

การพัฒนาอิเล็กโทรเคมีคัลเซนเซอร์โดยใช้ฮีมินปรับปรุงบนขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีนคาร์บอน
เพื่อตรวจวัดอาร์ทีมิซินิน

Development of an Electrochemical Sensor Based on Hemin Modified Screen-Printed
Carbon Electrode for the Determination of Artemisinin

จุฬาลักษณ์ คำพะริก¹ คเวต คัลเชอร์² จอร์จ เรเบอร์³ แอสตริด ออร์ตเนอร์³ และ อัญชลี ลำเนา^{1,4*}

Chulalak Damphathik¹ Kurt Kalcher² Georg Raber³ Astrid Ortner³ and Anchalee Samphao^{1,4*}

¹ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี จังหวัดอุบลราชธานี 34190 ประเทศไทย

¹Department of Chemistry, Faculty of Science, Ubon Ratchathani University, Ubon Ratchathani, 34190 Thailand

²วิทยาลัยเคมี สาขาเคมีวิเคราะห์ มหาวิทยาลัยกราซ เมืองกราซ เอ – 8010 ประเทศออสเตรีย

²Institute of Chemistry-Analytical Chemistry, University of Graz, Graz, A-8010, Austria

³วิทยาลัยเภสัชศาสตร์ ภาควิชาเภสัชเคมี มหาวิทยาลัยกราซ เมืองกราซ เอ – 8010 ประเทศออสเตรีย

³Institute of Pharmaceutical Sciences, Department of Pharmaceutical Chemistry,

University of Graz, Graz, A-8010, Austria

⁴ภาควิชาเคมีและศูนย์ความเป็นเลิศด้านนวัตกรรมทางเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี อำเภวารินชำราบ จังหวัด
อุบลราชธานี 34190 ประเทศไทย

⁴Department of chemistry and Center of Excellence for innovation in Chemistry, Faculty of Science,
Ubon Ratchatani University, Warinchamrab, Ubon Ratchatani, 34190, Thailand

*E-mail: anchalee.s@ubu.ac.th

Received: Mar 01, 2019

Revised: Jun 24, 2019

Accepted: Jun 30, 2019

บทคัดย่อ

การพัฒนาอิเล็กโทรเคมีคัลเซนเซอร์เพื่อตรวจวัดอาร์ทีมิซินินโดยปรับปรุงขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีนคาร์บอนด้วยฮีมินซึ่งเป็นสารที่สามารถเร่งการเกิดปฏิกิริยารีดักชันของอาร์ทีมิซินินได้ ทำการพิสูจน์เอกลักษณ์ของขั้วไฟฟ้าที่พัฒนาด้วยวิธีทางกายภาพและวิธีเคมีไฟฟ้า ได้แก่ เทคนิคกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด เทคนิคอิมพีแดนซ์สเปกโทรสโคปี และเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมทรี เป็นต้น เซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นให้ช่วงความเป็นเส้นตรงในการตรวจวัดอาร์ทีมิซินินจาก 5.6 ไมโครโมลาร์ ถึง 0.1 มิลลิโมลาร์ มีขีดจำกัดต่ำสุดในการตรวจพบและการตรวจวัดปริมาณที่ 1.4 ไมโครโมลาร์ (สัญญาณกระแส/สัญญาณรบกวน = 3) และ 4.5 ไมโครโมลาร์ (สัญญาณกระแส/สัญญาณรบกวน = 10) ตามลำดับ นอกจากนี้ เซนเซอร์นี้มีความสามารถในการทำซ้ำของการวิเคราะห์และการเตรียมขั้วไฟฟ้าโดยมีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์เป็น 1.6 และ 4.4 ตามลำดับ ได้นำเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นไปประยุกต์ใช้สำหรับตรวจวัดปริมาณอาร์ทีมิซินินในตัวอย่างยาและตัวอย่างพืชพบว่าให้ร้อยละการได้กลับคืนมาในช่วง 98.7 – 106.8 นอกจากนี้พบว่าผลการทดลองสอดคล้องกับเทคนิคมาตรฐานโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ซึ่งชี้ให้เห็นว่าอิเล็กโทรเคมีคัลเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นสามารถประยุกต์ใช้ในการตรวจวัดปริมาณอาร์ทีมิซินินในตัวอย่างจริงได้ ให้ค่าความแม่นยำและความถูกต้องสูง ราคาถูก มีความน่าเชื่อถือ

คำสำคัญ: อาร์ทีมิซินิน อิเล็กโทรเคมีคัลเซนเซอร์ ฮีมิน ขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีนคาร์บอน

Abstract

An electrochemical sensor for the determination of artemisinin (ARN) using hemin modified screen-printed carbon electrode (SPE) has been developed. Hemin can induce the electro-catalytic reduction of artemisinin. The modified electrode was characterized by physical and electrochemical techniques such as scanning electron microscopy (SEM), electrochemical impedance spectroscopy (EIS) and cyclic voltammetry (CV). The calibration graph obtained from Hemin/SPE for the detection of artemisinin was over the range from 5.6 μM to 0.1 mM with the limit of detection and limit of quantitation of 1.4 μM (S/N = 3) and 4.5 μM (S/N = 10). Moreover, the proposed sensor showed good repeatability and reproducibility at 1.6 and 4.4 %RSD, respectively. The application for the analysis

of real drug and plant samples were achieved with the average recovery percentage in the range of 98.7 – 106.8% and the results agreed with HPLC reference technique. These indicated that the proposed electrochemical sensor could be applied for the detection of artemisinin in real samples with good precision and accuracy, low cost and reliability.

Keywords: Artemisinin, Electrochemical sensor, Hemin, Screen-printed carbon electrode

บทนำ

โรคมาลาเรียเป็นหนึ่งในโรคที่เป็นปัญหาสำคัญทางด้านสาธารณสุขและส่งผลกระทบต่อประชากรโลก [1] โรคนี้เกิดจากการติดเชื้อปรสิตกลุ่มพลาสโมเดียม (*Plasmodium*) ที่มียุงก้นปล่องเป็นพาหะนำโรค จากสถิติขององค์การอนามัยโลก ในปี ค.ศ. 2017 ระบุว่าผู้ป่วยโรคมาลาเรียประมาณ 219 ล้านคน จาก 91 ประเทศ และมีผู้เสียชีวิตมากกว่า 4 แสนคน [2] ในประเทศไทยพบการระบาดของโรคนี้บริเวณพื้นที่ชายแดนของประเทศไทย ซึ่งการรักษาโรคมาลาเรียในอดีตใช้ยาต้านมาลาเรียชนิดต่าง ๆ เช่น ควินิน คลอโรควิน ไพริเมทาไมน และเมโฟลควิน เป็นต้น แต่ยาต้านมาลาเรียเหล่านี้มีราคาแพง มีความเป็นพิษสูงและทำให้เกิดการดื้อยาได้ [3],[4] ดังนั้นจึงมีการใช้ยาต้านมาลาเรียในกลุ่มอาร์ทีมิซินินร่วมกับอนุพันธ์อื่นๆ เนื่องจากอาร์ทีมิซินินเป็นยาที่มีประสิทธิภาพสูงในการฆ่าเชื้อมาลาเรีย ออกฤทธิ์เร็วและสามารถลดปัญหาการดื้อยาได้

