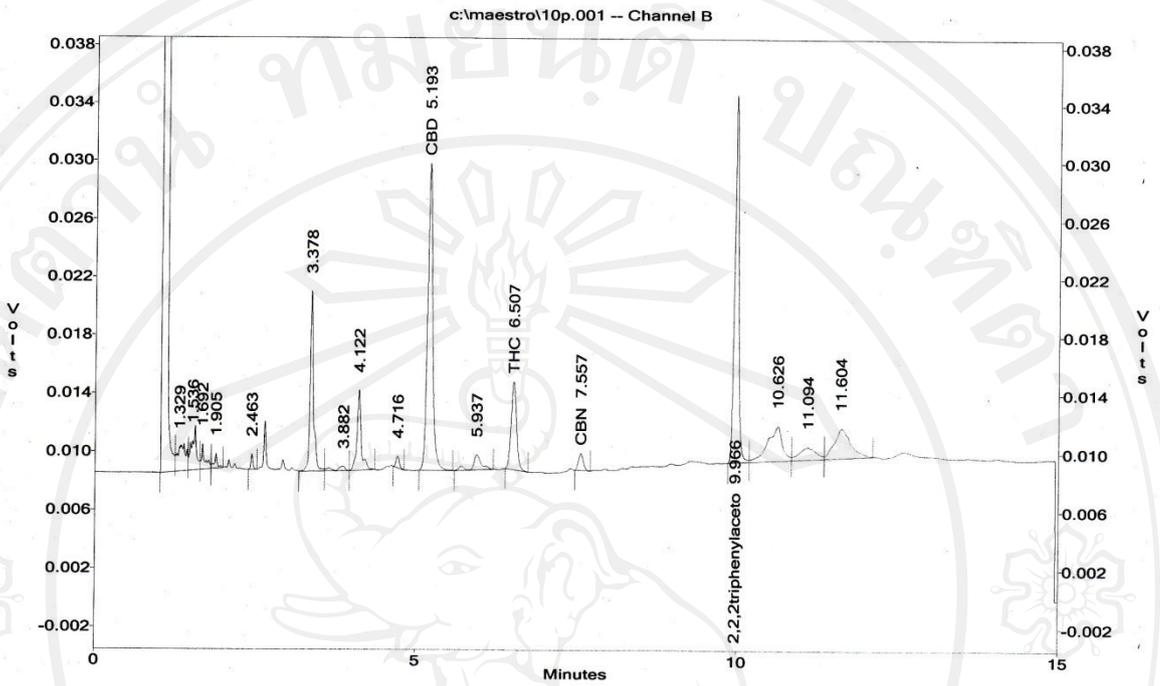


(a)

