



โครมาโทกราฟีแบบชั้นบางและการวิเคราะห์เชิงภาพเพื่อการวิเคราะห์เชิงปริมาณ

ปนัดดา พัฒนาศิน^{1,*}, อุทัย โสธนะพันธ์², ลาวัลย์ ศรีพงษ์¹, จันทนา บุรณโอสถ¹, จริญญา อัครวรินทร์³,
อรัญญา นันทนากรณ¹

¹ ภาควิชาเภสัชเคมี คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร วิทยาเขตพระราชวังสนามจันทร์ นครปฐม

² ภาควิชาเภสัชเวช คณะเภสัชศาสตร์ วิทยาเขตพระราชวังสนามจันทร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร นครปฐม

³ ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 3 ชลบุรี

* ติดต่อผู้พิมพ์: phattanawasin_p@su.ac.th

บทคัดย่อ

การใช้วิธีโครมาโทกราฟีแบบชั้นบาง (thin-layer chromatography, TLC) ร่วมกับเทคนิคการวิเคราะห์เชิงภาพได้นำมาประยุกต์ใช้สำหรับการหาปริมาณสารสำคัญโดยเฉพาะในตัวอย่างประเภทสมุนไพรและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ ขั้นตอนโดยรวมของวิธีประกอบด้วย การแยกสารที่ต้องการวิเคราะห์หาปริมาณออกจากสารอื่นและตรวจพบได้อย่างชัดเจนบนแผ่น TLC การบันทึกและเก็บข้อมูลภาพของแผ่น TLC ด้วยเครื่องสแกนเนอร์หรือกล้องดิจิทัล การวิเคราะห์ภาพ TLC เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มสีกับปริมาณสารแต่ละจุดด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ที่เหมาะสม และการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี ข้อดีหลักของวิธีนี้คือ ความสะดวก ความรวดเร็ว การใช้อุปกรณ์และเครื่องมือที่จัดหาได้ง่าย ในราคาไม่สูงมาก และหากมีการพัฒนาวิธีการอย่างเหมาะสมยังพบว่าผลการวิเคราะห์ที่ได้มีความถูกต้อง แม่นยำ และไม่แตกต่างจากผลการวิเคราะห์ด้วยเครื่องเดนสิโตมิเตอร์หรือเครื่องมือขั้นสูงประเภทอื่น ๆ

คำสำคัญ: โครมาโทกราฟีแบบชั้นบาง, การวิเคราะห์เชิงภาพ, การวิเคราะห์เชิงปริมาณ

THIN-LAYER CHROMATOGRAPHY AND IMAGE ANALYSIS FOR QUANTITATION

Panadda Phattanawasin^{1,*}, Uthai Sotanaphun², Lawan Sriphong¹, Jankana Burana-Osot¹,
Jariya Akkarawarantorn³, Arunya Nantanakorn¹

¹ Department of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Silpakorn University, Sanamchandra Palace Campus, Nakhon Pathom

² Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Silpakorn University, Sanamchandra Palace Campus, Nakhon Pathom

³ Regional Medical Sciences Center 3, Chonburi

* Corresponding author: phattanawasin_p@su.ac.th

ABSTRACT

The use of thin-layer chromatography (TLC) combined with image analysis is applied for the quantitation of active ingredient especially in herbal samples and natural products. The overall process of the technique includes the separation of the compound to be quantified and clearly detected on a TLC plate, an image record of the TLC plate with a scanner or a digital camera, TLC-image analysis for relative correlations between color intensity and quantity of a compound in each spot using suitable computer programs, and method validation. The advantages of this method are convenience, rapidness and the use of simple and low cost equipment. Also, if properly developed, the analytical results obtained from this method are shown to be accurate, precise and no different from the results determined using a densitometer or other advanced instrument.

Keywords: thin-layer chromatography, image analysis, quantitation

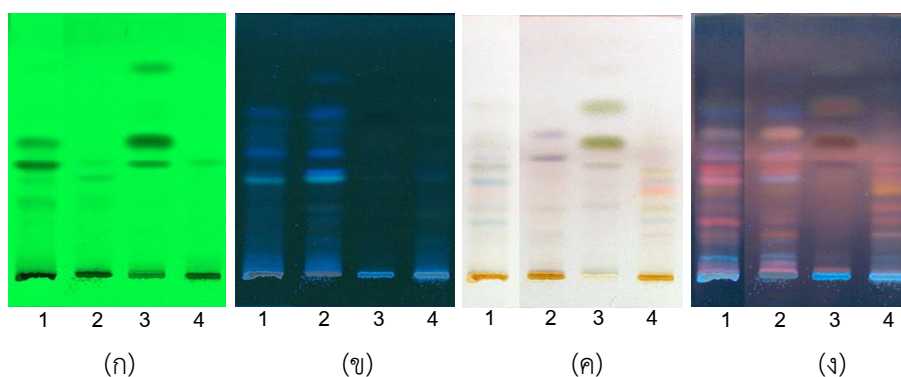
บทนำ

โครมาโทกราฟีแบบชั้นบาง (thin-layer chromatography, TLC) เป็นหนึ่งในเทคนิคทางโครมาโทกราฟีที่นิยมนำมาใช้ในงานควบคุมคุณภาพ โดยเฉพาะงานที่เกี่ยวข้องกับการพิสูจน์เอกลักษณ์ของวัตถุบิตทางยา เกสซ์ภัณฑ์ สมุนไพรและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ รวมไปถึงการตรวจสอบหาสารปนเปื้อนและสารปลอมปนในตัวอย่างต่าง ๆ วิธี TLC มีข้อเด่นหลายประการ เช่น ไม่ต้องพึ่งการใช้เครื่องมือราคาแพง เตรียมตัวอย่างไม่ยุ่งยากและใช้ปริมาณเพียงเล็กน้อย สามารถวิเคราะห์ตัวอย่างได้หลายชนิดในคราวเดียว และยังสามารถแสดงผลการแยกสารในลักษณะข้อมูลภาพที่มีความชัดเจนและครอบคลุมองค์ประกอบต่าง ๆ ที่มีอยู่ในตัวอย่างขึ้นกับวิธีการตรวจสอบที่ใช้ เช่น การตรวจสอบภายใต้แสงธรรมชาติ หรือภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต หรือโดยการทำปฏิกิริยากับสารก่อสี (รูปที่ 1)

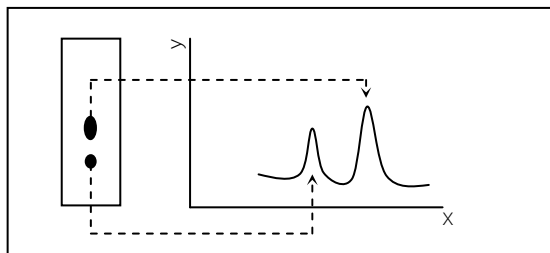
นอกจากการใช้วิธี TLC ในงานวิเคราะห์เชิงคุณภาพแล้ว วิธีนี้ยังสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในงานวิเคราะห์เชิงปริมาณได้ โดยเฉพาะในการวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญในตัวอย่างสมุนไพรหรือผลิตภัณฑ์

ธรรมชาติ การวิเคราะห์เชิงปริมาณโดยวิธี TLC มีตั้งแต่วิธีที่ทำได้โดยง่าย เช่น วิธีการประเมินด้วยสายตา วิธีการวัดขนาดพื้นที่ของสารแต่ละจุดด้วยการใช้กระดาษกราฟ แต่วิธีเหล่านี้มีความไวต่ำ ความถูกต้องและแม่นยำค่อนข้างน้อย ผลการวิเคราะห์ที่ได้ไม่ค่อยน่าเชื่อถือ ในงานวิเคราะห์เชิงปริมาณที่ต้องการความน่าเชื่อถือ ถูกต้องและแม่นยำสูง จำเป็นต้องมีการใช้เครื่องมืออื่นร่วมด้วย¹ เช่น เครื่องเดนสิโตมิเตอร์ (densitometer) การวิเคราะห์เชิงปริมาณบนแผ่น TLC ด้วยเครื่องมือนี้พัฒนามาตั้งแต่ราวปี พ.ศ. 2503² โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงหรือการเรืองแสงของสารแต่ละจุดบนแผ่น TLC ที่ความยาวคลื่นต่าง ๆ ตั้งแต่ช่วงคลื่นอัลตราไวโอเล็ตไปจนถึงช่วงคลื่นแสงขาว เทียบกับบริเวณพื้นหลัง และแสดงผลออกมาในรูปพิกโครมาโทแกรม ซึ่งพื้นที่ใต้พิกของแต่ละสารขึ้นกับค่าความเข้มของการดูดกลืนแสงหรือการเรืองแสงของสารที่มีในแต่ละจุด (รูปที่ 2)

ที่ผ่านมา เครื่องเดนสิโตมิเตอร์ที่ผลิตโดยบริษัท CAMAG เช่น รุ่น CAMAG TLC Scanner 3 และ 4 หรือโดยบริษัท Desaga เช่น รุ่น Desaga CD60 เป็นที่รู้จักและมีปรากฏอย่างแพร่หลายในบทความวิจัยที่เกี่ยวข้อง