อาร์ทีมิซินิน (Artemisinin, ARN) เป็นสารในกลุ่มเซสควิเทอร์พีนแลคโตน (Sesquiterpene lactone) ที่มีวงเอนโดเปอร์ออกไซด์บริดจ์ (Endoperoxide bridge) อยู่ในโมเลกุล โครงสร้างทางเคมีดัง Figure 1 สารชนิดนี้สกัดได้จากพืชสมุนไพรจีนในกลุ่มอาร์ทีมิเซียแอนนูอาแอล (*Artemisia annua* L.) หรือ ชิงเหาซู (Qinghaosu) อาร์ทีมิซินินมีลักษณะเป็นผลึกของแข็ง สีขาว รูปร่างคล้ายเข็ม มีจุดหลอมเหลวประมาณ 151 องศาเซลเซียส ส่วนประกอบสำคัญรู้จักกันทั่วไปในชื่อ Artemisinin-based combination therapy (ACT) ซึ่งเป็นยาต้านมาลาเรียที่มีประสิทธิภาพสูง ออกฤทธิ์เร็ว มีผลข้างเคียงต่อผู้ป่วยน้อยและช่วยลดผลของการดื้อยาได้ จากคุณสมบัติที่ดีดังกล่าว ทำให้ความต้องการในการใช้ยาอาร์ทีมิซินินเพิ่มสูงขึ้น และไม่เพียงพอต่อความต้องการของผู้ป่วยจึงทำให้เกิดปัญหาการผลิตและแพร่ระบาดของยาต้านมาลาเรียอาร์ทีมิซินินปลอม (Counterfeit artemisinin antimalarial drug) โดยยาปลอมดังกล่าว เป็นยาที่ไม่มีส่วนผสมของอาร์ทีมิซินินหรือมีอยู่ในปริมาณน้อย และผลิตให้มีบรรจุภัณฑ์เหมือนกับยาต้านมาลาเรียของจริง [5] ทำให้ผู้บริโภคไม่สามารถแยกความแตกต่างได้ และหากผู้ป่วยได้รับยาด้านมาลาเรียปลอมเข้าไปจะส่งผลให้การรักษาโรคไม่ได้ผลและอาจเป็นอันตรายถึงชีวิตเนื่องจากยาต้านมาลาเรียปลอมมีกระบวนการผลิตที่ไม่ได้มาตรฐานและมักพบสารอันตรายปนเปื้อน เช่น โลหะหนัก เมลามีน และคลอแรมฟินิคอล เป็นต้น ดังนั้น การตรวจวัดปริมาณอาร์ทีมิซินินในยาต้านมาลาเรียจึงเป็นสิ่งสำคัญ เพื่อควบคุมคุณภาพของยาในด้านความปลอดภัยของผู้ใช้ยา

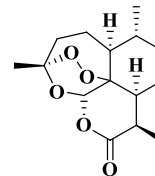
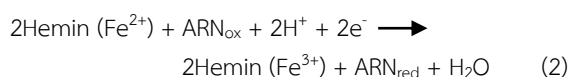


Figure 1 Chemical structure of artemisinin

เทคนิคมาตรฐานที่ใช้ในการตรวจวัดปริมาณอาร์ทีมิซินิน ได้แก่ เทคนิคโครมาโตกราฟีแบบชั้นบาง [6] เทคนิคโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง [7] เทคนิคแก๊สโครมาโตกราฟี [8] แต่เทคนิคดังกล่าวมีข้อจำกัดในเรื่องเครื่องมือที่มีราคาแพง ใช้เวลานานในการตรวจวิเคราะห์ ต้องอาศัยผู้เชี่ยวชาญในการตรวจวัด และไม่สามารถพกพาเพื่อตรวจวัดในภาคสนามได้ ดังนั้น จึงมีการพัฒนาเทคนิคเพื่อเป็นทางเลือกใหม่สำหรับการวิเคราะห์ ได้แก่ เทคนิคอิเล็กโตรเคมีคัลเซนเซอร์ [9] ซึ่งเป็นอุปกรณ์ตรวจวัดสารที่ประกอบด้วย 2 ส่วน คือ ส่วนตรวจวัด (Receptor) ที่สามารถเกิดอันตรกิริยากับสารที่ต้องการวิเคราะห์และส่วนตัวแปลงสัญญาณ (Transducer) ทำหน้าที่แปลงสัญญาณที่เกิดขึ้นจากสารที่ต้องการวิเคราะห์เกิดอันตรกิริยากับส่วนตรวจวัด ให้เป็นสัญญาณไฟฟ้าที่สามารถอ่านค่าได้ ข้อดีของเทคนิคนี้คือ มีสภาพไวในการตรวจวิเคราะห์สูง ราคาถูกเมื่อเปรียบเทียบกับเครื่องมือวิเคราะห์ที่เป็นเทคนิคมาตรฐาน ใช้เวลาวิเคราะห์รวดเร็ว และสามารถพัฒนาเป็นอุปกรณ์พกพาเพื่อตรวจวัดภาคสนามได้ โดยสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการตรวจวัดสารของเซนเซอร์ได้จากการเลือกใช้ตัวปรับปรุงหรือสารตัวกลางในการนำส่งอิเล็กตรอนให้เหมาะสม งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาขั้วไฟฟ้าด้วยสารตัวปรับปรุงชนิดต่างๆ โดยใช้เทคนิคทางเคมีไฟฟ้าเพื่อตรวจวัดอาร์ทีมิซินิน เช่น Xiaofeng Yang และคณะ [10] พัฒนาอิเล็กโตรเคมีคัลเซนเซอร์เพื่อตรวจวัดอาร์ทีมิซินินโดยปรับปรุงขั้วไฟฟ้ากลาสซีคาร์บอน (Glassy carbon electrode) ด้วยชั้นฟิล์มของคาร์บอนผนังหลายชั้น (Multi-wall carbon nanotubes film) นอกจากนี้ Huiping Bai และคณะ [11] สร้างเซนเซอร์โดยปรับปรุงขั้วไฟฟ้ากลาสซีคาร์บอนด้วยวิธีการสร้างชั้นบางพอลิเมอร์ที่มีรอยพิมพ์ประทับโมเลกุล (Polymerized molecularly imprinted membranes) ของอาร์ทีมิซินินบนพื้นผิวของแกรไฟต์สำหรับการตรวจวัดอาร์ทีมิซินินได้อย่างจำเพาะเจาะจงมากขึ้น เป็นต้น ซึ่งงานวิจัยที่เกี่ยวข้องส่วนใหญ่จะใช้ขั้วไฟฟ้ากลาสซีคาร์บอนที่ไม่สามารถใช้แล้วทิ้งได้ และมีกระบวนการเตรียมขั้วไฟฟ้าหลายขั้นตอน นอกจากนี้พบว่าศักย์ไฟฟ้าในการเกิดปฏิกิริยารีดักชันของอาร์ทีมิซินินมีค่าสูงซึ่งส่งผลให้เกิดปัญหาดัรบวบนการวิเคราะห์ได้ เนื่องจากสารชนิดอื่นสามารถถูกกระตุ้นและเกิดปฏิกิริยารีดอกซ์ได้ที่

ศักย์ไฟฟ้าสูง ดังนั้น การเลือกใช้สารเพื่อปรับปรุงสภาพผิวของเซนเซอร์ให้เหมาะสมจึงมีความสำคัญ เพื่อลดการให้ศักย์ไฟฟ้าและเพิ่มความจำเพาะเจาะจงให้อิเล็กโตรเคมีเซลล์เซนเซอร์

การเลือกใช้สารตัวปรับปรุงหรือสารตัวกลางในการสร้างเซนเซอร์มีความสำคัญอย่างยิ่ง ต้องพิจารณาตัวปรับปรุงให้เหมาะสม งานวิจัยนี้เลือกใช้สาร ฮีมิน หรือ iron (III) protoporphyrin IX จัดเป็นสารจำพวกเมทัลโลพอร์ไฟริน ประกอบด้วยไอออนของเหล็ก (Fe^{3+}) และวงพอร์ไฟริน (Porphyrin) โดยมีคลอไรด์ทำหน้าที่เป็นลิแกนด์ โมเลกุลของสารนี้มีคุณสมบัติคล้ายเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส [10] แต่มีขนาดโมเลกุลเล็กกว่า จึงช่วยเพิ่มความสามารถในการนำส่งอิเล็กตรอน ไม่เสียสภาพง่าย และมีความเสถียรสูงเมื่อเปรียบเทียบกับคุณสมบัติของเอนไซม์ นอกจากนี้ ฮีมินยังเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทางเคมีไฟฟ้าที่ดี จึงถูกนำมาใช้ปรับปรุงบนผิวหน้าขั้วไฟฟ้าเพื่อตรวจวัดสารหลายชนิด เช่น ออกซิเจน [11] ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ [12] และไนไตรท์ [13] เป็นต้น กลไกการเร่งปฏิกิริยาทางเคมีไฟฟ้าของฮีมินเกิดจากการถ่ายโอนอิเล็กตรอนของเหล็ก (Fe^{3+}/Fe^{2+}) ในโมเลกุล ซึ่งสามารถเกิดปฏิกิริยารีดอกซ์ที่ศักย์ไฟฟ้าต่ำ [14] และจากการศึกษาวิจัยที่เกี่ยวข้องพบว่า ฮีมินสามารถเร่งการเกิดปฏิกิริยารีดักชันอาร์ทีมิซินินได้ และทำให้ศักย์รีดักชันของอาร์ทีมิซินินเกิดการเลื่อนจากศักย์ -1.0 โวลต์ เกิดที่ศักย์ -0.45 โวลต์ [15] ซึ่งเป็นศักย์ที่ต่ำลงให้สัญญาณที่ดีสามารถลดผลของตัวรบกวนที่เกิดที่ศักย์รีดักชันสูงได้ โดยกลไกการเร่งปฏิกิริยารีดักชันของอาร์ทีมิซินินด้วยฮีมิน [16] ดังสมการ:



