

# บทความวิชาการสำหรับการศึกษาต่อเนื่อง

## สถานเสาวภา สภากาชาดไทย

รหัส : 5003-1-000-003-06-2563

หน่วยกิตการศึกษาต่อเนื่อง : 2.0 หน่วยกิต

วันที่รับรองบทความ : 23 มิถุนายน 2563

วันที่หมดอายุ : 22 มิถุนายน 2564

### เรื่อง

การประยุกต์ใช้การวิเคราะห์เชิงภาพกับเทคนิคโครมาโตกราฟีชนิดแผ่นบางเพื่อการวิเคราะห์เชิงปริมาณ

### ผู้เขียน

ภญ.ปวีณา อู่วัฒนพงษ์ ภญ.อภิญญา กิรติเมธากุล และภก.อนวัช มิตรประทาน

### วัตถุประสงค์เชิงพฤติกรรม

1. เข้าใจหลักการใช้เทคนิคโครมาโตกราฟีชนิดแผ่นบางเพื่อการวิเคราะห์เชิงปริมาณ
2. เข้าใจหลักการประยุกต์ใช้การวิเคราะห์เชิงภาพกับเทคนิคโครมาโตกราฟีชนิดแผ่นบางเพื่อการวิเคราะห์เชิงปริมาณ
3. อธิบายข้อดีและข้อจำกัดของการประยุกต์ใช้การวิเคราะห์เชิงภาพกับเทคนิคโครมาโตกราฟีชนิดแผ่นบางเพื่อการวิเคราะห์เชิงปริมาณได้

### คำสำคัญ

เทคนิคโครมาโตกราฟีชนิดแผ่นบาง, การวิเคราะห์เชิงภาพ, การวิเคราะห์เชิงปริมาณ

### บทคัดย่อ

การวิเคราะห์สารเชิงปริมาณด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีชนิดแผ่นบาง (Thin-layer chromatography, TLC) สามารถทำได้หลายวิธี วิธีหนึ่งที่ได้รับคามนิยมมาก คือ การใช้เทคนิคโครมาโตกราฟีชนิดแผ่นบางร่วมกับเครื่องเดนซิโตมิเตอร์ (densitometer) เนื่องจากให้ผลการวิเคราะห์ที่น่าเชื่อถือ ถูกต้อง แม่นยำสูง แต่มีข้อจำกัดคือ เครื่องเดนซิโตมิเตอร์มีราคาค่อนข้างสูง จึงได้มีการประยุกต์ใช้การวิเคราะห์เชิงภาพ (image analysis) ร่วมกับเทคนิคโครมาโตกราฟีชนิดแผ่นบางเพื่อวิเคราะห์สารเชิงปริมาณ ซึ่งมีข้อดีคือ เป็นวิธีที่ทำได้ง่าย สะดวก รวดเร็ว และใช้เครื่องมือที่หาได้ง่าย ขั้นตอนการวิเคราะห์ด้วยวิธีนี้ประกอบด้วย การแยกสารด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีชนิดแผ่นบาง การบันทึกภาพด้วยเครื่องสแกนเนอร์หรือกล้องดิจิทัล การวิเคราะห์เชิงภาพด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ภาพ และการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์

## การประยุกต์ใช้การวิเคราะห์เชิงภาพกับเทคนิคโครมาโตกราฟีชนิดแผ่นบาง เพื่อการวิเคราะห์เชิงปริมาณ

ภญ.ปวีณา อู่วัฒนพงศ์ ภญ.อภิญญา กิรีติเมธากุล

และภก.อนวัช มิตรประทาน

### วัตถุประสงค์เชิงพฤติกรรม

1. เข้าใจหลักการใช้เทคนิคโครมาโตกราฟีชนิดแผ่นบางเพื่อการวิเคราะห์เชิงปริมาณ
2. เข้าใจหลักการประยุกต์ใช้การวิเคราะห์เชิงภาพกับเทคนิคโครมาโตกราฟีชนิดแผ่นบางเพื่อการวิเคราะห์เชิงปริมาณ
3. อธิบายข้อดีและข้อจำกัดของการประยุกต์ใช้การวิเคราะห์เชิงภาพกับเทคนิคโครมาโตกราฟีชนิดแผ่นบางเพื่อการวิเคราะห์เชิงปริมาณ