รูปที่ 1 TLC ของสารสกัดเดี่ยวจากใบมะกรูด (1) เหง้าข่า (2) ต้นตะไคร้ (3) และสารสกัดผสมของสมุนไพรทั้งสามต้น (4) ตรวจสอบโดย (ก) ได้แสงอัลตราไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่น 254 และ (ข) 366 นาโนเมตร (ค) ใช้สารก่อสีพารา-แอนนิซาลดีไฮด์ (p-anisaldehyde) และ (ง) ได้แสงอัลตราไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่น 366 นาโนเมตรหลังจากทำปฏิกิริยากับสารก่อสีพารา-แอนนิซาลดีไฮด์ (วัฏภาคคงที่ คือ แผ่น TLC ชนิด silica gel 60 F₂₅₄ และวัฏภาคเคลื่อนที่ คือ toluene-acetone-formic acid, 7:3:0.1)



รูปที่ 2 โครมาโทแกรมแสดงผลการวิเคราะห์สารบนแผ่น TLC โดยเครื่องเดนสิโตมิเตอร์ (X = ระยะทางที่สารเคลื่อนที่บนแผ่น TLC; Y = ความเข้มแสง (optical density) เทียบกับบริเวณพื้นหลัง)

กับการวิเคราะห์สารเชิงปริมาณบนแผ่น TLC โดยเครื่องในรุ่นหลัง เช่น CAMAG TLC Scanner 4 ได้รับการพัฒนาให้มีประสิทธิภาพสูงขึ้นในด้านต่าง ๆ อาทิเช่น ความสามารถในการตรวจวัดสัญญาณในช่วงคลื่นแสงที่กว้างขึ้น การเพิ่มอัตราส่วนสัญญาณที่ต้องการต่อสัญญาณรบกวน (Signal-to-noise ratio) และความสะดวกในการใช้งาน เป็นต้น² อย่างไรก็ตาม เครื่องเดนสิโตมิเตอร์ที่ผลิตและวางจำหน่ายอยู่ในปัจจุบันมีราคาค่อนข้างสูงไม่ต่ำกว่าหลักล้านบาท หน่วยงานขนาดเล็กที่มีความสนใจในการพัฒนาวิธีวิเคราะห์เชิงปริมาณโดยวิธี TLC อาจมีข้อจำกัดในการจัดหาเครื่องมือประเภทนี้เพื่อนำมาทดลองใช้ในงานพัฒนาวิธีวิเคราะห์

นอกเหนือจากการใช้เครื่องเดนสิโตมิเตอร์ดังข้างต้น การหาปริมาณสารบนแผ่น TLC ยังสามารถทำได้โดยอาศัยเทคนิคเชิงภาพ ความน่าเชื่อถือ ความถูกต้องและความแม่นยำของวิธีนี้ส่วนหนึ่งขึ้นอยู่กับอุปกรณ์ที่ใช้ในการบันทึกภาพและโปรแกรมคอมพิวเตอร์ที่นำมาใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูลภาพ

ทั้งนี้ในช่วงแรกของการพัฒนาวิธีการวิเคราะห์สารเชิงปริมาณบนแผ่น TLC โดยอาศัยเทคนิคเชิงภาพ อุปกรณ์ที่ใช้ในการบันทึกภาพและโปรแกรมการวิเคราะห์เชิงภาพอาจมีความสามารถค่อนข้างจำกัดในการตรวจแยกความแตกต่างของความเข้มสีระหว่างจุดสารที่สนใจกับพื้นหลัง ทำให้ผลการวิเคราะห์ที่ได้อาจมีความแม่นยำน้อยกว่าเมื่อเทียบกับการใช้เครื่องเดนสิโตมิเตอร์³ อย่างไรก็ตาม

ในช่วงทศวรรษที่ผ่านมา เทคโนโลยี เครื่องมือและอุปกรณ์ต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการถ่ายภาพ รวมไปถึงโปรแกรมที่ใช้ในงานวิเคราะห์เชิงภาพได้มีการพัฒนาอย่างมาก กล้องดิจิทัลและเครื่องสแกนเนอร์คุณภาพสูงที่มีความละเอียดและคมชัดในการเก็บข้อมูลภาพสามารถจัดซื้อได้ในราคาที่ถูกลง รวมไปถึงโปรแกรมที่ใช้ในการวิเคราะห์เชิงภาพยังสามารถดาวน์โหลดได้แบบไม่มีค่าใช้จ่ายจากบางเว็บไซต์

การที่อุปกรณ์และโปรแกรมที่เกี่ยวข้องกับการวิเคราะห์เชิงภาพมีประสิทธิภาพสูงขึ้นในราคาที่ถูกลงส่งผลดีต่อการพัฒนาวิธีวิเคราะห์สารเชิงปริมาณบนแผ่น TLC โดยอาศัยเทคนิคเชิงภาพ แม้ว่าการเก็บข้อมูลภาพด้วยกล้องดิจิทัลจะเหมาะสำหรับการบันทึกภาพของแผ่น TLC ที่ปรากฏจุดของสารที่มีสี หรือการถ่ายภาพภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตได้เฉพาะบางความยาวคลื่น เช่นที่ 254 และ 366 นาโนเมตร ไม่สามารถบันทึกข้อมูลภาพที่ความยาวคลื่นอื่น ๆ และหลากหลายได้มากเท่ากับการใช้เครื่องเดนสิโตมิเตอร์ แต่ข้อเด่นประการสำคัญของการวิเคราะห์สารเชิงปริมาณบนแผ่น TLC โดยอาศัยเทคนิคเชิงภาพ คือ เครื่องมือและอุปกรณ์โดยรวมสามารถจัดหาได้ในราคาที่ไม่สูงมาก ความไวในการเก็บข้อมูลภาพทั้งแผ่นทำได้อย่างรวดเร็วเมื่อเทียบกับการใช้เครื่องเดนสิโตมิเตอร์ เนื่องจากในการเก็บข้อมูลด้วยเครื่องเดนสิโตมิเตอร์ เครื่องจะปล่อยแสงออกมาทีละความยาวคลื่น โดยปล่อยเป็นแถบช่องลำแสงเล็ก ๆ ที่เคลื่อนไปเรื่อย ๆ บนแต่ละแถว ทำให้ต้องใช้เวลาในการสแกนเก็บข้อมูลทั้งหมดบนแผ่น TLC

ในขณะที่การเก็บข้อมูลด้วยกล้องดิจิทัลหรือเครื่องสแกนเนอร์จะสามารถบันทึกข้อมูลที่เดียวได้ทั่วทั้งแผ่นและทุกแถวไปได้พร้อมกัน จัดเก็บเป็นไฟล์ภาพที่สามารถเรียกดูและใช้เป็นภาพอ้างอิงเห็นรายละเอียดการแยกแถบสารต่าง ๆ ในแต่ละแถวได้ด้วยตา⁴ นอกจากนี้ยังสามารถนำไฟล์ข้อมูลภาพนี้มาวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรมที่เหมาะสมเพื่อดูความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มสีกับปริมาณสารในแต่ละจุด

ในบทความนี้จะกล่าวถึง วิธี TLC และการวิเคราะห์เชิงภาพเพื่อนำมาใช้ในการหาปริมาณ เนื้อหาครอบคลุมถึงอุปกรณ์ที่จำเป็นและโปรแกรมที่นิยมนำมาใช้วิเคราะห์ข้อมูลภาพ โดยสอดแทรกตัวอย่างการประยุกต์ใช้ในงานที่เกี่ยวข้องกับการวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญในตัวอย่างสมุนไพรหรือผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ เพื่อให้ผู้ที่สนใจเห็นแนวทางในการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ได้อย่างเหมาะสมกับลักษณะของตัวอย่างและทรัพยากรที่มี

การวิเคราะห์สารเชิงปริมาณด้วยวิธี TLC โดยอาศัยเทคนิคเชิงภาพ

ราวปี พ.ศ. 2526 เริ่มมีรายงานการพัฒนาวิธีวิเคราะห์สารเชิงปริมาณบนแผ่น TLC โดยอาศัยเทคนิคเชิงภาพ ซึ่งทำโดยการบันทึกข้อมูลภาพของแผ่น TLC ที่พัฒนาเสร็จแล้วด้วยเครื่องสแกนเนอร์หรือกล้องดิจิทัล และนำข้อมูลภาพที่ได้มาวิเคราะห์เพื่อหาปริมาณสารโดยใช้ซอฟต์แวร์หรือโปรแกรมที่เหมาะสม^{5,6} และอาจมีการใช้คำว่า “วิดีโอ เดนซิโตมิเตอร์ (video densitometer)” เมื่อหมายถึงอุปกรณ์หรือเครื่องมือที่ใช้การเก็บข้อมูลภาพของแผ่น TLC เช่น เครื่อง TLC Visaulizer 2 โดยบริษัท CAMAG และเครื่อง TLC Scanner โดยบริษัท BioDit Technology เพื่อทำการบันทึกภาพที่มีความคมชัดสูงของแผ่น TLC ภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่น 254 หรือ 366 นาโนเมตร หรือภายใต้แสงขาว โดยต้องใช้ซอฟต์แวร์เฉพาะที่มากับเครื่องเพื่อควบคุมการทำงาน โดย

