

Thesis Title	Analysis of Cannabinoids in Hemp Plants Using Ion-pair Reversed-Phase Liquid Chromatography
Author	Miss Piyamas Suriya
Degree	Master of Science (Chemistry)
Thesis Advisor	Asst. Prof. Dr. Sunanta Wangkarn

ABSTRACT

Ion-pair reversed-phase liquid chromatography (IP-RPLC) procedure for cannabinoid separation was optimized. The separation was studied on an Eclipse XDB-C₁₈ column, acetonitrile-water mixture as mobile phase at flow rate 1.0 ml/min and UV detector at wavelength 220 nm. The effect of several experimental variables was investigated: pH of mobile phase (pH 4.0-6.0), concentration of cetrime as an anion-pairing reagent (5-40 mM) and ratio of acetonitrile-water (75-95% acetonitrile and water 25-5%). Acidic and neutral cannabinoids were separated when using a mobile phase of acetonitrile-water mixture (80:20, v/v) containing acetonitrile-35 mM cetrime at pH of 4.0. The number of acidic and neutral cannabinoids obtained under optimal IP-RPLC condition was four and six components, respectively. Two of ten compounds were assigned as cannabidiol (CBD) and Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC) comparing with CBD and Δ^9 -THC standards. Calibration graphs were linear in the range of 2.4-25.0 mg/l with correlation coefficient of 0.9987 and 0.9970 for CBD and Δ^9 -THC, respectively. The limit of detection (LOD) and the limit of quantification (LOQ) were 0.02 and 0.08 mg/l for the both of CBD and Δ^9 -THC, respectively. Accuracy tests were performed by spiking standard to sample matrix at three concentration levels of CBD and Δ^9 -THC. The percentage recoveries were 97-99 for CBD and 100-102 for Δ^9 -THC.

Confirmation of individual cannabinoid was established using LC-ion-trap mass spectrometry in negative mode. The product ions obtained from the MSⁿ technique can be used for structural identification of each cannabinoid. Two of ten cannabinoids in hemp samples were identified as CBD and Δ^9 -THC whereas one cannabinoid could not be identified. Seven of ten cannabinoids were tentatively assigned to cannabigerol (CBG), Δ^9 -tetrahydrocannabivarin (Δ^9 -THCV), cannabichromene (CBC), cannabichromevarin (CBCV), cannabidiolic acid (CBDA), Δ^9 -tetrahydrocannabivarinic acid (Δ^9 -THCVA) and Δ^9 -tetrahydrocannabinolic acid (Δ^9 -THCA) by the various patterns of mass spectra depending on the structure of each cannabinoid.

The suitable IP-RPLC condition was applied to the determination of cannabinoids (CBD, CBDA, Δ^9 -THC and Δ^9 -THCA) in hemp and marihuana samples. Most cannabinoids found in fresh plants exception for hemp sample, namely Huaw Luak and marihuana were in acidic cannabinoid forms (CBDA and Δ^9 -THCA). The amounts of CBD and CBDA in hemp samples were higher than in marihuana samples. For Δ^9 -THCA determination, the amount of this compound in hemp samples was lower than in marihuana samples. Acidic and neutral cannabinoids in hemp and marihuana samples were identified. Acidic and neutral cannabinoids from the both of propyl and pentyl pathways were found in hemp samples exception for hemp sample, namely Viet Nam-1 and marihuana.

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์	การวิเคราะห์แคนนาบินอยด์ในพืชกัญชงโดยใช้ไอออนแพร์รีเวอร์สเฟสลิควิดโครมาโทกราฟี
ผู้เขียน	นางสาวปิยมาศ สุริยา
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เคมี)
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	ผศ. ดร. สุนันทา ว่างกานต์