เมื่อให้ศักย์ไฟฟารีดักชันแก่ระบบ ฮีมินสามารถรับอิเล็กตรอนที่ผิวหน้าขั้วไฟฟ้าเกิดการเปลี่ยนแปลงเลขออกซิเดชันของ Fe^{3+} ภายในโครงสร้างเป็น Fe^{2+} จากนั้น Fe^{2+} สามารถเร่งการเกิดปฏิกิริยารีดักชันของอาร์ทีมิซินิน ให้เกิดเป็นอาร์ทีมิซินินรูปรีดิวซ์ฟอร์ม และ Fe^{2+} ถูกออกซิไดซ์ทำให้สูญเสียอิเล็กตรอน เกิดเป็นฮีมินในรูป Fe^{3+} รูปตั้งต้นซึ่งสามารถเร่งการเกิดปฏิกิริยาสำหรับครั้งต่อไป สัญญาณกระแสที่ตรวจวัดได้เป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณอิเล็กตรอนที่ใช้ในปฏิกิริยาและความเข้มข้นของอาร์ทีมิซินินตามลำดับ อาศัยหลักการนี้ในการติดตามปริมาณอาร์ทีมิซินิน นอกจากนี้ งานวิจัยเลือกใช้ตัวแปลงสัญญาณเป็นขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีนคาร์บอน (Screen-printed carbon electrodes, SPE) ที่ประกอบด้วย 3 ขั้วไฟฟ้าในแผ่นเดียวซึ่งมีข้อดีหลายประการ เช่น มีขนาดเล็ก พกพาสะดวก ราคาถูก สามารถตรวจวัดสารปริมาณน้อย อีกทั้งสามารถพัฒนาเป็นอุปกรณ์ตรวจวัดในภาคสนามได้

วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้ เพื่อพัฒนาอิเล็กโตรเคมีเซลล์เซนเซอร์โดยใช้ฮีมินปรับปรุงบนขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีนคาร์บอนเพื่อตรวจวัดอาร์ทีมิซินิน ซึ่งเป็นตัวสำคัญในการผลิตยาต้านมาลาเรีย และเพื่อพิสูจน์เอกลักษณ์ของเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นทั้งทางกายภาพและคุณสมบัติทางเคมีไฟฟ้าด้วยเทคนิควิเคราะห์ต่าง ๆ ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมและประเมินประสิทธิภาพของเซนเซอร์ นอกจากนี้ เพื่อศึกษาการประยุกต์ใช้เซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นในการตรวจวัดปริมาณอาร์ทีมิซินินในตัวอย่างจริง และเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์อาร์ทีมิซินินกับเทคนิคมาตรฐานโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High performance liquid chromatography, HPLC)

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการวิจัย

1. สารเคมี

งานวิจัยนี้ใช้อาร์ทีมิซินินความบริสุทธิ์ 98.0 % (Artemisinin, 98.0%) และฮีมิน (Ferriprotoporphyrin IX chloride, 98.0%) (บริษัท Sigma Aldrich) ใช้เอทานอล (C_2H_5OH , 99.9%) และไดเมทิลฟออร์มาไมด์ (N,N-dimethylmethanamide, C_3H_7NO) เป็นตัวทำละลาย อาร์ทีมิซินินและฮีมิน ตามลำดับ ใช้อะซิโตนไตรลเกรดสำหรับเครื่องมือ HPLC (Acetonitrile, C_2H_3N) เป็นเฟสเคลื่อนที่สำหรับเทคนิคมาตรฐาน HPLC เตรียมสารละลายบัฟเฟอร์โดยใช้สารมอนอโซเดียมและไดโซเดียมฟอสเฟต (NaH_2PO_4 and Na_2HPO_4) (บริษัท CAROL ERBA) ตัวอย่างพืชจำนวน 3 ชนิด ได้แก่ *Artemisia annua* L., *Artemisia mongolica* และ *Artemisia adamsii* ได้รับความอนุเคราะห์จากภาควิชาเภสัชเคมี มหาวิทยาลัยราช ประเทศออสเตรเลีย

การเตรียมสารละลายมาตรฐานอาร์ทีมิซินินความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ เตรียมโดยละลายอาร์ทีมิซินิน 0.0141 กรัม ในเอทานอลปริมาตร 10 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเพื่อรอการใช้งาน

การเตรียมสารละลายฮีมินความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เตรียมโดยชั่งฮีมินปริมาณ 0.001 กรัม ละลายในไดเมทิลฟออร์มาไมด์ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

การเตรียมขั้วไฟฟ้าใช้งานพิมพ์สกรีนคาร์บอนที่ปรับปรุงด้วยฮีมิน โดยเปิดสารละลายฮีมินความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 2.5 ไมโครลิตรลงบนผิวหน้าขั้วไฟฟ้า ทิ้งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง

การเตรียมตัวอย่างยา โดยชั่งผงยาปริมาณ 0.1000 กรัม ลงในอุปกรณ์สำหรับการสกัด จากนั้นสกัดด้วยอะซิโตนไตรลปริมาตร 1 มิลลิลิตร (ทำ 3 ครั้ง) นำสารละลายที่ได้ไปสกัดโดยใช้เครื่องมือที่ใช้คลื่นความถี่ (Sonicator) เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เจือจางให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสม

การเตรียมตัวอย่างพืช โดยนำตัวอย่างไปอบเพื่อกำจัดความชื้น จากนั้นนำตัวอย่างที่ได้ไปบดให้ละเอียด และชั่ง

ผงตัวอย่างพืชที่ได้ปริมาณ 0.1000 กรัม และสกัดด้วยเอทานอล ปริมาตร 1 มิลลิลิตร (ทำ 3 ครั้ง) นำสารละลายที่ได้ไปสกัดโดยใช้เครื่องใช้คลื่นความถี่ เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็ว 10000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เจือจางให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสม

2. สภาวะของเทคนิคมาตรฐาน HPLC

เทคนิคมาตรฐาน HPLC ใช้คอลัมน์ C18 (4.6x250 nm) เฟสเคลื่อนที่เป็นอะซิโตนไนโตรลิตต่อน้ำ (60 : 40 %v/v) อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ 0.6 มิลลิลิตร/นาที ปริมาตรสารที่ฉีดเข้าระบบ 10 ไมโครลิตร ความยาวคลื่นที่ตรวจวัด 216 นาโนเมตร ใช้วิธีวิเคราะห์ด้วยการสร้างกราฟมาตรฐาน

3. เครื่องมือและอุปกรณ์การวิจัย

เครื่องมือและอุปกรณ์วิเคราะห์ทางเคมีไฟฟ้า ประกอบด้วย เครื่องโพเทนชิโอสแตท รุ่น 910 PSTAT mini (บริษัท Metrohm Siam, ประเทศไทย) ใช้ไฟฟ้าพิมพ์สกรีนคาร์บอนที่ประกอบด้วย 3 ขั้วไฟฟ้าในแผ่นเดียว ได้แก่ ขั้วไฟฟ้าใช้งานชนิดคาร์บอน (บริเวณตรวจวัดมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 2 มิลลิเมตร) ขั้วไฟฟ้าอ้างอิงซิลเวอร์และขั้วไฟฟ้าช่วยผลิตจากคาร์บอน (บริษัท Metrohm Siam, ประเทศไทย) จัดเซลล์เคมีไฟฟ้าโดยจุ่มขั้วไฟฟ้า SPE ลงในสารละลายอิเล็กโทรไลต์เกลือหนุ่ และก่อนการวิเคราะห์ทุกครั้งต้องกำจัดแก๊สออกซิเจนออกจากระบบโดยใช้แก๊สอาร์กอนตลอดการวิเคราะห์ สำหรับเทคนิควิเคราะห์มาตรฐานใช้เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง รุ่น Ultimate 3000, Thermo Dionex (บริษัท Archemica International, Germany) การศึกษาลักษณะทางกายภาพของขั้วไฟฟ้าใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด รุ่น JSM-6010-LV (บริษัท JEOL, USA)