เครื่องมือเหล่านี้มีราคาค่อนข้างสูงและไม่สามารถจัดหาได้ง่ายนัก

อย่างไรก็ตาม ได้มีการศึกษาเป็นจำนวนมากถึงการประยุกต์ใช้อุปกรณ์การบันทึกภาพ เช่น การใช้กล้องถ่ายภาพดิจิทัลและเครื่องสแกนเนอร์ที่ใช้ในสำนักงาน ร่วมกับการใช้โปรแกรมวิเคราะห์ภาพที่สามารถปฏิบัติการได้บนคอมพิวเตอร์ทั่วไป เพื่อนำมาใช้ในการหาปริมาณสารบนแผ่น TLC ขั้นตอนโดยรวมของการวิเคราะห์เชิงปริมาณด้วยวิธี TLC โดยอาศัยเทคนิคเชิงภาพประกอบด้วย การวิเคราะห์แยกสารด้วยวิธี TLC การบันทึกและเก็บข้อมูลภาพ การวิเคราะห์เชิงภาพ และการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี

การวิเคราะห์แยกสารด้วยวิธี TLC

การประยุกต์ใช้วิธี TLC ในงานวิเคราะห์เชิงปริมาณ โดยอาศัยเทคนิคเชิงภาพ ต้องเริ่มจากการมีสภาวะในการวิเคราะห์ที่เหมาะสม⁷ ไม่ว่าจะเป็นขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง การเลือกใช้ชนิดของวัสดุภาชนะที่และวัสดุภาชนะเคลื่อนที่ ขนาดแผ่น วิธีการจุดสาร ระยะทางที่ให้วัสดุภาชนะเคลื่อนที่ไปบนแผ่น วิธีการทำให้แผ่นแห้ง วิธีการตรวจพบสาร ฯลฯ

โดยทั่วไปแล้ว การพัฒนาสภาวะการวิเคราะห์อาจเริ่มจากการค้นคว้าข้อมูลและทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้องกับสารที่สนใจหรือกลุ่มที่มีโครงสร้างใกล้เคียงจากแหล่งต่าง ๆ แล้วอาจทำการพัฒนาเพิ่มเติมหรือปรับเปลี่ยนสภาวะให้เหมาะสมยิ่งขึ้นกับงานที่กำลังทำ ข้อควรพิจารณาที่สำคัญคือ สภาวะการวิเคราะห์ที่นำมาใช้ต้องสามารถแยกสารที่ต้องการหาปริมาณออกจากสารอื่นได้ดีและตรวจพบสารนั้นได้อย่างชัดเจนบนแผ่น TLC โดยมีความเข้มสีเป็นสัดส่วนสัมพันธ์กับปริมาณสาร นอกจากนี้ในการวิเคราะห์สารเชิงปริมาณด้วยวิธี TLC ต้องจุดสารตัวอย่างและสารมาตรฐานที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ (เพื่อนำมาใช้ในการสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างค่าความเข้มสีกับปริมาณสารมาตรฐานที่แต่ละความเข้มข้น) อยู่บนแผ่นเดียวกันเสมอ ไม่สามารถนำข้อมูลของการวิเคราะห์ภาพ

ของสารบนแผ่นอื่นมาใช้ในการหาปริมาณสารตัวอย่างในอีกแผ่นได้ เพราะลักษณะการแยก (เช่น ขนาดของวง ความเข้มสี และความคมชัด) ที่ได้จากแต่ละแผ่นอาจไม่เหมือนกัน รวมทั้งต้องมีการบันทึกวิธีปฏิบัติ สภาพการวิเคราะห์และรายละเอียดทุกขั้นตอนอย่างเป็นระบบและรัดกุมเพื่อให้ผลการวิเคราะห์ที่ได้มีความแม่นยำ

การบันทึกและเก็บข้อมูลภาพ

ดังที่ได้กล่าวไว้แล้วข้างต้น อุปกรณ์ที่สามารถนำมาใช้ในการเก็บข้อมูลภาพสามารถแบ่งได้เป็นสองประเภทหลักคือ กล้องดิจิทัล และ เครื่องสแกนเนอร์ การจับภาพของอุปกรณ์ทั้งสองประเภทจะอาศัยเซนเซอร์ที่มีความไวต่อแสงหรือที่เรียกว่า charge-couple device หรือ CCD ทำหน้าที่รับแสงจากแต่ละพื้นที่ของภาพและเปลี่ยนค่าแสงเป็นสัญญาณแอนะล็อก ส่งเข้าสู่วงจรเพื่อเปลี่ยนค่าแอนะล็อกเป็นสัญญาณดิจิทัล หลังจากนั้นจะมีซอฟต์แวร์ที่ใช้สำหรับแปลงสัญญาณเหล่านั้นกลับมาเป็นภาพบนคอมพิวเตอร์⁸

คุณภาพของข้อมูลภาพที่ได้ขึ้นกับคุณภาพของอุปกรณ์ส่วนต่าง ๆ เช่น เลนส์ เซนเซอร์รับภาพ จอรับแสง และจอแสดงผล สำหรับกล้อง CCD ชนิดที่มีความคมชัดและความละเอียดสูง (high-resolution CCD camera) เช่น กล้องที่มีระดับความลึกสี (bit depth หรือ color depth) 12-16 บิต/สี ยิ่งความลึกสีมาก จำนวนเฉดสีของภาพก็จะมากขึ้นตาม ทำให้ภาพที่ได้มีคุณภาพดีขึ้นด้วย การใช้กล้องที่มีระดับความลึกสีสูงจะสามารถถ่ายภาพแผ่น TLC ภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่น 254 และ 366 นาโนเมตร ได้คมชัดยิ่งขึ้นและสามารถเก็บรายละเอียดของความต่างสีแม้เพียงเล็กน้อยได้ใกล้เคียงกับที่ตาเห็น

เครื่องสแกนเนอร์เป็นอุปกรณ์อีกชนิดที่สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในงานวิเคราะห์เชิงปริมาณด้วยวิธี TLC เนื่องจากมีข้อดีประการสำคัญคือ ราคาไม่สูงมาก ความสว่างของแสงที่ฉายลงบนแผ่น TLC มีความสม่ำเสมอทั่วทั้ง

แผ่นดีกว่าการใช้กล้องดิจิทัล การได้รับแสงที่ไม่ทั่วถึงดี มีดีหรือสว่างไปในบางส่วนโดยเฉพาะบริเวณที่มีจุดของสารตัวอย่างและสารมาตรฐาน จะทำให้ข้อมูลภาพที่ได้ไม่สามารถนำมาใช้ในการวิเคราะห์เชิงปริมาณได้อย่างถูกต้อง อย่างไรก็ตาม แสงที่ให้โดยเครื่องสแกนเนอร์ที่ใช้กันอยู่ทั่วไป เป็นแสงขาว จึงเหมาะสำหรับการบันทึกข้อมูลภาพของแผ่น TLC ที่มีจุดของสารที่ต้องการวิเคราะห์ปรากฏสีเห็นได้ชัดเจนด้วยตา ไม่สามารถใช้เพื่อสแกนเก็บรูปแผ่น TLC ที่วางภายใต้เครื่องฉายแสงอัลตราไวโอเล็ต

การบันทึกภาพไม่ว่าจะด้วยกล้องดิจิทัลหรือเครื่องสแกนเนอร์สามารถทำได้อย่างรวดเร็วนับเป็นข้อเด่นที่สำคัญ โดยเฉพาะในกรณีที่ต้องการวิเคราะห์หาปริมาณสารบนแผ่น TLC ภายหลังจากการทำปฏิกิริยากับสารก่อสี การใช้สารก่อสีบางชนิดอาจพบว่าสีของจุดสารที่ปรากฏบนแผ่นจางลงภายในระยะเวลาไม่นานหลังจากการทำปฏิกิริยา การวิเคราะห์ด้วยเครื่องเดนสิโตมิเตอร์จึงอาจทำได้ค่อนข้างยาก เนื่องจากการที่เครื่องเดนสิโตมิเตอร์ทำการสแกนวิเคราะห์ข้อมูลทีละแถวและค่อนข้างใช้เวลา หากมีจำนวนหลายแถว ค่าความเข้มสีที่วัดได้ในแถวแรก ๆ และแถวช่วงท้าย ๆ อาจแตกต่างกันแม้ว่ามีปริมาณสารเท่ากัน ทำให้เกิดความคลาดเคลื่อนของผลการวิเคราะห์ได้ การวิเคราะห์หาปริมาณสารโดยอาศัยการวิเคราะห์ภาพที่ได้รับการบันทึกไว้ทันทีหลังจากทำปฏิกิริยาก่อสีจึงอาจมีความได้เปรียบในกรณีนี้

ข้อมูลภาพที่ถ่ายด้วยกล้องดิจิทัลหรือโดยการสแกนด้วยเครื่องสแกนเนอร์จะได้รับการบันทึกไว้อย่างถาวรและมีความใกล้เคียงเสมือนดูจากแผ่นจริง และสามารถนำมาวิเคราะห์หาปริมาณสารได้ด้วยการใช้โปรแกรมการวิเคราะห์เชิงภาพที่เหมาะสม อย่างไรก็ตาม เพื่อให้แน่ใจว่ารูปที่ได้มีความคมชัดไม่แตกต่างจากการดูแผ่นด้วยตา การตั้งค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ ที่ใช้ในการถ่ายหรือสแกนภาพ เช่น ค่าความละเอียด (resolution) ค่าสี (colors) ค่าความสว่าง (brightness) ค่าความคมชัด (contrast) ระยะห่างในการตั้งกล้อง ความไวชัดเตอร์ ค่า ISO (ความ