### บทคัดย่อ

การวิเคราะห์สารเชิงปริมาณด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีชนิดแผ่นบาง (Thin-layer chromatography, TLC) สามารถทำได้หลายวิธี วิธีหนึ่งที่มีความนิยมมาก คือ การใช้เทคนิคโครมาโตกราฟีชนิดแผ่นบางร่วมกับเครื่องเดนซิโตมิเตอร์ (densitometer) เนื่องจากให้ผลการวิเคราะห์ที่น่าเชื่อถือ ถูกต้อง แม่นยำสูง แต่มีข้อจำกัดคือ เครื่องเดนซิโตมิเตอร์มีราคาค่อนข้างสูง จึงได้มีการประยุกต์ใช้การวิเคราะห์เชิงภาพ (image analysis) ร่วมกับเทคนิคโครมาโตกราฟีชนิดแผ่นบางเพื่อวิเคราะห์สารเชิงปริมาณ ซึ่งมีข้อดีคือ เป็นวิธีที่ทำได้ง่าย สะดวก รวดเร็ว และใช้เครื่องมือที่ทำได้ง่าย ขั้นตอนการวิเคราะห์ด้วยวิธีนี้ประกอบด้วย การแยกสารด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีชนิดแผ่นบาง การบันทึกภาพด้วยเครื่องสแกนเนอร์หรือกล้องดิจิทัล การวิเคราะห์เชิงภาพด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ภาพ และการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์

### บทนำ

เทคนิคโครมาโตกราฟีชนิดแผ่นบาง (Thin-layer chromatography, TLC) เป็นเทคนิคที่นิยมนำมาใช้ในงานควบคุมคุณภาพ เช่น การพิสูจน์เอกลักษณ์ของเภสัชภัณฑ์ วัตถุพิษทางธรรมชาติและสมุนไพรใน Thai herbal pharmacopoeia (THP) รวมถึงสามารถตรวจสอบสารปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ ได้ เทคนิคโครมาโตกราฟีชนิดแผ่นบางมีข้อดีหลายอย่าง คือ เป็นวิธีที่สามารถทำได้ง่าย สะดวก รวดเร็ว เครื่องมือที่ใช้มีราคาไม่แพง และที่สำคัญคือ การเตรียมตัวอย่างไม่ยุ่งยากและใช้ปริมาณตัวอย่างน้อย อีกทั้งสามารถวิเคราะห์สารตัวอย่างได้หลายชนิดพร้อมกันในครั้งเดียว<sup>1</sup> นอกจากนี้เทคนิคโครมาโตกราฟีชนิดแผ่นบางยังสามารถนำมาประยุกต์เพื่อวิเคราะห์เชิงปริมาณได้ เพียงแต่วิธีนี้มีความไวต่ำ ความถูกต้องและความแม่นยำค่อนข้างน้อย ทำให้ผลการทดลองไม่น่าเชื่อถือ จึงเกิดการพัฒนาโดยนำมาใช้ร่วมกับเครื่องมืออื่น เช่น เครื่องเดนซิโตมิเตอร์ (densitometer) โดยจะวิเคราะห์ปริมาณของสารตัวอย่างจากการวัดค่าการดูดกลืนแสง หรือค่าการเรืองแสงที่ความยาวคลื่นต่าง ๆ เทียบกับพื้นหลังและแสดงผลออกมาเป็นโครมาโตแกรม