ผลการวิจัย

1. การพิสูจน์เอกลักษณ์ทางกายภาพของขั้วไฟฟ้าโดยใช้เทคนิคกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscopy, SEM)

ผลการศึกษาลักษณะพื้นผิวของขั้วไฟฟ้าที่พัฒนาขึ้น โดยใช้เทคนิค SEM ที่กำลังขยาย 3000 เท่า การเปรียบเทียบระหว่างขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีนคาร์บอนที่ไม่ได้ปรับปรุงผิวหน้าขั้วไฟฟ้าดัง Figure 2 (a) และขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีนคาร์บอนที่ปรับปรุงผิวหน้าด้วยฮิมีนดัง Figure 2 (b) ผลการศึกษาพบว่าขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีนคาร์บอนที่ไม่ได้ปรับปรุงมีลักษณะเป็นแผ่นขนาดเล็กและมีพื้นผิวขรุขระ ซึ่งพื้นผิวของขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีนคาร์บอนให้ผลการศึกษาสอดคล้องกับงานวิจัยของ Yang และคณะ [17] และเมื่อปรับปรุงผิวหน้าขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีนคาร์บอนด้วยฮิมีนพบอนุภาคของฮิมีนมีลักษณะเป็นทรงกลมกระจายอยู่ทั่วไปบนผิวหน้าขั้วไฟฟ้า และผิวหน้าขั้วไฟฟ้ามีความขรุขระเพิ่มมากขึ้น ผลการศึกษาที่ได้มีความใกล้เคียงกับงานวิจัยของ Cheng และคณะ [18] ศึกษาลักษณะพื้นผิวของขั้วไฟฟ้า

แกรไฟต์ที่ปรับปรุงด้วยฮิมีนและกราฟีนพบว่า ผิวหน้าขั้วไฟฟ้ามีความขรุขระมากขึ้นเมื่อเกาะติดฮิมีนลงไป

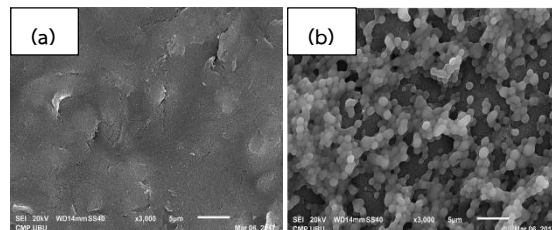


Figure 2 SEM images of bare SPE (a) and Hemin/SPE (b) at 3000x magnification

2. การศึกษาความต้านทานของขั้วไฟฟ้าด้วยเทคนิคอิเล็กโทรเคมีคัลอิมพีแดนซ์สเปกโตรสโคปี (Electrochemical impedance spectroscopy, EIS)

ผลการศึกษาความต้านทานของขั้วไฟฟ้าโดยใช้เทคนิคอิเล็กโทรเคมีคัลอิมพีแดนซ์สเปกโตรสโคปี ซึ่งเป็นเทคนิคที่สามารถบอกกลไกการทำงานของวงจรไฟฟ้า ผ่านกระบวนการถ่ายโอนอิเล็กตรอนบนผิวหน้าขั้วไฟฟ้าที่มีลักษณะต่างกัน โดยตรวจวัดในสารละลายต้นแบบเฟอร์ไรไซด์ ($K_3[Fe(CN)_6]$) ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ พบว่าสัญญาณโนควิสท์พลอตที่เป็นความสัมพันธ์ระหว่างค่าความต้านทานจริง (Z') และค่าความต้านทานจินตภาพ (Z'') ดัง Figure 3 ความต้านทานของขั้วไฟฟ้าวัดได้จากความกว้างของครึ่งวงกลมบนบอกลักษณะกราฟสีด้าเป็นสัญญาณของขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีนคาร์บอนที่ไม่ได้ปรับปรุง เส้นกราฟสีแดงเป็นของขั้วไฟฟ้าที่ปรับปรุงด้วยฮิมีน ผลการศึกษาพบว่า ขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีนคาร์บอนที่ไม่ได้ปรับปรุงพื้นผิวมีความต้านทานน้อยกว่าขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีนคาร์บอนที่ปรับปรุงผิวหน้าด้วยฮิมีน เนื่องจากฮิมีนเป็นโมเลกุลของสารเชิงซ้อนขนาดใหญ่ เมื่อเกาะติดบนผิวหน้าขั้วไฟฟ้าจะทำให้ชั้นของฮิมีนหนาขึ้นและส่งผลให้เกิดการบดบังการนำส่งอิเล็กตรอนระหว่างผิวหน้าขั้วไฟฟ้าและสารละลายต้นแบบเฟอร์ไรไซด์ ทำให้ความต้านทานของขั้วไฟฟ้ามีค่ามากขึ้น ผลการศึกษสอดคล้องกับงานวิจัยของ Ni และคณะ [19]

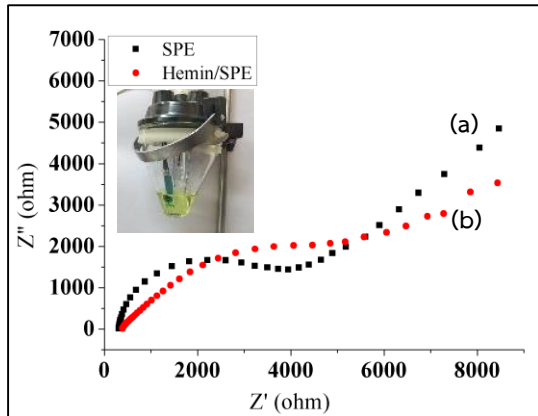


Figure 3 Nyquist plot of (a) unmodified SPE (b) Hemin/SPE in 10 mM $K_3[Fe(CN)_6]$

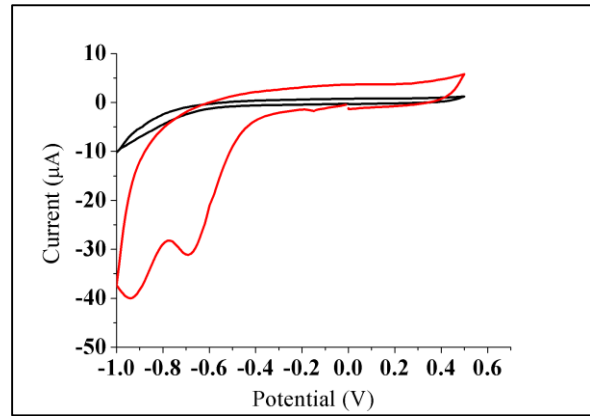


Figure 4 Cyclic voltammogram of bare SPE in phosphate buffer pH 7.0 (black line) and 4×10^{-4} M of artemisinin (red line)

3. การพิสูจน์เอกลักษณ์การนำส่งอิเล็กตรอนของชีวไฟฟ้าพิมพ์สกรีนคาร์บอนปรับปรุงด้วยฮีมินด้วยเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมทรี (Cyclic voltammetry, CV)

ศึกษาการพิสูจน์เอกลักษณ์การนำส่งอิเล็กตรอนของชีวไฟฟ้าที่พัฒนาขึ้นสำหรับการตอบสนองต่อสารอาร์ทีมิซินิน โดยพิจารณาจากปฏิกิริยาออกซิเดชันหรือรีดักชันของสาร ซึ่งใช้เทคนิคไซคลิกโวลแทมเมทรี สแกนศักย์ไฟฟ้าแบบรอบจาก 0.0 โวลต์ ถึง -0.5 โวลต์ อัตราสแกน 0.05 โวลต์ต่อวินาที เส้นกราฟสีดำคือตรวจวัดในสภาวะที่ไม่มีอาร์ทีมิซินิน เส้นกราฟสีแดงคือตรวจวัดในสภาวะที่มีอาร์ทีมิซินิน ความเข้มข้น 4.0×10^{-4} โมลาร์ กราฟไซคลิกโวลแทมเมทรีโมแกรม Figure 4 เป็นสัญญาณของชีวไฟฟ้าพิมพ์สกรีนคาร์บอนที่ไม่ได้ทำการปรับปรุง พบว่า สารอาร์ทีมิซินินเกิดปฏิกิริยารีดักชันที่ศักย์ประมาณ -0.68 โวลต์ และเมื่อทำการตรวจวัดด้วยชีวไฟฟ้าพิมพ์สกรีนคาร์บอนที่ปรับปรุงด้วยฮีมินดัง Figure 5 พบว่า อาร์ทีมิซินินเกิดสัญญาณรีดักชันที่ศักย์ต่ำกว่าที่ -0.59 โวลต์ และให้ค่าสัญญาณกระแสที่สูงเมื่อเปรียบเทียบกับชีวไฟฟ้าเปล่า แสดงให้เห็นว่าฮีมินเป็นสารตัวกลางที่สามารถเร่งการเกิดปฏิกิริยารีดักชันของอาร์ทีมิซินินได้ นอกจากนี้ ค่าสัญญาณกระแสที่ได้สามารถตรวจวัดได้ง่ายเนื่องจากมีฐานฟิสิกส์ชัดเจน ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงเลือกชีวไฟฟ้าพิมพ์สกรีนคาร์บอนที่ปรับปรุงด้วยฮีมินในการศึกษาต่อไป