ไวของเซนเซอร์ต่อการรับแสง) ต้องมีการปรับให้เหมาะสม และจัดบันทึกไว้อย่างละเอียด

การเก็บข้อมูลภาพที่ได้ โดยทั่วไปแล้วมักเก็บในรูปแบบไฟล์ JPEG (Joint Photographic Experts Group) หรือ TIFF (Tagged Image File Format) คุณภาพของภาพที่ได้จากไฟล์แต่ละประเภทจะแตกต่างกันออกไป ทั้งในด้านขนาดและการบีบอัดข้อมูล เช่น ไฟล์ภาพแบบ TIFF เป็นไฟล์ภาพที่มีคุณภาพสูง เป็นรูปแบบไฟล์ที่สามารถรองรับการเก็บข้อมูลภาพได้ถึง 16 บิต/สี แต่ไฟล์ที่ได้มักมีขนาดใหญ่มาก การประมวลผลทำได้ช้า รวมทั้งโปรแกรมการวิเคราะห์ภาพที่นิยมใช้กันอยู่ทั่วไป อาจไม่รองรับการทำงานกับไฟล์ภาพที่มีขนาดใหญ่มาก รูปแบบไฟล์อีกประเภทคือ JPEG ซึ่งมีการบีบอัดข้อมูลไฟล์ที่ได้จะมีขนาดเล็กลง จัดเก็บและนำไปใช้งานได้ง่ายขึ้น แต่คุณภาพของภาพอาจลดลงขึ้นกับความละเอียดและขนาดภาพที่ต้องการจัดเก็บ นอกจากนี้ยังอาจเก็บข้อมูลภาพในรูปแบบไฟล์ RAW ซึ่งเป็นไฟล์ข้อมูลดิจิทัลที่ไม่ผ่านการปรับแต่งใด ๆ ทำให้ได้คุณภาพที่แท้จริงจากกล้องตัวนั้น ๆ โดยเฉพาะความลึกสี เมื่อนำไปใช้งานจึงค่อยแปลงไฟล์ RAW ไปเป็นไฟล์ประเภท TIFF หรือ JPEG โดยใช้ซอฟต์แวร์ในการปรับคุณภาพภายหลัง⁹ การเก็บไฟล์ภาพในสกุลอื่น ๆ เช่น BMP (Bitmap) GIF (Graphics Interchange Format) ก็อาจสามารถใช้ได้กับบางโปรแกรม อย่างไรก็ตามในงานที่เกี่ยวข้องกับการหาปริมาณสารด้วยวิธี TLC โดยอาศัยเทคนิคเชิงภาพ มักนิยมใช้ภาพของแผ่น TLC ที่ถูกบันทึกในสกุล JPEG มาใช้ในการวิเคราะห์และประมวลผล

การวิเคราะห์เชิงภาพ

ปัจจุบัน โปรแกรมที่ใช้ในการวิเคราะห์เชิงภาพมีเป็นจำนวนมาก แต่ในที่นี้จะขอลำถึงโปรแกรมที่พบว่ามีรายงานการนำมาประยุกต์ใช้ร่วมกับวิธี TLC ในการหาปริมาณสาร ซึ่งพบว่ามีทั้งประเภทที่สามารถดาวน์โหลดได้ฟรีแบบไม่มีค่าใช้จ่าย และโปรแกรมที่สามารถจัดซื้อได้ในราคาไม่สูงจนเกินไป หรือ ออกแบบมาเฉพาะเพื่อการ

วิเคราะห์ภาพ TLC ซึ่งอาจมีความสะดวกและฟังก์ชันในการใช้งานที่หลากหลายมากขึ้น เช่น โปรแกรม ImageJ โปรแกรม TLC Analyzer โปรแกรม Sorbfil TLC Videodensitometer และ โปรแกรม JustTLC เป็นต้น

โปรแกรม ImageJ เป็นโปรแกรมที่สามารถดาวน์โหลดได้โดยไม่เสียค่าใช้จ่ายจากเว็บไซต์ <https://imagej.nih.gov/ij/download.html>¹⁰ แต่เดิมรู้จักในชื่อ NIH image จัดเป็นโปรแกรมรุ่นแรก ๆ ที่ได้รับการพัฒนาขึ้นเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ภาพ แม้ว่าจะผ่านมาถึง 25 ปีหลังการเปิดตัว โปรแกรม ImageJ ยังคงได้รับความนิยมและมีการพัฒนารูปแบบมาอย่างต่อเนื่องเช่น การเพิ่มชุดของเครื่องมือ (toolbox) จนแตกแขนงออกมาเป็นโปรแกรมต่าง ๆ ตามมา เช่น Fiji, ImageJ2, Icy และ Bio7 เพื่อประยุกต์ใช้ในงานวิเคราะห์ภาพทางวิทยาศาสตร์ประเภทต่าง ๆ¹¹⁻¹⁵ อาทิเช่น ภาพทางชีวการแพทย์ (biomedical images) ภาพจากกล้องจุลทรรศน์ (scanning microscope images) และ ภาพทางดาราศาสตร์ (astronomy images) เป็นต้น

มีรายงานจำนวนมากถึงการประยุกต์ใช้วิธี TLC ร่วมกับโปรแกรม ImageJ เพื่อการวิเคราะห์หาปริมาณสารในตัวอย่างประเภทต่าง ๆ โดยเฉพาะในตัวอย่างสมุนไพร¹⁶⁻²⁵ ข้อมูลภาพ TLC ที่สามารถนำมาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม ImageJ ได้นั้นอาจเป็นภาพสีของแผ่น TLC ที่มีจุดของสารที่สนใจและได้รับการบันทึกภาพไว้ด้วยเครื่องสแกนเนอร์ เช่น การวิเคราะห์หาปริมาณสารกลุ่มเคอร์คูมินในขมิ้นชัน โดยจุดของสารเคอร์คูมินปรากฏเป็นจุดสีเหลืองบนพื้นหลังขาวและแยกออกจากสารอื่นได้อย่างชัดเจนภายใต้สภาวะการวิเคราะห์ที่ใช้¹⁶ หรือการวิเคราะห์หาปริมาณสารแอนโดรกราโฟไลด์ในฟ้าทะลายโจร โดยสารแอนโดรกราโฟไลด์ปรากฏเป็นแถบสีม่วงอมชมพูบนแผ่น TLC โดยการใช้สารกอสี่ฟารา-แอนนิซาลดีไฮด์¹⁷ นอกจากนี้ภาพของแผ่น TLC ภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่น 254 และ 366 นาโนเมตร ที่บันทึกไว้ด้วยกล้องดิจิทัล ก็สามารถนำมาวิเคราะห์ได้ด้วยโปรแกรม ImageJ เช่น

การวิเคราะห์หาปริมาณสารคูมารินในเปลือกชั้นในต้นชะลูด สารนี้ปรากฏเป็นจุดที่บ่งแสงบนพื้นหลังเรืองแสงสีเขียวภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตที่มีความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร¹⁸ หรือ การวิเคราะห์หาปริมาณอะฟลาทอกซินบีหนึ่งในถั่วลิสง โดยเมื่อถ่ายภาพแผ่น TLC ภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตที่มีความยาวคลื่น 366 นาโนเมตร สารอะฟลาทอกซินปรากฏเป็นจุดเรืองแสงบนพื้นหลังสีทึบ¹⁹

ไฟล์ข้อมูลภาพที่นิยมนำมาใช้วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม ImageJ มักอยู่ในสกุล TIFF หรือ JPEG โดยทำการเปิดไฟล์ภาพที่ต้องการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม ImageJ และอาจสามารถปรับแต่งภาพเพิ่มเติมในโหมดต่าง ๆ เช่น ความสว่าง ความเข้ม ความคมชัด หรืออาจใช้ไฟล์ภาพต้นฉบับในการวิเคราะห์ ข้อตระหนักที่สำคัญคือ การกำหนดขนาดกรอบของแต่ละแถวที่ต้องการวิเคราะห์ ควรมีความเท่ากัน โดยให้เลือกเครื่องมือที่เป็นรูปช่องสี่เหลี่ยม (rectangular selection) เพื่อติเส้นกรอบบนแถวแรกที่ต้องการวิเคราะห์ จากนั้นให้เลือกเมนู “Analyze” และเมนูย่อย “Gel” และตามด้วย “Select First Lane” เพื่อทำการเลือกกรอบนั้นให้เป็นแถวแรกที่ต้องการวิเคราะห์ จากนั้นให้ใช้เมาส์เลื่อนไปที่กรอบแรกพร้อมกับกดปุ่มซ้ายค้างไว้และลากมายังแถวถัดไป และให้เลือกที่เมนู “Analyze” และเมนูย่อย “Gel” อีกครั้ง แต่คราวนี้ให้ตามด้วยเมนูย่อย “Select Next Lane” เพื่อระบุให้กรอบนั้นเป็นแถวถัดไปที่ต้องการให้โปรแกรมวิเคราะห์ และให้ทำเช่นนี้ซ้ำไปเรื่อย ๆ บนแถวถัดไปจนครบทุกแถว เมื่อต้องการให้โปรแกรมสร้างพิกของแต่ละแถว ให้เลือกเมนูย่อย “Plot Lane” และเมื่อลากเส้นได้พิกของสารที่ต้องการวิเคราะห์ และตามด้วยการใช้เครื่องมือ “wand tool” จะสามารถวัดขนาดพื้นที่ใต้พิกและแสดงผลเป็นตัวเลขเพื่อนำมาใช้ในการวิเคราะห์เชิงปริมาณต่อไป

