



ผลของอุณหภูมิ เวลา และความเป็นกรดต่อความเสถียรของเพอร์เมทรินใน
ตัวอย่างเลือด

**Effects of Temperature, Time and Acidity on Stability of Permethrin in
Blood**

ศรินทิพย์ จันท์แก้ว
Sarinthip Chunkhew

วิทยานิพนธ์นี้สำหรับการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขานิติวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

**A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Forensic Science
Prince of Songkla University**

2554

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์ ผลของอุณหภูมิ เวลา และความเป็นกรดต่อความเสถียรของ
เพอร์เมทรินในตัวอย่างเลือด

ผู้เขียน นางสาวศรินทิพย์ จันทร์แก้ว

สาขาวิชา นิติวิทยาศาสตร์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	คณะกรรมการสอบ
..... (รองศาสตราจารย์ ดร.เบญจมาศ จันทร์ฉวี)ประธานกรรมการ (ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อรพิน วงศ์สวัสดิ์กุล)
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วมกรรมการ (รองศาสตราจารย์ ดร.เบญจมาศ จันทร์ฉวี)
..... (ดร.สถาพร พฤทธิพรธาย)กรรมการ (ดร.สถาพร พฤทธิพรธาย)
กรรมการ (ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กัจจา สว่างเจริญ)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชา นิติวิทยาศาสตร์

.....
(ศาสตราจารย์ ดร.อมรรัตน์ พงศ์ดารา)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อวิทยานิพนธ์	ผลของอุณหภูมิ เวลา และความเป็นกรดต่อความเสถียรของเพอร์เมทรินในตัวอย่างเลือด
ผู้เขียน	นางสาวศรินทิพย์ จันท์แก้ว
สาขาวิชา	นิติวิทยาศาสตร์
ปีการศึกษา	2553

บทคัดย่อ

Permethrin เมื่ออยู่ในร่างกายจะเกิดเมแทบอลิซึมที่ตับให้ phenoxybenzyl alcohol โดยปฏิกิริยา hydrolysis ด้วยเอนไซม์ carboxylesterase เนื่องจากในเลือดมีเอนไซม์ชนิดนี้อยู่ด้วยจึงอาจมีผลต่อความถูกต้องของการวิเคราะห์ permethrin ในตัวอย่างเลือด งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ศึกษาปัจจัยด้านอุณหภูมิ เวลา และความเป็นกรด ต่อความเสถียรของ permethrin ในตัวอย่างเลือด การศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิและระยะเวลาทำโดยตั้งตัวอย่างเลือดไว้ที่อุณหภูมิ 25, 4 และ -20°C เป็นระยะเวลา 0, 0.5, 1, 2 และ 4 ชั่วโมง ตามลำดับ และพบว่าค่า metabolic ratio ของ trans- และ cis-permethrin มีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อเวลาผ่านไป และมีค่าต่ำสุดที่อุณหภูมิ -20°C การศึกษาอิทธิพลของกรดไตรฟลูออโรอะซิติก (100:1 และ 200:1) และกรดเปอร์คลอริก (50:1, 100:1, 200:1, 225:1 และ 250:1) และอิทธิพลของกรดเปอร์คลอริก (200:1 และ 225:1) ร่วมกับการแช่ตัวอย่างเลือดในน้ำแข็ง พบว่าการเติมกรดเปอร์คลอริก อัตราส่วน 200:1 ร่วมกับการแช่ตัวอย่างเลือดในน้ำแข็งทำให้มีค่า metabolic ratio ต่ำที่สุด

การวิเคราะห์หา permethrin โดยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงผลการทดลองพบว่าสารทั้งหมดแยกออกจากกันได้ดีภายใน 23 นาที กราฟมาตรฐานมีช่วงความเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 0.2-10 µg/mL สำหรับ trans-permethrin และ 0.7-160 µg/mL สำหรับ phenoxybenzyl alcohol โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ที่ดี ($r \geq 0.9991$) ค่าความเที่ยงของการวิเคราะห์ภายในวันเดียวกันและระหว่างวัน ซึ่งแสดงในรูปค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) มีค่าอยู่ในช่วง 1.90-14.73 % สำหรับ trans-permethrin และ 1.29-11.44 % สำหรับ phenoxybenzyl alcohol ค่าความถูกต้องของการวิเคราะห์ซึ่งแสดงในรูปค่าการเบี่ยงเบน (%DEV) อยู่ในช่วง (+) 1 ถึง (+) 9.75 % สำหรับ trans-permethrin และ (-) 0.8 ถึง (+) 10.00 % สำหรับ phenoxybenzyl alcohol ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถหาปริมาณได้อย่างถูกต้องมีค่า 0.2 µg/mL สำหรับ trans-permethrin และ 0.7 µg/mL สำหรับ phenoxybenzyl alcohol ค่าร้อยละของการคืนกลับอยู่ในช่วง 77.03% - 78.66% สำหรับ trans-permethrin และ 82.40 - 86.78% สำหรับ phenoxybenzyl alcohol