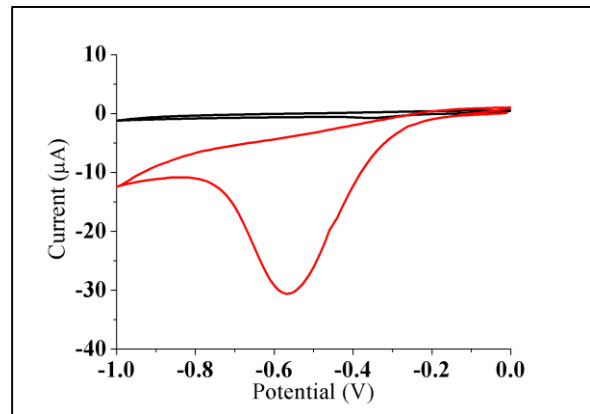


Figure 5 Cyclic voltammogram of Hemin/SPE in phosphate buffer pH 7.0 (black line) and 4×10^{-4} M of artemisinin (red line)

4. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์

ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการปรับปรุงผิวหน้าชีวไฟฟ้าและสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการตรวจวัดสารอาร์ทีมิซินินโดยใช้เทคนิคทางเคมีไฟฟ้า พิจารณาจากค่าสัญญาณกระแส ความเที่ยงและความแปรปรวนในการวิเคราะห์

4.1 ปริมาณฮีมินที่เหมาะสมในการปรับปรุงผิวหน้าชีวไฟฟ้าพิมพ์สกรีนคาร์บอน

ศึกษาผลของปริมาณฮีมินที่ใช้ปรับปรุงผิวหน้าชีวไฟฟ้าด้วยเทคนิคเส้นสweepโวลแทมเมทรี (Linear sweep voltammetry, LSV) สแกนศักย์ไฟฟ้าจาก 0.0 ถึง -1.0 โวลต์ ตรวจวัดในสารละลายอาร์ทีมิซินินความเข้มข้น 2×10^{-4} โมลาร์ ศึกษาปริมาณฮีมิน 0.00 ถึง 0.20 ร้อยละโดยน้ำหนักต่อปริมาตร (%w/v) ผลการศึกษาดัง Figure 6 พบว่า เมื่อใช้ปริมาณฮีมินเพิ่มมากขึ้นจาก 0.0 ถึง 0.10 %w/v ค่าสัญญาณกระแสที่เกิดจากปฏิกิริยารีดักชันของอาร์ทีมิซินินจะมีค่าเพิ่มมากขึ้น เนื่องจาก ฮีมินเป็นสารตัวกลางในการนำส่งอิเล็กตรอนที่ดีและช่วยเร่งการแตกพันธะเปอร์ออกไซด์ในโมเลกุลของอาร์ทีมิซินินได้ [20] แต่เมื่อใช้ฮีมินปริมาณมากกว่า 0.10 %w/v

พบว่า ค่าสัญญาณกระแสที่ได้มีค่าลดลง เนื่องจากฮีมินเป็นโมเลกุลที่มีขนาดใหญ่ เมื่อใช้ปริมาณมากเกินไปจะทำให้เกิดชั้นหนาของโมเลกุลปกคลุมบนผิวหน้าขั้วไฟฟ้า ส่งผลให้เกิดการขัดขวางการนำส่งอิเล็กตรอนที่ผิวหน้าขั้วไฟฟ้าได้ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงเลือกใช้ปริมาณฮีมินที่เหมาะสมคือ 0.10 %w/v หรือคิดเป็นปริมาณ 2 มิลลิกรัมต่อผิวหน้าขั้วไฟฟ้า เพื่อใช้ในการปรับปรุงผิวหน้าขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีนคาร์บอน ซึ่งเป็นจุดที่ทำให้สัญญาณกระแสสูงสุดและมีค่าความแปรปรวนของข้อมูลต่ำที่ 0.01 ในการวิเคราะห์ซ้ำ 3 ครั้ง (n=3)

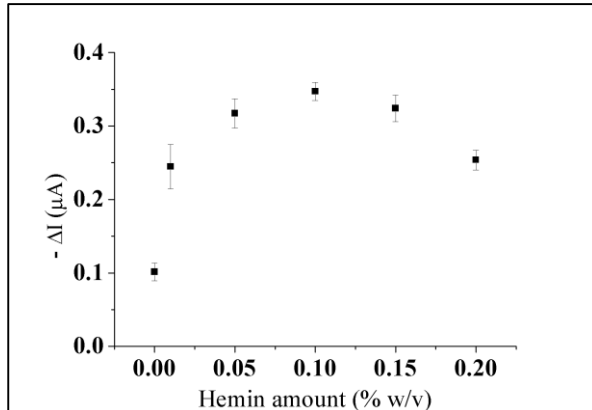


Figure 6 Effect of hemin amount of Hemin/SPE in phosphate buffer pH 7.0 containing 2×10^{-4} M artemisinin at potential applied of -0.4 V vs. Ag/AgCl (n=3)

4.2 พีเอชที่เหมาะสมของสารละลายอิเล็กโตรไลต์เกลืออนุพอสเฟตบัฟเฟอร์

ศึกษาผลของพีเอชของสารละลายอิเล็กโตรไลต์เกลืออนุพอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มีผลต่อการวิเคราะห์อาร์ทีมิซินินด้วยเทคนิคโครโนแอมเพโรเมทรี (Chronoamperometry) สภาพที่ใช้ศึกษา ดังนี้ ขั้วไฟฟ้า Hemin/SPE ปริมาณฮีมินที่ใช้ปรับปรุงขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีนคาร์บอนคือ 0.10 %w/v และให้ศักย์ไฟฟ้าคงที่ -0.40 โวลต์ ความเข้มข้นของอาร์ทีมิซินิน 8×10^{-5} โมลาร์ ศึกษาพีเอชของสารละลายเกลืออนุพอสเฟตบัฟเฟอร์ตั้งแต่พีเอช 5.0 ถึง 9.0 วิเคราะห์ซ้ำ 3 ครั้ง (n=3) ผลการศึกษาดัง Figure 7 พบว่า ค่าสัญญาณกระแสจะเพิ่มขึ้นเมื่อพีเอชของสารละลายเพิ่มจาก 5.0 เป็น 7.0 และสัญญาณกระแสจะลดลงเมื่ออยู่ในสภาวะที่เป็นเบส ผลที่ได้มีลักษณะใกล้เคียงกับงานวิจัยของ Reys และคณะ [16] ที่ศึกษาผลของพีเอชต่อการทำงานของเซนเซอร์พบว่า สัญญาณกระแสจะเพิ่มขึ้นเมื่ออยู่ในสภาวะพีเอชที่เป็นกลาง และสัญญาณกระแสจะลดลงเมื่ออยู่ในสภาวะที่เป็นเบสมาก เนื่องจากฮีมินมีคุณสมบัติคล้ายเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสและมีโครงสร้างของลิแกนด์เป็นสารจำพวกฟอร์ไพรินซึ่งเป็นสารที่มักพบในธรรมชาติและเมื่อวงฟอร์ไพรินเกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับโลหะจะทำให้มีคุณสมบัติพิเศษในการขนส่งออกซิเจน โดยมักจะพบโมเลกุลดังกล่าวใน