TLC Analyzer เป็นโปรแกรมอีกชนิดที่ได้รับการพัฒนาขึ้นเพื่อนำมาใช้วิเคราะห์ภาพของแผ่น TLC และสามารถดาวน์โหลดได้โดยไม่เสียค่าใช้จ่ายจากเว็บไซต์

http://www.sciencebuddies.org/science-research-papers/tlc_analyzer.shtml²⁶ แนวคิดในการพัฒนาโปรแกรมนี้เพื่อนำมาใช้เป็นอีกทางเลือกที่มีการลงทุนไม่สูงในการนำมาวิเคราะห์สารเชิงปริมาณด้วยวิธี TLC โดยเหมาะสำหรับการนำมาวิเคราะห์ภาพ TLC ภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตที่มีความยาวคลื่น 254 นาโนเมตรที่ถ่ายด้วยกล้องดิจิทัล²⁷ โปรแกรมนี้จะทำการสแกนไฟล์ภาพที่ละแถว โดยเริ่มจากการเปิดไฟล์ภาพที่ต้องการวิเคราะห์ จากนั้นให้ใส่ตัวเลขลงในช่อง “Scan Row” (ซึ่งคือตัวเลขบนแกน Y) และ “Left margin” และ “Right Margin” (ซึ่งคือตัวเลขบนแกน X) เพื่อระบุถึงตำแหน่งของแถวและบริเวณแถบสารที่ต้องการสแกน รวมไปถึง “Dropper Size” เพื่อระบุเป็นขนาดความกว้างของบริเวณที่ต้องการวิเคราะห์ โดยจะปรากฏเป็นเส้นแถบสีขาวทับอยู่บนแถบสารที่ต้องการวิเคราะห์ จากนั้นเมื่อกด “Plot Graph” โปรแกรมจะทำการวิเคราะห์หาความเข้มสีของแถบสารดังกล่าว โดยแสดงผลออกมาเป็นรูปกราฟในช่องสีต่าง ๆ (แดง เขียว น้ำเงิน) และสีดำซึ่งแสดงเป็นลักษณะพิกโครมาโทแกรม โดยความเข้มของแถบสารหรือขนาดพิกสามารถอ่านได้จากค่าตัวเลข OD (optical density) ซึ่งสามารถนำไปใช้ในการคำนวณเชิงปริมาณต่อไป

อย่างไรก็ตาม แม้จะสามารถดาวน์โหลดโปรแกรมได้โดยไม่เสียค่าใช้จ่าย แต่ข้อจำกัดคือใช้เวลาค่อนข้างมากในการวิเคราะห์ไฟล์ภาพ TLC ทั้งแผ่น เนื่องจากการประมวลผลแต่ละครั้งจะทำได้ทีละแถบสาร หากแผ่น TLC มีจำนวนหลายแถวและมีสารหลายชนิดที่ต้องการวิเคราะห์ในแต่ละแถว อาจใช้เวลานานในการประมวลผลทั้งหมด โปรแกรมนี้จึงอาจเหมาะสำหรับการวิเคราะห์สารตัวอย่างที่มีสารสำคัญเพียงหนึ่งชนิด และแยกออกจากแถบสารอื่นอย่างชัดเจน หรือมีจำนวนแถวที่ทำการวิเคราะห์ไม่มากนัก

โปรแกรมอีกชนิดที่พบว่ามีเพื่อนำมาใช้ร่วมกับวิธี TLC ในการวิเคราะห์สารเชิงปริมาณ ได้แก่ โปรแกรม Sorbfil TLC Videodensitometer อาทิเช่น การหา

ปริมาณพาราเซตามอลและคาเฟอีนในตำรับยาสูตรผสม²⁸ การวิเคราะห์หาปริมาณสารแอนโดรกราโฟไลด์ในฟ้าทะลายโจร¹⁷ และการวิเคราะห์หาปริมาณสารกลุ่มแคททีโคลามีนและอนุพันธ์²⁹ เป็นต้น ในอดีตโปรแกรมนี้ดาวน์โหลดโดยตรงจากเว็บไซต์ของผู้พัฒนาโปรแกรมที่ <http://www.sorbfil.com> และมีค่าใช้จ่ายอยู่ที่ประมาณ 272 ดอลลาร์ แต่ในปัจจุบันต้องดาวน์โหลดผ่านเว็บไซต์อื่น เช่น <http://sorbfil-tlc-videodensitometer.software.informer.com>³⁰ โดยไม่พบว่ามีค่าใช้จ่ายแต่อาจมีการระบุช่วงเวลาของการทดลองใช้งานในบางเวอร์ชัน ไฟล์ภาพที่นิยมนำมาใช้วิเคราะห์ด้วยโปรแกรมนี้อยู่ในสกุล JPEG ซึ่งอาจเป็นไฟล์ภาพที่บันทึกภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตที่มีความยาวคลื่น 254 หรือ 366 นาโนเมตร หรือไฟล์ภาพสีของแผ่น TLC

โปรแกรมนี้นี้ยังมีความน่าสนใจตรงที่ในกรณีที่ไฟล์ภาพมีความสว่างของพื้นหลังไม่ค่อยสม่ำเสมอดีนัก อาจทำการปรับแก้ความสว่างของพื้นหลังของทั้งรูปให้ดีขึ้นได้โดยใช้คำสั่ง “Background Approximation” จากแถบเมนู “Edit” และทำการปรับความสว่างของพื้นหลังโดยคลิกที่ปุ่มด้านซ้ายของเมาส์ที่ภาพบนตำแหน่งต่าง ๆ ของพื้นหลัง (บริเวณที่ไม่มีจุดสาร) จุดสีเขียวจะปรากฏขึ้นตามตำแหน่งที่คลิกเมาส์ จากนั้นกดแถบ “Calculate Background” เพื่อให้โปรแกรมประมวลผล และคลิกแถบ “Correct Background” ภาพจะได้รับการปรับแก้ความสว่างของพื้นหลังให้มีความสม่ำเสมอมากขึ้น

เมื่อเริ่มทำการวิเคราะห์ให้ไฟล์ภาพให้เข้าสู่หน้าต่างหลักและต้องมีการกำหนดค่าต่าง ๆ เช่น จำนวนแถวและขนาดความกว้างของแถว เพื่อให้แน่ใจว่าทุกแถวมีขนาดความกว้างเท่ากัน โดยสามารถกำหนดได้ในเมนูย่อย “Regular track” ภายใต้แถบเมนู “Track” จากนั้นเมื่อต้องการให้โปรแกรมประมวลผล ให้กดเลือกคำสั่ง “Process” หน้าจอจะแสดงหน้าต่างแสดงผลการประเมินของแถวที่เลือกมาวิเคราะห์ โดยสร้างพิกโครมาโทแกรม

จากความเบี่ยงเบนของค่าความเข้มข้นของแต่ละแถวจากค่าความเข้มข้นของพื้นหลัง

ค่าพารามิเตอร์เพื่อการประมวลผลอาจใช้ค่าที่กำหนดไว้แล้วโดยโปรแกรม หรือหากต้องการปรับเปลี่ยนพารามิเตอร์เหล่านี้ใหม่ ให้ไปที่จอหน้าต่างแสดงผล กดแถบเมนู “Mode” และเลือกคำสั่ง “Options” หลังจากโปรแกรมทำการประเมินผลครบทุกแถวตามต้องการแล้ว ให้กดคำสั่ง “Results” ผลการวิเคราะห์ที่ได้ เช่น ค่า Rf ขนาดพื้นที่ (S) และความสูง (H) และรูปฟีก (กราฟ) ของแต่ละแถวจะปรากฏในหน้าต่างแสดงผล ซึ่งสามารถนำค่าที่ได้เหล่านี้ไปใช้ในการวิเคราะห์เชิงปริมาณต่อไป

โปรแกรม JustTLC โดย Sweday เป็นอีกโปรแกรมที่พัฒนาขึ้นเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ภาพเพื่อหาปริมาณสารบนแผ่น TLC โดยสามารถดาวน์โหลดเวอร์ชันทดลองใช้งานได้เป็นระยะเวลา 30 วัน โดยไม่เสียค่าใช้จ่าย ผ่านทางเว็บไซต์ <http://www.sweday.com/JustTLCTry.aspx>³¹ หลังจากนั้นโปรแกรมนี้มีราคาอยู่ที่ 465 ดอลลาร์ มีรายงานการใช้โปรแกรมนี้ร่วมกับวิธี TLC ในการหาปริมาณสารกลุ่มต่าง ๆ โดยอาศัยเทคนิคการวิเคราะห์เชิงภาพ เช่น การวิเคราะห์หาปริมาณสารที่ได้จากการฉายรังสีของคลอโรพราซีน³² การวิเคราะห์หาปริมาณสารคาร์บิโดปาและเลโวโดปาในเกสรชัณด์³³ และการหาปริมาณสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ในผลิตภัณฑ์อาหารเสริม⁴ เป็นต้น