เครื่องเดนสิโตมิเตอร์ (densitometer) ได้มีการพัฒนาออกสู่ท้องตลาดจากหลากหลายบริษัท เช่น CAMAG TLC scanner 3, CAMAG Videodensitometer และ AR2i Chrolmage flatbed scanner เป็นต้น<sup>2</sup> วิธีการวิเคราะห์หาปริมาณสารตัวอย่างทำได้โดย

1. เตรียมสารตัวอย่าง คือ ทำการละลายตัวอย่างให้อยู่ในรูปสารละลาย
2. การจุดสารตัวอย่างลงบนแผ่น TLC คือ ทำการจุดสารลงบนแผ่น TLC ในปริมาณที่กำหนด เช่น การจุดสารตัวอย่างโดยใช้หลอดแคปิลลารี หรือเครื่อง Linomat 5
3. การเตรียม mobile phase คือ การผสม mobile phase ในอัตราส่วนที่กำหนด แล้วปล่อยให้อิมมัลชันบริเวณภาชนะที่เตรียมไว้
4. การพัฒนาให้เกิดการแยกสารบนแผ่น TLC คือ การนำแผ่น TLC ที่ทำการจุดสารตัวอย่างเรียบร้อยแล้วมาวางในภาชนะที่อิมมัลชันด้วยตัวทำละลายที่เตรียมไว้ เมื่อตัวทำละลายเคลื่อนไปจนถึงเกือบขอบบนให้นำแผ่น TLC ออกพร้อมกับขีดแนวของตัวทำละลาย (Solvent front) ก่อนที่ตัวทำละลายจะแห้ง เนื่องจากมีผลต่อค่า  $R_f$
5. การหาตำแหน่งของสารตัวอย่าง คือ การคำนวณหาค่า  $R_f$  ซึ่งเป็นค่าเฉพาะตัวของสาร มีวิธีการคำนวณดังนี้

$$R_f = \frac{\text{ระยะที่สารตัวอย่างเคลื่อนที่}}{\text{ระยะที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่}}$$

6. การพิสูจน์เอกลักษณ์ คือ การเปรียบเทียบค่า  $R_f$  กับสารมาตรฐาน ซึ่งหากเป็นสารตัวเดียวกันจะต้องมีค่า  $R_f$  เท่ากันเมื่อทดสอบในสภาวะเดียวกัน
7. การเก็บข้อมูล คือ การใช้เครื่องเดนสิโตมิเตอร์ในการตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสง และค่าการเรืองแสงในจุดสารตัวอย่างที่สนใจ
8. การสร้าง densitometric chromatogram คือ การนำข้อมูลค่าการดูดกลืนแสง และค่าการเรืองแสงของสารตัวอย่างมาสร้างโครมาโตแกรม

โดยการวิเคราะห์ปริมาณสารจะถูกคำนวณจากกราฟมาตรฐานที่สร้างจากความสัมพันธ์ระหว่างความสูงของพีคที่เกิดจากการวัดค่าการดูดกลืนแสง หรือค่าการเรืองแสง และน้ำหนักของสารตัวอย่าง จะเห็นได้ว่าการใช้เทคนิคโครมาโตกราฟฟีซินิตแผ่นบางร่วมกับเครื่องเดนสิโตมิเตอร์มีข้อดีหลากหลาย ได้แก่ เป็นวิธีที่สามารถทำได้ง่าย มีความไว ความถูกต้อง และความแม่นยำสูง ทำให้มีความน่าเชื่อถือของข้อมูลที่ตี แต่เครื่องเดนสิโตมิเตอร์มีราคาแพงจึงอาจทำให้เป็นข้อจำกัดของวิธีนี้