วิธีการเตรียมตัวอย่างเลือดโดยการเติมกรดและลดอุณหภูมิถูกนำมาใช้ในการวัดระดับของ permethrin ในเลือดที่ได้จากหนูขาวที่ได้รับ permethrin ในขนาด 215 mg/kg โดยการป้อนทางปาก และเก็บตัวอย่างเลือดที่เวลา 0, 2, 3 และ 6 ชั่วโมง ตามลำดับ โดยเปรียบเทียบระดับของ permethrin ในตัวอย่างเลือดที่ผ่านการเตรียมตัวอย่างโดยการเติมกรดและลดอุณหภูมิกับที่ไม่ผ่านการเตรียมตามวิธีดังกล่าว พบว่า ระดับของ permethrin ในตัวอย่างที่ผ่านการเตรียมนั้นมีความเข้มข้นอยู่ระหว่าง 0.21 ถึง 0.97 $\mu\text{g/mL}$ ในขณะที่ตัวอย่างที่ไม่ผ่านการเตรียมตรวจไม่พบระดับของ permethrin และเมื่อให้ permethrin ในขนาด 344 mg/kg โดยการป้อนทางปาก และเก็บตัวอย่างเลือดที่เวลา 0, 1, 2, 3, 6, 12 และ 24 ชั่วโมง ตามลำดับ ตัวอย่างเลือดที่ผ่านการเตรียมตัวอย่างโดยการเติมกรดและลดอุณหภูมิจึงพบว่ามีระดับของ permethrin มีความเข้มข้นอยู่ระหว่าง 0.3 ถึง 0.79 $\mu\text{g/mL}$ มีความเข้มข้นในพลาสมาสูงสุดที่เวลา 3 ชั่วโมง (T_{max}) ซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.79 $\mu\text{g/mL}$ (C_{max})

สรุปวิธีการเตรียมตัวอย่างเลือดถูกนำมาประยุกต์ใช้วัดระดับของ permethrin ในเลือดที่เวลาต่างๆ ได้ จึงมีประโยชน์ต่อการศึกษาเภสัชจลนศาสตร์ของ permethrin ในสัตว์ทดลองหรือในคน

Thesis Title	Effects of Temperature, Time and Acidity on Stability of Permethrin in Blood
Author	Miss Sarinthip Chunkhew
Major Program	Forensic Science
Academic Year	2010

ABSTRACT

Permethrin is metabolized to phenoxybenzyl alcohol by hydrolysis via carboxylesterase in liver. Since this enzyme also exists in blood sample, that may affect the accuracy of permethrin quantification. This study was aimed to study effects of temperature, time and acidity on stability of permethrin in blood sample. To investigate effects of temperature and time, blood samples were left at 25, 4 and -20 °C for 0, 0.5, 1, 2 and 4 h, respectively. Metabolic ratios for trans- and cis-permethrin increased when the time increased, and were the lowest at -20 °C. Effects of trifluoroacetic acid (100:1 and 200:1) and perchloric acid (50:1, 100:1, 200:1, 225:1 and 250:1), and those of perchloric acid (200:1 and 225:1) in combination with cooling the sample in ice showed that adding perchloric acid (200:1) combining with cooling in ice resulted in the lowest metabolic ratio.

Determination of permethrin by high performance liquid chromatography showed that all analytes were well separated within 23 min. Calibration curves were linear over the concentration ranges of 0.2-10 µg/mL for trans-permethrin and 0.7-160 µg/mL for phenoxybenzyl alcohol with good correlation coefficient ($r \geq 0.9991$). The intra- and inter-day precisions of the method were 1.90-14.73 %RSD for trans-permethrin and 1.29-11.44 %RSD for phenoxybenzyl alcohol. The accuracy ranged from (+) 1 to (+) 9.75 %DEV for trans-permethrin and (-) 0.8 to (+) 10.00 %DEV. The lower limits of quantification (LLOQ) were 0.2 µg/mL for trans-permethrin and 0.7 µg/mL for phenoxybenzyl alcohol. The percentages of recovery were 77.03%-78.66% for trans-permethrin and 82.40-86.78% for phenoxybenzyl alcohol.