JustTLC ทำการวิเคราะห์หาขนาดของจุดสารที่สนใจโดยการวัดทั้งขนาดพื้นที่และความเข้มข้นของจุดสารนั้นและประมวลผลออกมาแสดงด้วยค่า band volume ไฟล์ภาพที่จะนำมาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมนี้นี้ต้องเป็นรูปแบบระดับสีเทา (grayscale) เท่านั้น การใช้งานโดยง่ายเริ่มจากการเปิดไฟล์ภาพที่ต้องการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม JustTLC จากนั้นให้เลือกที่แถบเมนู “Plate Analysis” และใช้เครื่องมือลูกศรเพื่อลากเส้นกรอบใหญ่ให้ครอบคลุมแผ่นบริเวณที่มีแถวของจุดสารที่สนใจ พร้อมทั้งให้กำหนดค่า noise ที่เหมาะสมและจำนวนแถว (lane)

ทั้งหมดและจำนวนแถบในแต่ละแถว (band) ในจอหน้าต่าง “Analysis” และตามด้วยการกด “Quantify” เพื่อให้โปรแกรมวิเคราะห์ภาพและวิเคราะห์ขนาดของแถบสาร ค่า band volume สามารถนำมาใช้ในการวิเคราะห์เชิงปริมาณต่อไป สำหรับคู่มือการใช้งานโดยละเอียดค้นได้จากเว็บไซต์ของผู้พัฒนาโปรแกรม³¹

นอกจากโปรแกรมดังกล่าวข้างต้นแล้ว ยังมีรายงานถึงการประยุกต์ใช้วิธี TLC ร่วมกับโปรแกรมอื่น ๆ ในการวิเคราะห์เชิงภาพเพื่อการหาปริมาณสาร เช่น การวิเคราะห์หาปริมาณสารแอนโดรกราโฟไลด์คงเหลือในฟ้าทะลายโจรภายใต้สภาวะเร่งให้สารสลายตัวด้วยวิธี TLC โดยอาศัยโปรแกรม Un-Scan-IT¹⁷ และการวิเคราะห์หาปริมาณสารกลุ่มเคอร์คูมินในผงขมิ้นชันโดยการวิเคราะห์เชิงภาพของแผ่น TLC ด้วยโปรแกรม Adobe Photoshop³⁴ เป็นต้น

อย่างไรก็ตาม การใช้งานของแต่ละโปรแกรมอาจมีข้อเด่นข้อด้อยแตกต่างกันไป เช่น โปรแกรม Sorbfil TLC Videodensitometer มีความสะดวกในการใช้งานสามารถทำการวัดได้ทั้งค่าความสูงและพื้นที่ใต้กราฟของแต่ละพีก โดยประมวลผลแต่ละพีกให้โดยอัตโนมัติ ข้อมูลทั้งในรูปกราฟ ตารางข้อมูล และรูป TLC สามารถโอนถ่ายเข้าสู่โปรแกรมอื่น ๆ เช่น Excel ได้ การแสดงรูปโครมาโทแกรมค่อนข้างชัดเจนและสามารถแสดงโครมาโทแกรมของแต่ละแถวหรือทุกแถวอยู่ในรูปเดียวกันได้

ได้มีการศึกษาเปรียบเทียบในแง่ความไวของการตรวจวัดปริมาณสารเซฟไตรอะโซนบนแผ่น TLC โดยการใช้โปรแกรม Sorbfil TLC Videodensitometer เทียบกับ ImageJ และ Adobe Photoshop พบว่าโปรแกรม Sorbfil TLC Videodensitometer มีความไวในการตรวจวัดสารโดยมีขีดจำกัดในการตรวจวัดและหาปริมาณของสารได้ที่มีความเข้มข้นต่ำกว่าการใช้โปรแกรม ImageJ และ Photoshop ทั้งนี้อาจเป็นผลจากการที่โปรแกรมนี้มีเครื่องมือที่เรียกว่า “background approximation” ที่ช่วยในการปรับแต่งภาพให้แสงและความสว่างของพื้นหลัง

มีความสม่ำเสมอทั่วถึงทั้งแผ่นมากขึ้น ซึ่งอาจส่งผลต่อความไวในการตรวจวัดสารได้ดีขึ้น³⁵ อย่างไรก็ตาม โปรแกรม ImageJ มีข้อดีที่สำคัญคือสามารถดาวน์โหลดได้โดยตรงจากเว็บไซต์ของผู้พัฒนาโปรแกรมโดยไม่เสียค่าใช้จ่าย ทำการประมวลผลได้ค่อนข้างรวดเร็วโดยแสดงผลในรูปโครมาโทแกรมของแต่ละแถว และผู้วิเคราะห์สามารถกำหนดเส้น peak baseline ได้เองเพื่อการประมวลผลแต่ละพีก

ในขณะที่โปรแกรม Photoshop เป็นโปรแกรมที่สามารถหาซื้อได้ง่าย เป็นที่รู้จักกันดีและมีความคุ้นเคยในการใช้งาน แต่อาจเหมาะสำหรับการวิเคราะห์ไฟล์ภาพ TLC ที่พื้นหลังมีความสว่างค่อนข้างสม่ำเสมอดี เช่น การวิเคราะห์แถบสารที่มีสีบนพื้นหลังขาว ดังในกรณีการวิเคราะห์สารกลุ่มเคอร์คูมินอยดีในขมิ้นชัน³⁴ ซึ่งเมื่อทำการวิเคราะห์แยกด้วยวิธี TLC สารกลุ่มนี้จะปรากฏเป็นแถบสีเหลืองบนพื้นขาว สามารถมองเห็นได้ชัดเจนด้วยตาเปล่า และสแกนเก็บข้อมูลภาพได้โดยการใช้เครื่องสแกนเนอร์ทั่วไป พื้นหลังที่ได้จะมีความสม่ำเสมอมากกว่าการถ่ายภาพด้วยกล้องดิจิทัล

สำหรับโปรแกรม UN-SCAN-IT มีความสะดวกในการใช้งานเช่นกัน รวมทั้งมีความไวในการวิเคราะห์แถบสารแม้ที่ความเข้มข้นต่ำ แยกแถบสารออกจากกันได้ดี แสดงผลในรูปโครมาโทแกรมของแต่ละแถว และมีความน่าสนใจตรงที่การประมวลผลแต่ละพีกสามารถกำหนด peak baseline ได้หลายรูปแบบขึ้นกับผู้วิเคราะห์³⁶ ในขณะที่โปรแกรม JustTLC มีความสะดวกในการใช้งาน และสามารถโอนถ่ายตารางข้อมูลและรูป TLC เข้าสู่โปรแกรมอื่น ๆ เช่น Excel ได้เช่นกัน โปรแกรมนี้จะประมวลผลแต่ละแถบให้โดยอัตโนมัติ ไม่สามารถกำหนดตำแหน่ง peak baseline ได้เองโดยผู้วิเคราะห์ และน่าสนใจตรงที่เป็นเพียงโปรแกรมเดียวที่ประมวลผลโดยอิงจากรูป 3 มิติของแถบสาร โดยการวัดทั้งพื้นที่และความเข้มสีของแต่ละแถบและนำมาคำนวณแสดงผลในค่า band volume ในขณะที่โปรแกรมเชิงภาพอื่นคำนวณผลจากรูป

2 มิติเป็นหลัก²⁹ สำหรับโปรแกรม TLC Analyzer แม้ว่า จะสามารถดาวน์โหลดได้โดยไม่เสียค่าใช้จ่าย แต่ค่อนข้าง ใช้เวลาในการประมวลผลดังกล่าวแล้วข้างต้น

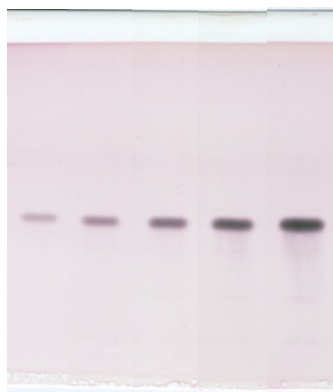
การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี

เช่นเดียวกับการพัฒนาวิธีอื่น ๆ เพื่อนำมาใช้ในการ วิเคราะห์สารเชิงปริมาณ การพัฒนาวิธี TLC โดยอาศัย เทคนิคเชิงภาพจำเป็นต้องมีแนวทางการตรวจสอบความ ใช้ได้ของวิธี (method validation) ภายใต้หัวข้อต่าง ๆ ได้แก่ ความจำเพาะของวิธี (specificity) ความสัมพันธ์เชิง เส้น (regression) และช่วงความเข้มข้นที่ใช้ทดสอบ (range) ความแม่นยำของวิธี (accuracy) ความเที่ยงของวิธี (precision) ปริมาณต่ำสุดที่ตรวจพบได้ (limit of detection) ปริมาณ ต่ำสุดที่สามารถตรวจหาค่าได้ในเชิงปริมาณ (limit of quantitation) และยังมีการศึกษาเปรียบเทียบผลที่ได้ จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี TLC โดยอาศัยเทคนิคเชิงภาพกับ ผลที่ได้จากการวิเคราะห์โดยใช้เครื่องเดนสิโตมิเตอร์หรือ เครื่องมืออื่น ๆ กราฟมาตรฐานสำหรับนำมาใช้ในการ คำนวณหาปริมาณสารด้วยวิธี TLC ต้องมีความสัมพันธ์เชิง เส้นที่ตรงระหว่างความเข้มข้นของสารกับค่าความเข้ม (หรือ ขนาดพื้นที่ หรือขนาดความสูง) ของสารแต่ละจุดที่วัดได้โดย ใช้โปรแกรมวิเคราะห์เชิงภาพ โดยอาจมีลักษณะ ความสัมพันธ์เป็นแบบเส้นตรง (linear regression) หรือ แบบพหุนาม (polynomial regression) ที่ดีมีค่า R^2 มากกว่า 0.99 เช่น การศึกษาเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ หาปริมาณไซบูทรามีนในผลิตภัณฑ์เสริมอาหารด้วยวิธี TLC โดยอาศัยเทคนิคการวิเคราะห์เชิงภาพด้วยโปรแกรม Sorbfil TLC Videodensitometer เทียบกับผลการวิเคราะห์ที่ได้ จากเครื่องเดนสิโตมิเตอร์ พบว่า โปรแกรมวิเคราะห์เชิงภาพ สามารถตรวจวัดความเข้มของจุดสารไซบูทรามีนบนแผ่น TLC และแสดงออกมาในรูปฟังก์ชันที่สามารถวัด ขนาดพื้นที่ได้พอดี และเมื่อทำการทดสอบความสัมพันธ์เชิง เส้นระหว่างพื้นที่กับปริมาณสารในช่วงความเข้มข้น 1-6 ไมโครกรัมต่อจุด พบว่ามีความสัมพันธ์เป็นแบบพหุนาม