โปรตีนชนิดฮีโมโกลบิน 53 ซึ่งทำงานได้ดีในสภาวะที่เป็นกลาง นอกจากนี้ พบว่า พีเอชมีผลต่อศักย์กระตุ้นที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยารีดอกซ์ของโลหะภายในโมเลกุลของฮีมิน หากใช้สารละลายพีเอชไม่เหมาะสมจะทำให้ประสิทธิภาพการเร่งปฏิกิริยาของฮีมินลดลง ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงเลือกใช้พีเอชของสารละลายอิเล็กโตรไลต์เกลืออนุพอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ 7.0 เป็นสภาวะที่เหมาะสม

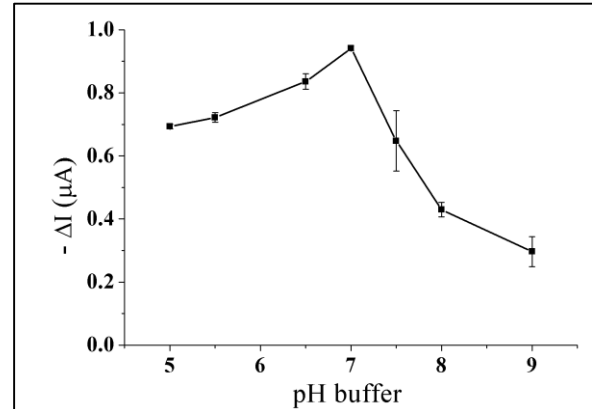


Figure 7 Effect of pH buffer solution on the amperometric response of Hemin/SPE. Applied potential of -0.4 V vs. Ag/AgCl in phosphate buffer containing 8×10^{-5} M artemisinin (n=3)

4.3 ศักย์กระตุ้นที่เหมาะสมในการวิเคราะห์สารอาร์ทีมิซินิน

ศึกษาศักย์กระตุ้นที่เหมาะสมของเทคนิคโครโนแอมเพโรเมทรีในการตรวจวัดอาร์ทีมิซินิน โดยใช้ปริมาณฮีมินปรับปรุงผิวหน้าขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีนคาร์บอนเป็น 0.10 %w/v ในสารละลายอิเล็กโตรไลต์เกลืออนุพอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอช 7.0 ความเข้มข้นของอาร์ทีมิซินินที่ 8×10^{-5} โมลาร์ โดยปรับเปลี่ยนศักย์กระตุ้นที่ให้แกขั้วไฟฟ้าจาก -0.30 ถึง -0.60 โวลต์ วิเคราะห์ซ้ำ 3 ครั้ง (n=3) ผลการศึกษาดัง Figure 8 พบว่า เมื่อเพิ่มศักย์กระตุ้นแก่ระบบสัญญาณกระแสที่ได้จะมีค่าเพิ่มขึ้นจนถึงศักย์กระตุ้นที่ -0.40 โวลต์ และค่าสัญญาณกระแสจะลดลงเมื่อใช้ศักย์กระตุ้นเพิ่มมากขึ้น ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงเลือกศักย์กระตุ้นที่เหมาะสมคือ -0.40 โวลต์ เนื่องจากให้ค่าสัญญาณกระแสที่สูงและมีค่าความแปรปรวนต่ำ นอกจากนี้ ศักย์กระตุ้นที่เลือกใช้มีค่าน้อยซึ่งมีข้อดีคือสามารถลดผลรบกวนการวิเคราะห์จากสารชนิดอื่น ๆ ที่สามารถเกิดปฏิกิริยารีดอกซ์ได้

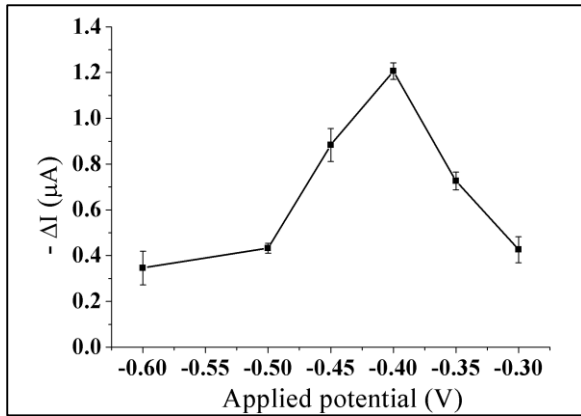


Figure 8 Effect of potential applied on the amperometric response of Hemin/SPE in phosphate buffer pH 7.0 containing 8×10^{-5} M artemisinin (n=3)

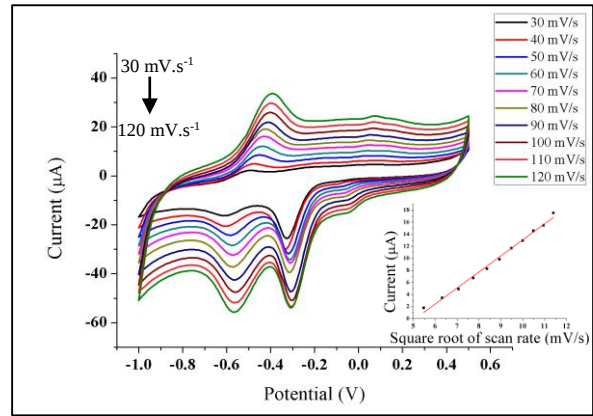


Figure 9 Cyclic voltammogram of 1×10^{-5} M artemisinin solution on Hemin/SPE with various scan rate with the plot of peak current versus square root of scan rate (insert graph)

5. ศึกษากลไกที่เกิดขึ้นบนผิวหน้าขั้วไฟฟ้าฟิสิกส์คาร์บอนที่ปรับปรุงด้วยฮีมิน

ศึกษากระบวนการที่เกิดขึ้นบนผิวหน้าขั้วไฟฟ้าฟิสิกส์คาร์บอนที่ปรับปรุงด้วยฮีมินอาศัยเทคนิคไซคลิกโวลแทมเมทรี วิเคราะห์ในสารละลายอาร์ทีมิซินินความเข้มข้น 1×10^{-5} โมลาร์ โดยปรับเปลี่ยนอัตราสแกนจาก 30 ถึง 120 มิลลิโวลต์ต่อวินาที แล้วพิจารณาการค่าสัญญาณกระแสแคโทดิกที่เกิดจากปฏิกิริยารีดักชันของอาร์ทีมิซินิน ผลการทดลองดัง Figure 9 พบว่า เมื่อเพิ่มอัตราสแกน ค่าสัญญาณกระแสจะเพิ่มมากขึ้น และเมื่อสร้างความสัมพันธ์ระหว่างรากที่สองของอัตราสแกนและสัญญาณกระแสพบว่ามีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงดังกราฟแทรก จากผลการศึกษาดังกล่าวสรุปได้ว่ากระบวนการที่เกิดขึ้นบนผิวหน้าขั้วไฟฟ้าถูกควบคุมผ่านกระบวนการแพร่ (Diffusion controlled process) กล่าวคือกระบวนการถ่ายโอนอิเล็กตรอน (Electron transfer) บนผิวหน้าขั้วไฟฟ้าฟิสิกส์คาร์บอนที่ปรับปรุงด้วยฮีมินกับสารอาร์ทีมิซินินเกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว ทำให้อาร์ทีมิซินินในสารละลายบัลค์แพร่เข้าสู่บริเวณผิวหน้าขั้วไฟฟ้าที่มีความเข้มข้นต่ำ ดังนั้นค่าสัญญาณกระแสแคโทดิกที่เกิดจากปฏิกิริยารีดักชันของอาร์ทีมิซินินที่ตรวจวัดได้จึงขึ้นกับกระบวนการแพร่นี้ตามสมการเรนเดล เซวิก (Randles Sevcik's equation) ทำให้สามารถตรวจวัดปริมาณอาร์ทีมิซินินได้โดยค่าสัญญาณกระแสจะขึ้นกับความเข้มข้นของปริมาณสาร

6. การประเมินประสิทธิภาพของเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นในการตรวจวัดอาร์ทีมิซินิน

งานวิจัยนี้ศึกษาคุณลักษณะในการวิเคราะห์โดยใช้เทคนิคโครโนแอมเพโรเมทรีภายใต้สภาวะที่เหมาะสมเปรียบเทียบระหว่างขั้วไฟฟ้าฟิสิกส์คาร์บอนที่ไม่ได้ปรับปรุงและขั้วไฟฟ้าฟิสิกส์คาร์บอนที่ปรับปรุงด้วยฮีมิน ตรวจวัดสารอาร์ทีมิซินินที่มีความเข้มข้นตั้งแต่ 2×10^{-6} ถึง 1.4×10^{-5} โมลาร์ จะได้กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าสัญญาณกระแสเทียบกับเวลา ผลการศึกษาดัง Figure 10