บทคัดย่อ

การแยกแคนนาบินอยด์ถูกปรับสภาพที่เหมาะสมโดยใช้เทคนิคไอออนแพร์รีเวอร์สเฟสลิควิดโครมาโทกราฟี การแยกได้ใช้คอลัมน์ Eclipse XDB-C₁₈ อะซิโตไนโตรล์และน้ำเป็นเฟสเคลื่อนที่ที่อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ 1.0 มิลลิตรต่อนาทีและหัววัดสัญญาณแบบยูวีที่ความยาวคลื่น 220 นาโนเมตร ผลของตัวแปรต่างๆในการทดลองถูกศึกษาได้แก่ ค่าพีเอชของเฟสเคลื่อนที่ระหว่าง 4.0-6.0, ช่วงความเข้มข้นของเซทริมาคด์ระหว่าง 5-40 มิลลิโมลาร์ ที่ใช้เป็นสารแอนไอออนแพร์และอัตราส่วนของอะซิโตไนโตรล์และน้ำ (อะซิโตไนโตรล์ 75-95 เปอร์เซ็นต์และน้ำ 25-5 เปอร์เซ็นต์) แคนนาบินอยด์ทั้งชนิดที่มีฤทธิ์เป็นกรดและมีฤทธิ์เป็นกลางสามารถแยกจากกันได้เมื่อใช้เฟสเคลื่อนที่ที่เป็นอะซิโตไนโตรล์และน้ำในอัตราส่วน 80:20 โดยปริมาตรประกอบด้วยอะซิโตไนโตรล์และเซทริมาคด์ความเข้มข้น 35 มิลลิโมลาร์ และ ณ พีเอชเท่ากับ 4.0 จำนวนแคนนาบินอยด์ที่มีฤทธิ์เป็นกรดและมีฤทธิ์เป็นกลางที่วิเคราะห์ได้ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมของไอพี-อาร์พีแอลซี มีจำนวน 4 และ 6 ชนิด ตามลำดับ สารประกอบจำนวน 2 ชนิดจากทั้งหมดจำนวน 10 ชนิดที่บ่งบอกได้ คือ cannabidiol (CBD) และ Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC) เมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน CBD และ Δ^9 -THC กราฟมาตรฐานของสาร CBD และ Δ^9 -THC ในช่วงความเข้มข้น 2.4-25.0 มิลลิกรัมต่อลิตร มีความเป็นเส้นตรงซึ่งมีค่าสัมประสิทธิ์เชิงเส้นตรงเท่ากับ 0.9987 และ 0.9970 ตามลำดับ ชัดจำกัดของการตรวจพบและขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณทั้งของ CBD และ Δ^9 -THC มีค่าเท่ากับ 0.02 และ 0.08 มิลลิกรัมต่อลิตรตามลำดับ การทดสอบความถูกต้องของการวิเคราะห์ทำโดยการเติมสารมาตรฐาน CBD และ

Δ^9 -THC ลงไปในตัวอย่างที่ความเข้มข้น 3 ระดับ ร้อยละของการได้กลับคืนของ CBD อยู่ในช่วง 97-99 และ Δ^9 -THC อยู่ในช่วง 100-102

การยืนยันแคนนาบินอยด์แต่ละชนิดใช้เทคนิคแอลซี-ไอออน-แทรปแมสสเปกโตรเมทรีแบบวิเคราะห์ประจุลบ ไอออนที่ได้จากเทคนิค MSⁿ สามารถบ่งบอกเอกลักษณ์ของโครงสร้างโมเลกุลของแคนนาบินอยด์แต่ละชนิดได้ แคนนาบินอยด์จำนวน 2 ชนิดจากทั้งหมดจำนวน 10 ชนิดในพืชกัญชาที่ชี้ได้ชัดเจน คือ CBD และ Δ^9 -THC ในขณะที่แคนนาบินอยด์อีกหนึ่งชนิดไม่สามารถบ่งชี้ชัดได้ แคนนาบินอยด์จำนวน 7 ชนิดจากทั้งหมดจำนวน 10 ชนิดที่มีแนวโน้มบ่งบอกได้ คือ cannabigerol (CBG), Δ^9 -tetrahydrocannabivarin (Δ^9 -THCV), cannabichromene (CBC), cannabichromevarin (CBCV), cannabidiolic acid (CBDA), Δ^9 -tetrahydrocannabinavarinic acid (Δ^9 -THCVA) และ Δ^9 -tetrahydrocannabinolic acid (Δ^9 -THCA) โดยใช้รูปแบบของแมสสเปกตรัมซึ่งขึ้นอยู่กับโครงสร้างของแคนนาบินอยด์แต่ละชนิด

เมื่อนำสภาวะที่เหมาะสมของไอพี-อาร์พีแอลซีไปประยุกต์หาปริมาณแคนนาบินอยด์ (CBD, CBDA, Δ^9 -THC และ Δ^9 -THCA) ในตัวอย่างกัญชาและกัญชาพบว่า แคนนาบินอยด์เกือบทั้งหมดที่พบในพืชสดยกเว้นตัวอย่างกัญชาสายพันธุ์ห้วยลึกและตัวอย่างกัญชา อยู่ในรูปที่มีฤทธิ์เป็นกรด (CBDA และ Δ^9 -THCA) ปริมาณของ CBD และ CBDA ในตัวอย่างกัญชาพบมากกว่าในตัวอย่างกัญชา สำหรับการหาปริมาณของ Δ^9 -THCA พบว่าในตัวอย่างกัญชามีน้อยกว่าในตัวอย่างกัญชา แคนนาบินอยด์ชนิดที่มีฤทธิ์เป็นกรดและมีฤทธิ์เป็นกลางในตัวอย่างกัญชาและกัญชาถูกบ่งชี้ พบว่า แคนนาบินอยด์ชนิดที่มีฤทธิ์เป็นกรดและมีฤทธิ์เป็นกลางทั้งวิถีทางโพรพิลและเพนทิล ถูกพบในตัวอย่างกัญชากว่าในตัวอย่างกัญชากัญชาสายพันธุ์เวียดนาม-1 และตัวอย่างกัญชา