ปัจจุบันมีการใช้เทคนิคโครมาโตกราฟฟีซินิตแผ่นบางร่วมกับเครื่องเดนสิโตมิเตอร์อย่างแพร่หลาย ทั้งในด้านการวิเคราะห์เชิงคุณภาพและวิเคราะห์เชิงปริมาณ ตัวอย่างเช่นงานวิจัยเรื่อง TLC-densitometric method for qualitative analysis of betamethasone and its related compounds in pharmaceutical preparations ปี 2014 ได้นำเทคนิคโครมาโตกราฟฟีซินิตแผ่นบางร่วมกับเครื่องเดนสิโตมิเตอร์ในการแยกและพิสูจน์เอกลักษณ์

ของ betamethasone และอนุพันธ์ของ betamethasone เพื่อควบคุมคุณภาพผลิตภัณฑ์ก่อนออกสู่ท้องตลาด ซึ่งวิธีนี้สามารถใช้ได้จริงเนื่องจากผ่านข้อกำหนดตามมาตรฐาน British pharmacopoeia (BP)<sup>3</sup>

### การประยุกต์ใช้การวิเคราะห์เชิงภาพกับเทคนิคโครมาโตกราฟีชนิดแผ่นบาง

การวิเคราะห์สารเชิงปริมาณในปัจจุบันได้มีการนำเทคนิคการวิเคราะห์เชิงภาพมาประยุกต์ใช้ร่วมกับเทคนิคโครมาโตกราฟีชนิดแผ่นบาง แทนการใช้การวิเคราะห์ด้วยเครื่องเดนสิโตมิเตอร์ เนื่องจากเป็นวิธีที่ทำได้ง่าย และไม่ต้องใช้เครื่องมือขั้นสูงที่ต้องอาศัยความเชี่ยวชาญ<sup>1</sup> โดยการประยุกต์ใช้การวิเคราะห์เชิงภาพกับโครมาโตกราฟีชนิดแผ่นบางสำหรับการวิเคราะห์สารเชิงปริมาณมีขั้นตอน ดังต่อไปนี้

#### 1. การแยกสารด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีชนิดแผ่นบาง

การแยกสารด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีชนิดแผ่นบางเริ่มจากการเตรียมสารตัวอย่าง การเลือกเฟสคงที่และเฟสเคลื่อนที่ การแต้มสารตัวอย่าง การแยกของสารบนแผ่น TLC และการตรวจสอบตำแหน่งสาร ซึ่งการเลือกเฟสคงที่และเฟสเคลื่อนที่เป็นขั้นตอนที่สำคัญที่สุด เนื่องจากเฟสคงที่และเฟสเคลื่อนที่ที่เลือกใช้ต้องสามารถแยกสารที่ต้องการวิเคราะห์ออกจากสารอื่นได้ดีและสามารถตรวจสอบตำแหน่งของสารนั้นบนแผ่น TLC ได้ชัดเจน

#### 2. การบันทึกภาพด้วยเครื่องสแกนเนอร์หรือกล้องดิจิทัล

การบันทึกภาพสามารถทำได้ด้วยเครื่องสแกนเนอร์หรือกล้องดิจิทัล ซึ่งมีข้อดี คือ ทำได้อย่างรวดเร็ว ภาพที่บันทึกได้มีความเสมือนจริง และสามารถเก็บภาพเป็นไฟล์อิเล็กทรอนิกส์ได้ การบันทึกภาพด้วยเครื่องสแกนเนอร์มีข้อดีเหนือกว่าการบันทึกภาพด้วยกล้องดิจิทัล คือ แสงที่ฉายลงบนแผ่น TLC มีความสม่ำเสมอทั่วทั้งแผ่น เพราะถ้าแผ่น TLC ได้รับแสงไม่ทั่วถึง ทำให้ไม่สามารถนำภาพมาใช้วิเคราะห์ด้วยโปรแกรมวิเคราะห์เชิงภาพได้อย่างถูกต้อง แต่การบันทึกภาพด้วยเครื่องสแกนเนอร์มีข้อจำกัด คือ เครื่องสแกนเนอร์บันทึกภาพโดยใช้แสงขาว จึงเหมาะกับการบันทึกภาพตำแหน่งสารที่มองเห็นได้ด้วยตาเท่านั้น ไม่สามารถบันทึกภาพตำแหน่งสารภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตได้<sup>1</sup>