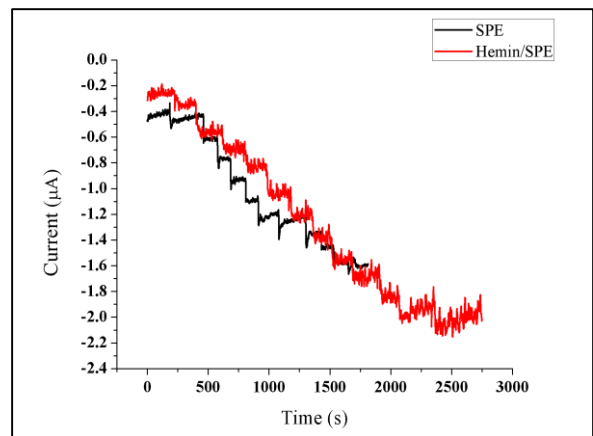


Figure 10 Chronoamperometric response of artemisinin concentration (2×10^{-6} to 1.4×10^{-5} M) on bare SPE (black curve) and Hemin/SPE (red curve)

เมื่อนำค่าผลต่างของสัญญาณกระแสแคโทดิกในการเกิดปฏิกิริยารีดักชันของอาร์ทีมิซินิน (ΔI) ซึ่งได้จากการคำนวณผลต่างระหว่างค่าสัญญาณกระแสของอาร์ทีมิซินินกับสัญญาณของแบลงค์ มาพลอตกราฟความสัมพันธ์กับความเข้มข้น จะได้ช่วงโดนามิกดังกราฟแทรกและได้ช่วงความเป็นเส้นตรง ดัง Figure 11 เส้นสีดำ คือขั้วไฟฟ้าฟิสิกส์คาร์บอนที่ไม่ได้

ปรับปรุง และเส้นสีแดงคือขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีนคาร์บอนที่ปรับปรุงด้วยฮีมิน ผลการศึกษา พบว่า ขั้วไฟฟ้าที่ปรับปรุงด้วยฮีมินจะให้ช่วงความเป็นเส้นตรงที่กว้างตั้งแต่ 5.6 ไมโครโมลาร์ ถึง 0.1 มิลลิโมลาร์ (สมการเส้นตรง $y = 15338x + 0.0688$, $r^2 = 0.996$) มีสภาพไวในการวิเคราะห์ที่ 0.12 แอมแปร์ต่อโมลาร์ต่อตารางเซนติเมตร ชีตจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัด (LOD) และการวิเคราะห์เชิงปริมาณ (LOQ) ในการตรวจวัดอาร์ทีมิซินินของเทคนิคที่พัฒนาขึ้น มีค่าเป็น 1.4 ไมโครโมลาร์ (3SD/slope) และ 4.5 ไมโครโมลาร์ (10SD/slope) ตามลำดับ

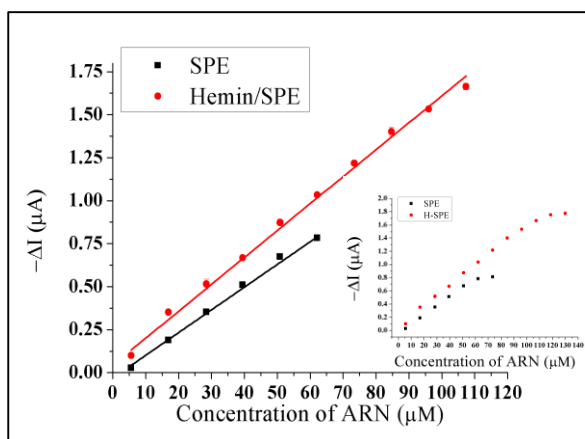


Figure 11 Calibration curve of electrochemical sensor for the determination of ARN. Applied potential of -0.40 V in phosphate buffer pH 7.0

ศึกษาความสามารถในการวัดซ้ำของการวิเคราะห์ (Repeatability) โดยเตรียมขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีนคาร์บอนที่ปรับปรุงด้วยฮีมินจำนวน 1 ขั้ว แล้ววิเคราะห์หาปริมาณอาร์ทีมิซินินจำนวน 3 ครั้ง ศึกษาที่ความเข้มข้น 8×10^{-5} โมลาร์ พบว่าอเล็กโตรเคมีคัลเซนเซอร์ให้ค่าสัญญาณกระแสในการตรวจวัดอาร์ทีมิซินินคิดเป็นค่าร้อยละเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ เท่ากับ 1.6 นอกจากนี้ ศึกษาความสามารถในการวัดซ้ำของขั้วไฟฟ้า (Reproducibility) โดยเตรียมขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีนคาร์บอนที่ปรับปรุงด้วยฮีมินจำนวน 3 ขั้ว ทำการตรวจวัดสัญญาณกระแสของอาร์ทีมิซินินภายใต้สภาวะเดียวกันทั้ง 3 ขั้ว ผลการศึกษาพบว่า ให้ค่าร้อยละของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์เท่ากับ ร้อยละ 4.4 ซึ่งมีค่าน้อยกว่าร้อยละ 5 จึงสามารถยอมรับความแม่นยำของการวิเคราะห์และของขั้วไฟฟ้าได้

7. การประยุกต์ใช้เซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นในการตรวจวัดอาร์ทีมิซินินในตัวอย่างยาและตัวอย่างพืช

งานวิจัยนี้ได้ประยุกต์ใช้เซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นในการตรวจวัดปริมาณอาร์ทีมิซินินในตัวอย่างจริง โดยเลือกตัวอย่างเป็นยาแคปซูลอาร์ทีมิซินิน (100 มิลลิกรัม/แคปซูล) และตัวอย่างพืชในกลุ่มอาร์ทีมิเซีย คือ *Artemisia annua* L, *Artemisia mongolica* และ *Artemisia adamsii* ติดตามปริมาณอาร์ทีมิซินินด้วยวิธีการเติม (Standard addition method) และเปรียบเทียบผลการทดลองที่ได้กับเทคนิคมาตรฐานโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ผลการทดลองดัง Table 1 เมื่อทำการวิเคราะห์โดยเติมสารละลายมาตรฐานอาร์ทีมิซินินลงในตัวอย่างที่ความเข้มข้น 2.5 และ 5.0 มิลลิกรัมต่อกรัม พบว่า ค่าร้อยละการได้กลับคืนมา (Recovery percentage) ของเทคนิคที่พัฒนาขึ้นอยู่ในช่วง 98.7 ถึง 106.8 และใช้สถิติค่าที (Paired t-test) ในการเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ปริมาณอาร์ทีมิซินินระหว่างเทคนิคอเล็กโตรเคมีคัลเซนเซอร์กับเทคนิคมาตรฐานพบว่า ทั้งสองเทคนิคไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ โดยค่า t ที่ได้จากการคำนวณมีค่าน้อยกว่าค่า t ในตาราง ($t_{stat} = 0.97$, $t_{critical} = 3.18$) ระดับความอิสระในการทดสอบทางสถิติ (Degree of freedom) เท่ากับ 3 ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 จึงสรุปได้ว่าเทคนิคที่พัฒนาขึ้นให้ความน่าเชื่อถือและมีความถูกต้องสูงสามารถนำไปประยุกต์ใช้ตรวจวัดปริมาณอาร์ทีมิซินินในตัวอย่างได้จริง นอกจากนี้ เซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นสามารถนำกลับมาใช้ซ้ำได้ง่ายโดยการล้างผิวหน้าขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีนคาร์บอนด้วยไดเมทิลฟอร์มาไมด์ สามารถวิเคราะห์ตัวอย่างได้ 10 ตัวอย่างต่อชั่วโมงในการใช้เซนเซอร์หนึ่งหน่วย และมีความค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์ถูกประมาณ 200 บาทต่อตัวอย่าง