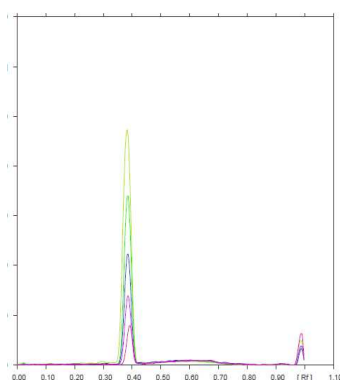
ที่ดี (ค่า $R^2 > 0.99$) และยังพบว่าค่าเฉลี่ยของปริมาณสาร ไซบูทรามีนที่วิเคราะห์ได้ด้วยวิธี TLC โดยอาศัยเทคนิค เชิงภาพและที่วิเคราะห์ด้วยเครื่องเดนสิโตมิเตอร์ให้ผลการ วิเคราะห์ที่ไม่แตกต่างกัน³⁷

นอกจากนี้ยังมีการศึกษาเปรียบเทียบผลที่ได้จากการ วิเคราะห์ด้วยวิธี TLC โดยอาศัยเทคนิคเชิงภาพด้วย โปรแกรมต่าง ๆ เช่น รายงานการวิเคราะห์หาปริมาณสาร คาร์โบโดปาและเลโวโดปาด้วยวิธี TLC โดยอาศัยเทคนิคเชิง ภาพด้วยโปรแกรม Sorbfil TLC Videodensitometer และ โปรแกรม Just TLC เทียบกับผลที่ได้จากการวิเคราะห์โดย การใช้ ImageDecipher TLC ซึ่งเป็นซอฟต์แวร์เฉพาะที่มา กับเครื่องบันทึกภาพ BioDit TLC Scanner จากการศึกษา พบว่าเมื่อนำไฟล์ภาพมาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมต่าง ๆ ที่มี ราคาไม่สูงมาก ผลการวิเคราะห์ที่ได้จากทุกโปรแกรมมี ความสัมพันธ์เชิงเส้นแบบเส้นตรงที่ดี (ค่า $R^2 > 0.99$) ระหว่างพื้นที่ (หรือปริมาตร หากใช้โปรแกรม JustTLC) กับ ปริมาณสาร ในช่วงความเข้มข้น 50-300 นาโนกรัมต่อจุด ค่า LOD และ LOQ ต่ำกว่า 53.4 และ 61.1 นาโนกรัมต่อจุด ตามลำดับ³³ และ รายงานการวิเคราะห์หาปริมาณสารแอน โดโรกราโฟไลต์ในผลิตภัณฑ์ยาสมุนไพรฟ้าทะลายโจรและ ปริมาณสารแอนโดโรกราโฟไลต์ที่คงเหลืออยู่ภายใต้สภาวะ แรงให้สารละลายด้วยวิธีที่แอลซีโดยอาศัยเทคนิคเชิงภาพ ด้วยโปรแกรมต่าง ๆ ได้แก่ โปรแกรม Sorbfil TLC Videodensitometer โปรแกรม JustTLC โปรแกรม ImageJ และ โปรแกรม UN-SCAN-IT โดยพบว่าขนาดของ พิกสารแอนโดโรกราโฟไลต์ที่วัดได้โดยแต่ละโปรแกรมสัมพันธ์ กับขนาดของแถบสีของสารแอนโดโรกราโฟไลต์ (รูปที่ 3) และเมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของปริมาณสารแอนโดโรกราโฟ ไลต์ที่วิเคราะห์ได้ด้วยวิธีที่แอลซีโดยอาศัยเทคนิคเชิงภาพ ด้วยโปรแกรมต่าง ๆ กับการใช้วิธีเดนสิโตเมตรีและวิธีโคร มาโทกราฟีชนิดของเหลวสมรรถนะสูง พบว่า ผลการ วิเคราะห์ที่ได้ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ¹⁷

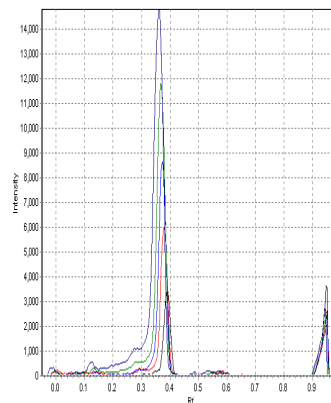
ก. TLC



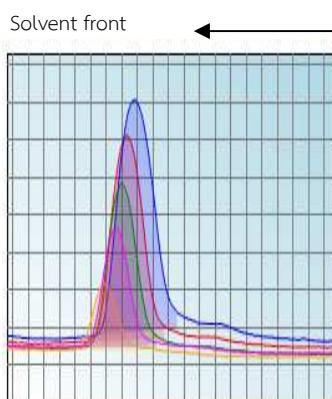
ข. Densitometer



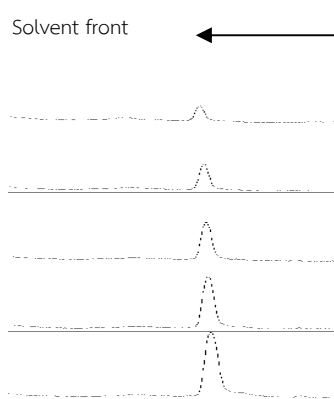
ค. Sorbfil



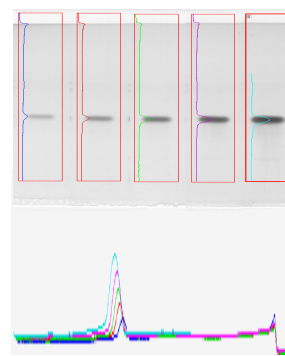
ง. JustTLC



จ. ImageJ



ฉ. UN-SCAN-IT



รูปที่ 3 ก. รูป TLC ของสารมาตรฐานแอนโดรกราโฟไลด์ที่ความเข้มข้น 0.5-8 ไมโครกรัมต่อจุด ข. โครมาโทแกรมที่ได้จากการจากวิเคราะห์โดยเครื่องเดนสิโตมิเตอร์ และ ค.-ฉ. โครมาโทแกรมที่ได้จากการวิเคราะห์เชิงภาพโดยโปรแกรม Sorbfil โปรแกรม JustTLC โปรแกรม ImageJ และ โปรแกรม UN-SCAN-IT ตามลำดับ (วัสดุภาคคงที่คือ Silica gel 60 F254 TLC aluminium plate และ วัสดุภาคเคลื่อนที่คือ dichloromethane-toluene-ethanol (6:3:1, v/v/v))

บทสรุป

จากข้างต้นจะเห็นได้ว่าวิธี TLC โดยอาศัยเทคนิคเชิงภาพ สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณสารที่สนใจในตัวอย่างประเภทต่าง ๆ ได้ดี โดยเฉพาะตัวอย่างประเภทสมุนไพรและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ โดยวิธีที่ได้รับการพัฒนาขึ้นอย่างเหมาะสมนั้นพบว่ามีความจำเพาะ ความแม่นยำและความเที่ยง และเมื่อเปรียบเทียบกับผลการวิเคราะห์เชิงปริมาณที่ได้กับวิธีวิเคราะห์อื่น ๆ เช่น วิธีวิเคราะห์โดยใช้เครื่องเดนสิโตมิเตอร์ และเครื่องโครมาโทกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง (high performance liquid chromatography, HPLC) พบว่าผลการวิเคราะห์ที่

ได้ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ นอกเหนือจากความถูกต้องแม่นยำของวิธีแล้ว วิธี TLC โดยอาศัยเทคนิคการวิเคราะห์เชิงภาพยังใช้เครื่องมือที่จัดหาได้ง่าย อาทิเช่น คอมพิวเตอร์ สแกนเนอร์ และโปรแกรมการวิเคราะห์เชิงภาพชนิดต่าง ๆ ที่มีจำหน่ายในท้องตลาดหรือสามารถดาวน์โหลดได้โดยไม่เสียค่าใช้จ่าย ซึ่งโปรแกรมเหล่านี้อาจมีความแตกต่างกันบ้างในแง่ความสะดวกของการใช้งานและรูปแบบของการแสดงผลดังกล่าวข้างต้น ทั้งนี้ หากมีการปรับค่าพารามิเตอร์ของแต่ละโปรแกรมในการวิเคราะห์เชิงภาพอย่างเหมาะสม ก็จะสามารถนำมาใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณได้อย่างถูกต้องแม่นยำ การใช้วิธี TLC ร่วมกับ