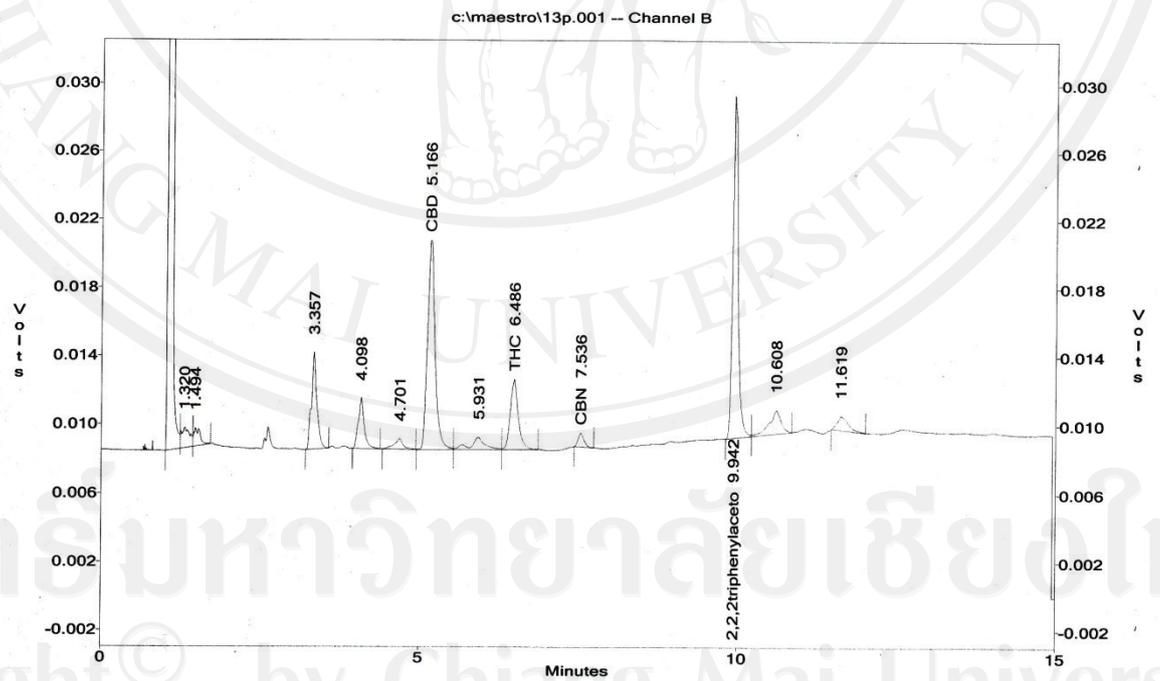


(b)

รูปที่ 4.9 โครมาโทแกรมของพืชกัญชง RPF₁ ในตัวทำละลายเมทานอล (a) และเอทานอล (b)



(a)



รูปที่ 4.10 โครมาโทแกรมของพืชกัญชง RPF₄ ในตัวทำละลายเมทานอล (a) และเอทานอล (b)

4.4 การทดสอบน้ำยาให้สี Fast Red B salt กับพืชอื่น ๆ ทั่วไป

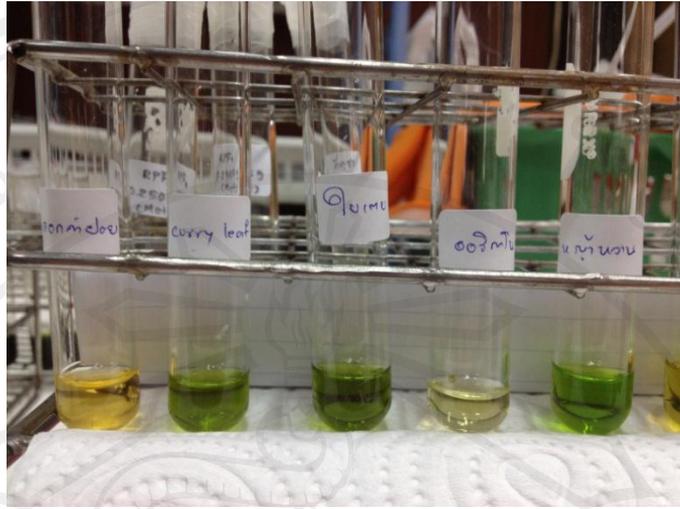
จากการทดลองหยดน้ำยาให้สี Fast Red B salt กับพืชอื่น 10 ชนิด ได้แก่ โหระพา ยี่หระ กะเพรา ยาสูบ ใบชา ออริกาโน หญ้าหวาน ใบเตย ดอกคำฝอย และหอมแขก ที่นิยมนำมาใช้เป็นเครื่องปรุงทั่วไป พบว่า สารสกัดใบชากับหอมแขก สีเปลี่ยนเป็นสีส้มแดงโดยทันที ซึ่งตัวอย่างพืชดังกล่าวอาจจะมีสาร THC หรือ CBD เป็นส่วนประกอบหรือมีสารในกลุ่มของ Phenol หรือ Aniline ที่สามารถทำปฏิกิริยาได้กับ Fast Red B salt ส่วนพืชอื่นๆ สีสารสกัดไม่เปลี่ยนแปลงจากเดิม ดังตารางที่ 4.5 และดังรูปที่ 4.12 ซึ่งเมื่อนำไปตรวจพิสูจน์พืชกัญชาและกัญชง โดยการหยดด้วยน้ำยาให้สี Fast Red B salt ในภาคสนามต้องพิจารณาพืชดังกล่าวนี้ประกอบ เนื่องจากเมื่ออบแห้งและอัดเป็นแท่งแล้ว ลักษณะทางกายภาพของพืชดังกล่าวกับกัญชาและกัญชงจะมีลักษณะใกล้เคียงกัน ซึ่งอาจจะมีอาการแอบอ้างและปลอมปนมาในกัญชาและกัญชงได้ ทำให้ยากต่อการสังเกตด้วยตาเปล่าสำหรับผู้ที่ไม่เชี่ยวชาญในการตรวจพิสูจน์ได้