#### 3. การวิเคราะห์เชิงภาพด้วยโปรแกรมวิเคราะห์เชิงภาพ

ปัจจุบัน มีโปรแกรมวิเคราะห์เชิงภาพที่สามารถนำมาประยุกต์ใช้ร่วมกับเทคนิคโครมาโตกราฟีชนิดแผ่นบางให้เลือกใช้เป็นจำนวนมาก ทั้งโปรแกรมที่สามารถดาวน์โหลดได้ฟรีแบบไม่มีค่าใช้จ่ายและโปรแกรมที่ต้องเสียค่าใช้จ่าย เช่น โปรแกรม ImageJ, โปรแกรม TLC Analyzer, โปรแกรม Sorbfil TLC videodensitometer และโปรแกรม JustTLC เป็นต้น ซึ่งแต่ละโปรแกรมมีข้อดีและข้อจำกัดที่ต่างกัน ในที่นี้ขอยกตัวอย่างการใช้โปรแกรม ImageJ ซึ่งเป็นโปรแกรมรุ่นแรก ๆ ที่ถูกพัฒนาขึ้น และยังคงได้รับความนิยมค่อนข้างมากสำหรับการวิเคราะห์สารเชิงปริมาณ โปรแกรม ImageJ เป็นโปรแกรมที่สามารถดาวน์โหลดได้ฟรีจากเว็บไซต์ของ U.S. National institutes of health (NIH) ซึ่งใช้ได้ทั้งกับระบบปฏิบัติการ Windows และ Mac OS<sup>2</sup> ปัจจุบันมีการศึกษาจำนวนมากที่นำโปรแกรม ImageJ มาประยุกต์ใช้กับเทคนิคโครมาโตกราฟีชนิดแผ่นบาง เช่น การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของพืช *Rosa rugosa* Thunb. โดยใช้ DPPH เป็น detecting reagent พบว่า การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยการวิเคราะห์เชิงภาพร่วมกับเทคนิคโครมาโตกราฟีชนิดแผ่นบางเป็นวิธีที่ทำได้ง่าย สะดวก รวดเร็ว มี

ประสิทธิภาพและค่าใช้จ่ายไม่สูง เหมาะสำหรับการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสมุนไพรและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ<sup>4</sup>

#### 4. การทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์

การพัฒนาวิธีวิเคราะห์สารเชิงปริมาณ โดยการประยุกต์ใช้การวิเคราะห์เชิงภาพร่วมกับเทคนิคโครมาโตกราฟีชนิดแผ่นบาง จะต้องมีการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (analytical method validation) เพื่อประเมินว่า วิธีวิเคราะห์นั้นมีความเหมาะสม สามารถใช้วิเคราะห์สารตัวอย่างได้ถูกต้องแม่นยำ และเชื่อถือได้ โดยประเมินในหัวข้อต่าง ๆ ได้แก่

- ความเที่ยง (accuracy)
- ความแม่นยำ (precision)
- ความจำเพาะ (specificity)
- ปริมาณต่ำสุดที่ตรวจพบได้ (limit of detection)
- ปริมาณต่ำสุดที่สามารถตรวจหาค่าได้ในเชิงปริมาณ (limit of quantitation)
- ความเป็นเส้นตรง (linearity)
- พิสัย (range)

ทั้งนี้การทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ไม่จำเป็นต้องทำครบทุกหัวข้อ การจะทำหัวข้อใดบ้างขึ้นอยู่กับประเภทของวิธีวิเคราะห์