เทคนิคการวิเคราะห์เชิงภาพจึงเป็นอีกทางเลือกที่น่าสนใจ การมีวิธีวิเคราะห์ที่ทำได้ง่ายและไม่จำเป็นต้องใช้เครื่องมือขั้นสูงอาจเป็นประโยชน์สำหรับผู้สนใจรวมถึงโรงงานผลิตสมุนไพรขนาดเล็กที่มีการลงทุนไม่มากเพื่อนำมาใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญออกฤทธิ์ในผลิตภัณฑ์สมุนไพร และอาจนำมาซึ่งการส่งเสริมพัฒนาและควบคุมคุณภาพของผลิตภัณฑ์สมุนไพรที่ผลิตในประเทศไทยให้ดียิ่งขึ้น

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณสถาบันวิจัยและพัฒนา และ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร ที่ให้การสนับสนุนทุนวิจัยโครงการต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาพัฒนาวิธีวิเคราะห์สารเชิงปริมาณด้วยวิธี TLC โดยอาศัยเทคนิคเชิงภาพ ซึ่งประสบการณ์การทำงานและเกร็ดความรู้ต่าง ๆ ที่ได้จากโครงการเหล่านี้ร่วมกับการทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้องได้รับการนำมาถ่ายทอดและเผยแพร่ในรูปแบบบทความทางวิชาการแก่ผู้ที่สนใจ

เอกสารอ้างอิง

- History of planar chromatography. In: Spangenberg B, Poole CF, Weins Ch, editors. Quantitative thin-layer chromatography: A practical survey. Heidelberg: Springer, 2010; p.1-12.
- 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 Chromatog. 2014;9: 21-8.
- Mustoe SP, McCrossen SD. A comparison between slit densitometry and video densitometry for quantitation in thin layer chromatography. Chromato Suppl. 2001;53: 474-7.
- Fazaka LA, NaCcu-Briciu RD, Sărbu C. A comparative study concerning the image analysis in thin layer chromatography of fluorescent compounds. J Liq Chromatog Rel Tech. 2011;34:2315-25.
- Ford-Holevinski TS, Agranoff BW, Radin NS. An inexpensive, microcomputer-based, video densitometer for quantitating thin-layer chromatographic spots. Anal Biochem. 1983;132(1):132-6.
- Prosek M, Medja M, Korsic J, Kaiser RE. Quantitative evaluation with image processing scanner. In: Piemonte G, Tagliaro F, Marigo M, Frigerio A, editors. Developments in analytical methods in pharmaceutical, biomedical, and forensic sciences. New York: Springer Science & Business Media, 1987;p.37-43.
- Sherma J. Planar chromatography. Anal Chem. 2008;80: 4253-67.
- CCD and CMOS image sensor [homepage on the Internet]. c2009 [updated 2009 Jun 12; cited 2016 Dec 26]. Available from http://dtv.mcot.net/mcot_one.php?dateone=1244772701
- Systems of digital camera [homepage on the Internet]. No date [cited 2016 Dec 26]. Available from <http://www.the-than.com/Gallery/ZphotoZ/3.html>
- Download [homepage on the Internet]. No date [cited 2016 Dec 26]. Available from <https://imagej.nih.gov/ij/download.html>
- Ferreira T, Rasband W. ImageJ user guide [homepage on the Internet]. c2012 [updated 2012 Oct 2; cited 2016 Dec 26]. Available from <https://imagej.nih.gov/ij/docs/guide/user-guide.pdf>
- Schneider CA, Rasband SW, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. Nat Methods. 2012;9(7):671-5.
- Troscianko J, Stevens M. Image calibration and analysis toolbox – a free software suite for objectively measuring reflectance, colour and pattern. Methods Ecol Evol. 2015;6:1320-31.
- ImageJ [homepage on the Internet]. c2016 [updated 2016 Sep 20; cited 2016 Dec 26]. Available from <http://imagej.net>
- Schindelin J, Rueden CT, Hiner MC, Eliceire KW. The ImageJ ecosystem: an open platform for biomedical image analysis. Mol Reprod Dev. 2015;82:518–29.
- Sotanaphun U, Phattanawasin P, Sriphong L. Application of Scion image software to the simultaneous determination of curcuminoids in turmeric (*Curcuma longa*). Phytochem Anal. 2009;20(1):19-23.

17. Phattanawasin P, Burana-Osot J, Sotanaphun U, Kumsum A. Stability-indicating TLC-image analysis method for determination of andrographolide in bulk drug and *Andrographis paniculata* formulations. *Acta Chromatogr.* 2016;28(4):525-40.
18. Peng-ngummuang K, Palanuvej C, Ruangrunsi N. Pharmacognostic specification and coumarin content of *Alyxia reinwardtii* inner bark. *Eng J.* 2015;19(3):15-20.
19. Hoeltz M, Welke JE, Noll IB, Dottori HA. Photometric procedure for quantitative analysis of aflatoxin B1 in peanuts by thin-layer chromatography using charge coupled device detector. *Quim Nova.* 2010;33(1):43-7.
20. Samten, Wetwitayaklung P, Kitcharoen N, Sotanaphun U. TLC image analysis for determination of the piperine content of the traditional medicinal preparations of Bhutan. *Acta Chromatogr.* 2010;22(2):227-36.
21. Sakunpak A, Suksaeree J, Monton C, Pathompak P. Development and quantitative determination of barakol in *Senna Siamea* leaf extract by TLC-image analysis method. *Int J Pharm Sci.* 2014;6(3):267-70.
22. Yukongphan P, Thitikornpong W, Palanuvej C, Ruangrunsi N. The pharmacognostic specification of *Ardisia elliptica* fruits and their embelin contents by TLC image analysis compared to TLC densitometry. *Bull Health Sci Technol.* 2013;11(2):21-8.
23. Mongkolrat S, Palanuvej C, Ruangrunsi N. Thin layer chromatography and image analysis of selected liriodenine bearing plants in Thailand. *J Health Res.* 2013; 27(2): 67-72.
24. Chaowuttikul C, Thitikornpong W, Palanuvej C, Ruangrunsi N. Quantitative determination of usnic acid content in *Usnea siamensis* by TLC-densitometry and TLC image analysis. *Res J Pharm Bio Chem Sci.* 2014;5(1):118-25.
25. Sasiwatpaisit N, Thitikornpong T, Palanuvej C, Ruangrunsi N. Dioscorine content in *Dioscorea hispida* dried tubers in Thailand by TLC-densitometry and TLC image analysis. *J Chem Pharm Res.* 2014;6(4):803-6.
26. TLC Analyzer [homepage on the Internet]. No date [cited 2016 Dec 26]. Available from http://www.sciencebuddies.org/science-research-papers/tlc_analyzer.shtml
27. Hess AVI. Digitally enhanced thin-layer chromatography: an inexpensive, new technique for qualitative and quantitative analysis. *J Chem Educ.* 2007;84(5):842-7.
28. Soponar F, Mot, AC, Sârbu C. Quantitative evaluation of paracetamol and caffeine from pharmaceutical preparations using image analysis and RP-TLC. *Chromatographia* 2009;69(1/2):151-5.
29. Sima IA, Casoni D, Sârbu C. High sensitive and selective HPTLC method assisted by digital image processing for simultaneous determination of catecholamines and related drugs. *Talanta.* 2013;114:117-23.
30. Sorbflil TLC Videodensitometer [homepage on the Internet]. c2016 [updated 2016 Oct 05; cited 2016 Dec 26]. Available from <http://sorbflil-tlc-videodensitometer.software.informer.com>
31. Sweday. JustTLC [homepage on the Internet]. No date [cited 2016 Dec 26]. Available from <http://www.sweday.com/JustTLCTry.aspx>
32. Tozar T, Stoicu A, Radu E, Pascu ML. Evaluation of thin layer chromatography image analysis method for irradiated chropromazine quantification. *Rom Rep Phys.* 2015;67(4):1608-15.
33. Sima IA, Casoni D, Sârbu C. Simultaneous determination of carbidopa and levodopa using a new TLC method and a free radical as detection agent. *J Liquid Chromatogr Rel Tech.* 2013;36:2395-404.
34. Phattanawasin P, Sotanaphun U, Sriphong L. Validated TLC-image analysis method for simultaneous quantification of curcuminoids in *Curcuma longa*. *Chromatographia* 2009;69(3):397-400.
35. Phattanawasin P, Sotanaphun U, Sriphong L, Kanchanaphibool I, Nussara P. A comparison of image analysis software for quantitative TLC of ceftriaxone sodium. *Silpakorn U Sci Technol J.* 2011;5(1):7-13.
36. UN-SCAN-IT graph digitalizing demo [homepage on the Internet]. No date [cited 2016 Dec 26]. Available from <https://www.silksscientific.com/demo/demograph.htm#Demo-b3>
37. Phattanawasin P, Sotanaphun U, Sukwattanasinit T, Akkarawarantorn J, Kitchaiya S. Quantitative determination of sibutramine in adulterated herbal slimming formulations by TLC-image analysis method. *Forensic Sci Int.* 2012;219:96-100.