ตารางที่ 4.5 การตรวจพิสูจน์แบบหยดด้วยน้ำยาให้สี Fast Red B salt กับพืชอื่น ๆ

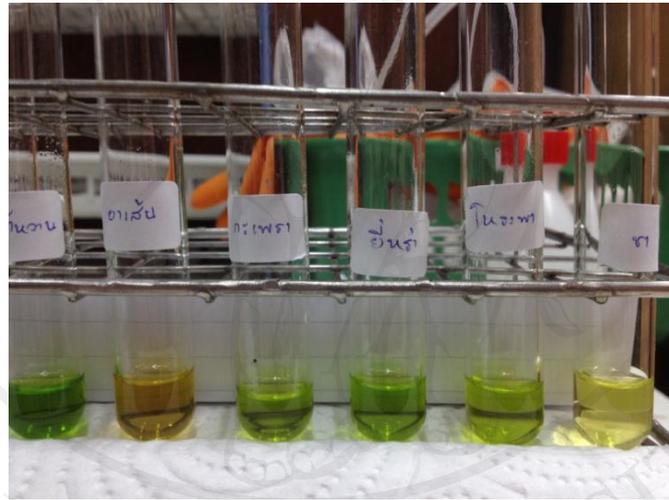
ตัวอย่างพืช	ผลการทดลอง
โหระพา	-
ยี่หระ	-
กะเพรา	-
ยาสูบ	-
ใบชา	+
ออริกาโน	-
หญ้าหวาน	-
ใบเตย	-
ดอกคำฝอย	-
หอมแขก	+

หมายเหตุ (+) หมายถึง สีสารสกัดเปลี่ยนเป็นสีส้มแดงทันที

(-) หมายถึง สีสารสกัดไม่เปลี่ยนจากเดิม

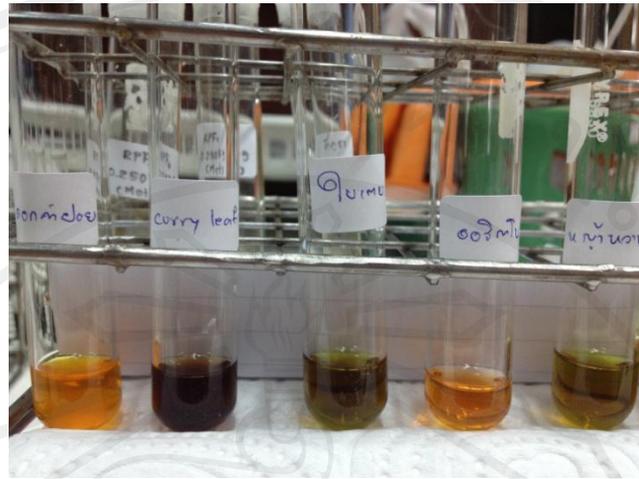


(a)

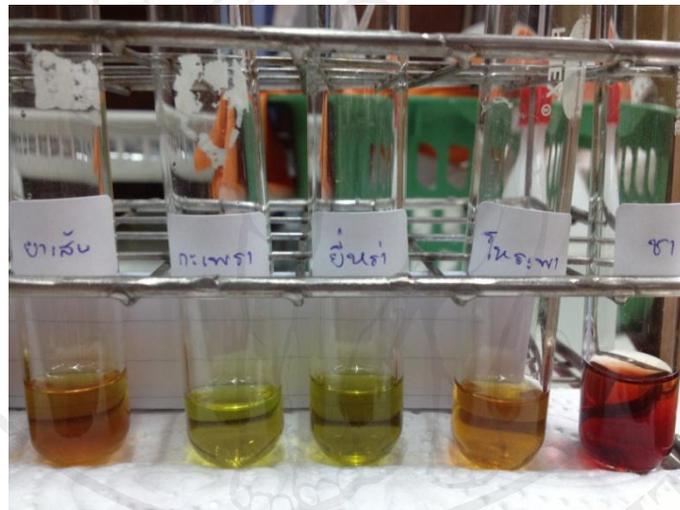


(b)

รูปที่ 4.11 สีของสารสกัดพืชดอกคำฝอย หอมแขก ใบเตย ออริกาโน หู้าหวาน (a) ตามลำดับ และ หู้าหวาน ข่าเส้น กระเพรา ย่านี่หระ โหระพา ชา (b) ตามลำดับ ก่อนหยดน้ำยาให้สี



(a)



(b)

รูปที่ 4.12 สีของสารสกัดพืชดอกคำฝอย หอมแขก ใบเตย ออริกาโน่ หญ้าหวาน (a) ตามลำดับ และ ยาเส้น กะเพรายี่ห่วย โหระพา ชา (b) ตามลำดับ หลังหยดน้ำยาให้สี