นอกจากนี้มักมีการศึกษาเปรียบเทียบผลที่ได้จากการวิเคราะห์เชิงปริมาณด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีชนิดแผ่นบางร่วมกับการวิเคราะห์เชิงภาพ กับผลที่ได้จากการวิเคราะห์เชิงปริมาณด้วยเครื่องเดินสีโตมิเตอร์ เช่น การศึกษาเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์หาปริมาณสาร **γ**-oryzanol ในน้ำมันรำข้าวด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีชนิดแผ่นบางร่วมกับการวิเคราะห์เชิงภาพ เทียบกับผลการวิเคราะห์ที่ได้จากเครื่องเดินสีโตมิเตอร์ พบว่า ค่าพารามิเตอร์จากการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ทั้งสองวิธีมีค่าใกล้เคียงกัน และยังพบว่า ค่าเฉลี่ยของปริมาณสาร **γ**-oryzanol ที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีชนิดแผ่นบางร่วมกับการวิเคราะห์เชิงภาพ และค่าเฉลี่ยของปริมาณสาร **γ**-oryzanol ที่วิเคราะห์ด้วยเครื่องเดินสีโตมิเตอร์ให้ผลไม่แตกต่างกัน<sup>5</sup>

จากบทความข้างต้น การประยุกต์ใช้การวิเคราะห์เชิงภาพร่วมกับเทคนิคโครมาโตกราฟีชนิดแผ่นบางเป็นอีกวิธีหนึ่งที่น่าสนใจสำหรับการวิเคราะห์สารเชิงปริมาณ เนื่องจากมีข้อดี คือ เป็นวิธีที่ทำได้ง่าย สะดวก รวดเร็ว สามารถใช้เครื่องมือที่หาได้ง่ายและไม่ต้องใช้ผู้เชี่ยวชาญในการวิเคราะห์ แต่วิธีนี้มีข้อจำกัดในเรื่องความเที่ยง ความแม่นยำ และความจำเพาะของวิธีวิเคราะห์<sup>6</sup> อย่างไรก็ตาม หากมีการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ได้อย่างเหมาะสม จะทำให้ได้วิธีวิเคราะห์ที่มีความเที่ยง ความแม่นยำ และความจำเพาะ ไม่แตกต่างกับการวิเคราะห์สารเชิงปริมาณด้วยเครื่องเดินสีโตมิเตอร์<sup>1</sup> ดังนั้นการประยุกต์ใช้การวิเคราะห์เชิงภาพร่วมกับเทคนิคโครมาโตกราฟีชนิดแผ่นบางจึงอาจเป็นประโยชน์สำหรับโรงงานขนาดเล็กที่มีการลงทุนไม่มากหรืองานวิเคราะห์เชิงปริมาณที่ไม่ต้องการความถูกต้องและความแม่นยำสูง<sup>5</sup>

## รายการอ้างอิง

1. Phattanawasin P, Sotanaphun U, Sriphong L, Burana-Osot J. Thin-layer chromatography and image analysis for quantitation. *Thai bulletin of pharmaceutical sciences*. 2018;13:79-92.
2. Popovic N, Sherma J. Comparative study of the quantification of thin-layer chromatograms of a model dye using three types of commercial densitometers and image analysis with imageJ. *Trends in chromatography*. 2014;9:21-28.
3. Dolowy M, Pyka A. TLC--densitometric method for qualitative analysis of betamethasone and its related compounds in pharmaceutical preparations. *Acta poloniae pharmaceutica*. 2014;71(6):922-32.
4. Olech M, Komsta L, Nowak R, Ciesla L, Waksmundzka-Hajnos M. Investigation of antiradical activity of plant material by thin-layer chromatography with image processing. *Food Chemistry*. 2012;132:549-53.
5. Sakunpak A, Suksaeree J, Monton C, Pathompak P, Kraisintu K. Quantitative analysis of  $\gamma$ -oryzanol content in cold pressed rice bran oil by TLC-image analysis method. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 2014;4:119-23.
6. Tie-xin T, Hong W. An image analysis system for thin-layer chromatography quantification and its validation. *Journal of chromatographic science*. 2008;46:560-564.