สรุปและข้อเสนอแนะ

งานวิจัยนี้พัฒนาอเล็กโตรเคมีคัลเซนเซอร์ด้วยสารฮีมินปรับปรุงบนขั้วไฟฟ้าพิมพ์สกรีนคาร์บอนเพื่อวิเคราะห์ปริมาณอาร์ทีมิซินินในตัวอย่างยาและพืช อาศัยการตรวจวัดด้วยเทคนิคทางเคมีไฟฟ้า โดยขั้วไฟฟ้าที่พัฒนาขึ้นสามารถเตรียมได้ง่าย ให้ค่าขีดจำกัดต่ำสุดในการตรวจวัดอาร์ทีมิซินินที่ต่ำ (1.4 ไมโครโมลาร์) มีช่วงความเป็นเส้นตรงที่กว้าง (5.6 ไมโครโมลาร์ - 0.1 มิลลิโมลาร์) ให้สภาพไวในการวิเคราะห์สูง (0.12 แอมแปร์ต่อโมลาร์ต่อตารางเซนติเมตร) ใช้สารปริมาณน้อยและสามารถพัฒนาเป็นอุปกรณ์ขนาดพกพาเพื่อนำไปตรวจวัดอาร์ทีมิซินินในภาคสนามได้ นอกจากนี้ เทคนิคที่พัฒนาขึ้นสามารถประยุกต์ใช้เพื่อติดตามปริมาณอาร์ทีมิซินินในตัวอย่างยาและตัวอย่างพืชได้จริง โดยให้ผลการวิเคราะห์ที่น่าเชื่อถือ มีความถูกต้องและความแม่นยำสูง อีกทั้งเซนเซอร์ที่พัฒนาขึ้นสามารถวิเคราะห์ตัวอย่างได้รวดเร็วและมีราคาถูกเมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิคมาตรฐานโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

Table 1. Determination of artemisinin in drug and plant samples obtained by Hemin/SPE and HPLC technique (n=3)

Samples	Proposed sensor				HPLC			
	Detected (mg.g ⁻¹)	Added (mg.g ⁻¹)	Found (mg.g ⁻¹)	Recovery (%)	Detected (mg.g ⁻¹)	Added (mg.g ⁻¹)	Found (mg.g ⁻¹)	Recovery (%)
Drug # 1	98.7±3.3 ^a	-	-	98.7±3.3	104.6±0.9 ^a	-	-	104.6±0.9
Plant # 2 ^b	6.71±0.1	2.5	9.38±0.3	106.8±14	6.12±0.06	2.5	8.90 ± 0.02	111.2±0.9
Plant # 3 ^c	ND ^e	5.0	4.99±0.03	99.7±0.6	ND	5.0	4.87 ± 0.08	97.4±1.6
Plant # 4 ^d	ND	5.0	4.98±0.09	99.6±1.8	ND	5.0	4.96 ± 0.03	99.2±0.5

^amg/tablet^b*Artemisia annua* L.^c*Artemisia mongolica*^d*Artemisia adamsii*^eND means “Not detectable”

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณโครงการพัฒนากำลังคนด้านวิทยาศาสตร์ (ทุนเรียนดีวิทยาศาสตร์แห่งประเทศไทย) สำหรับทุนสนับสนุนงานวิจัย ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานีที่สนับสนุนเครื่องมือวิทยาศาสตร์ สารเคมีสำหรับงานวิจัยในครั้งนี้ ขอขอบคุณทุนโครงการความร่วมมือทางวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีและศิลปะระหว่างเอเชียกับยุโรป (ASEA-UNINET) สำหรับค่าเดินทางไปกลับ (ออสเตรเลีย-ไทย) ของผู้เชี่ยวชาญชาวต่างชาติ

Reference

- [1] Rosenthal, P. J. 2001. Antimalarial chemotherapy: mechanisms of action, resistance, and new directions in drug discovery In: Springer Science & Business Media (eds.)
- [2] World Health Organization. 2018. World malaria report 2018. <https://www.who.int/malaria/publications/world-malaria-report-2018/report>. Accessed 22 November 2018.
- [3] Van Agtmael, M. A and et al. 1999. “Artemisinin drugs in the treatment of malaria: from medicinal herb to registered medication”. *Trends in pharmacological sciences*. 20 (5): 199-205.

- [4] Thapliyal, N. and et al. 2016. “Research progress in electroanalytical techniques for determination of antimalarial drugs in pharmaceutical and biological samples”. *RSC Advances*. 6 (62): 57580-57602.
- [5] Bjorkman Nyqvist, M., Svensson, J. and Yanagizawa-Drott, D. 2012. “Can Good Products Drive Out Bad? Evidence from Local Markets for (Fake?) Antimalarial Medicine in Uganda”.
- [6] Gabriels, M. and Plaizier-Vercammen, J. 2004. “Development of a reversed-phase thin-layer chromatographic method for artemisinin and its derivatives”. *Journal of chromatographic science*. 42 (7): 341-347.
- [7] Erdemoglu, N. and et al. 2007. “Determination of artemisinin in selected *Artemisia* L. species of Turkey by reversed phase HPLC”. *Records of Natural Products*. 1 (2-3): 36.
- [8] Liu, S. and et al. 2008. “Affordable and sensitive determination of artemisinin in *Artemisia annua* L. by gas chromatography with electron-capture detection”. *Journal of Chromatography A*. 1190 (1-2): 302-306.

- [9] Bandodkar, A. J. and Wang, J. 2014. "Non-invasive wearable electrochemical sensors: a review". **Trends in biotechnology**. 32 (7): 363-371.
- [10] Yang, X. and et al. 2008. "Electrochemical determination of artemisinin using a multi-wall carbon nanotube film-modified electrode". **Bulletin of the Korean Chemical Society**. 29 (7): 1386-1390.
- [11] Bai, H. and et al. 2015. "A novel sensitive electrochemical sensor based on in-situ polymerized molecularly imprinted membranes at graphene modified electrode for artemisinin determination". **Biosensors and Bioelectronics**. 64: 352-358.
- [12] Zhang, C. and et al. 2019. "Sandwich-type electrochemical immunosensor for sensitive detection of CEA based on the enhanced effects of Ag NPs@CS spaced Hemin/rGO". **Biosensors and Bioelectronics**. 126: 785-791.
- [13] Ye, J.-S. and et al. 2004. "Application of multi-walled carbon nanotubes functionalized with hemin for oxygen detection in neutral solution". **Journal of Electroanalytical Chemistry**. 562 (2): 241-246.
- [14] Brusova, Z. and Magner, E. 2009. "Kinetics of oxidation of hydrogen peroxide at hemin-modified electrodes in nonaqueous solvents". **Bioelectrochemistry**. 76 (1-2): 63-69.
- [15] Mimica, D., Zagal, J. H. and Bedioui, F. 2001. "Electroreduction of nitrite by hemin, myoglobin and hemoglobin in surfactant films". **Journal of Electroanalytical Chemistry**. 497 (1-2): 106-113.
- [16] Ma, Q. and et al. 2010. "Towards the conception of an amperometric sensor of L-tyrosine based on Hemin/PAMAM/MWCNT modified glassy carbon electrode". **Electrochimica Acta**. 55 (22): 6687-6694.
- [17] Shukla, K. L., Gund, T. M. and Meshnick, S. R. 1995. "Molecular modeling studies of the artemisinin (qinghaosu)-hemin interaction: docking between the antimalarial agent and its putative receptor". **Journal of molecular graphics**. 13 (4): 215-222.
- [18] Reys, J. R. M. and et al. 2008. "An amperometric sensor based on hemin adsorbed on silica gel modified with titanium oxide for electrocatalytic reduction and quantification of artemisinin". **Talanta**. 77 (2): 909-914.
- [19] Yang, X. and et al. 2014. "An electrochemical immunosensor for rapid determination of clenbuterol by using magnetic nanocomposites to modify screen printed carbon electrode based on competitive immunoassay mode". **Sensors and Actuators B: Chemical**. 192: 529-535.
- [20] Cheng, L., Yan, K. and Zhang, J. 2016. "Integration of graphene-hemin hybrid materials in an electroenzymatic system for degradation of diclofenac". **Electrochimica Acta**. 190: 80-987.
- [21] Ni, Y. and et al. 2014. "Electrochemical detection of benzo (a) pyrene and related DNA damage using DNA/hemin/nafion-graphene biosensor". **Analytica chimica acta**. 821: 34-40.
- [22] Chen, Y. and et al. 1999. "Evidence for hemin inducing the cleavage of peroxide bond of artemisinin (Qinghaosu): cyclic voltammetry and in situ FT IR spectroelectrochemical studies on the reduction mechanism of artemisinin in the presence of hemin". **Electrochimica Acta**. 44 (14): 2345-2350.