Method of blood sample preparation by acidifying and reducing the temperature was applied to determine blood permethrin in a rat receiving a single oral dose of 215

mg/kg and blood samples were collected at 0, 2, 3 and 6 h, respectively. When compared levels of permethrin in blood sample prepared by procedure of acidifying and reducing temperature, with those without such preparation procedure, it was observed that the concentrations in prepared blood were between 0.21 and 0.97 $\mu\text{g/mL}$, while the concentration was undetectable in unprepared blood samples. Another animal received permethrin at a single oral of 344 mg/kg, and blood samples were collected at 0, 1, 2, 3, 6, 12 and 24 h, respectively. It was found that blood concentrations ranged from 0.3 to 0.79 $\mu\text{g/mL}$. Maximum concentration (C_{max}) was 0.79 $\mu\text{g/mL}$ and time to maximum concentration (T_{max}) was 3 h.

In conclusion, the development of blood sample preparation procedure was used to more accurately determined levels of permethrin, and applicable to study its pharmacokinetics in animal model.

กิตติกรรมประกาศ

รายงานวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงได้ เพราะได้รับความกรุณาจากบุคคลหลายท่าน และจากหลายหน่วยงาน ข้าพเจ้าจึงขอขอบพระคุณไว้ ณ ที่นี้ ดังนี้

ขอขอบคุณ อาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ ดร.เบญจมาศ จันท์จวี และอาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ดร. สถาพร พงษ์พิรุณราช ที่ได้กรุณาให้ความรู้ คำปรึกษา และชี้แนะแนวทางอันเป็นประโยชน์ในการทำวิทยานิพนธ์ จนทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบคุณ อาจารย์ ดร. ปฤษณา เรืองรัตน์ ภาควิชาชีวเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ให้คำปรึกษา และคอยชี้แนะแนวทางในการแก้ไขปัญหาที่เกิดขึ้นในระหว่างการทำวิจัยจนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบคุณ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ และสถานวิจัยผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ สำหรับทุนอุดหนุนการวิจัยเพื่อวิทยานิพนธ์

ขอขอบคุณ ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ให้ความอนุเคราะห์ด้านสถานที่ เครื่องมือ และอุปกรณ์ต่างๆ สำหรับการศึกษ และการทำวิจัย

ขอขอบคุณ ภาควิชาวิทยาศาสตร์ประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ขอขอบคุณ หน่วยเครื่องมือกลาง คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ให้ความอนุเคราะห์ด้านสถานที่ และเครื่องมือวิเคราะห์สำหรับการศึกษา และการทำวิจัย

ขอขอบคุณ เรือนเลี้ยงสัตว์ทดลอง และเจ้าหน้าที่ทุกคนที่ให้ความอนุเคราะห์ในการใช้สถานที่สำหรับการทำวิจัยในสัตว์ทดลอง และให้ความช่วยเหลือในการเบิกสัตว์ทดลอง

ขอขอบคุณ เจ้าหน้าที่หลักสูตรนิติวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ทุกท่าน ที่ช่วยเหลืองานด้านเอกสารต่างๆ

ขอบคุณ พี่ๆ เพื่อนๆ น้องๆ หลักสูตรนิติวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ทุกท่าน ที่คอยให้กำลังใจ และช่วยเหลือในด้านต่างๆ มาโดยตลอด

สุดท้ายนี้ ข้าพเจ้าขอโน้มรำลึกถึงพระคุณ คุณแม่ ประพันธ์ จันท์แก้ว และครอบครัว ที่ให้ความรัก กำลังใจ และให้การสนับสนุนในทุกๆ เรื่องด้วยดีเสมอมาจนสำเร็จการศึกษา

ศรินทิพย์ จันท์แก้ว

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	(3)
Abstract	(5)
กิตติกรรมประกาศ	(7)
สารบัญ	(8)
รายการตาราง	(10)
รายการรูป	(12)
สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ	(14)
บทที่	
1 บทนำ	1
1.1 บทนำต้นเรื่อง	1
1.2 การตรวจเอกสาร	2
1.3 วัตถุประสงค์	45
2 วิธีการวิจัย	46
2.1 สารเคมีและเครื่องมือ	46
2.1.1 สารเคมี	46
2.1.2 วัสดุและเครื่องมือ	47
2.2 รูปแบบการทดลอง	48
2.2.1 การเตรียมสารละลายเข้มข้น permethrin และ phenoxybenzyl alcohol	48
2.2.2 การศึกษาความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (method validation) สำหรับวิเคราะห์ permethrin และ phenoxybenzyl alcohol โดยเทคนิค HPLC	48
2.2.3 การศึกษาความเสถียรของ permethrin ในตัวอย่างเลือด	50
2.2.3.1 การเตรียมสารละลายเข้มข้นและสารละลาย มาตรฐาน permethrin	50
2.2.3.2 การเก็บตัวอย่างเลือดและการเตรียมพลาสมา	51
2.2.3.3 การเตรียมตัวอย่าง plasma blank	51
2.2.3.4 อิทธิพลของตัวกลาง	51
2.2.3.5 อิทธิพลของอุณหภูมิและเวลา	51
	(8)

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.2.3.6 อิทธิพลของความเป็นกรด	52
2.2.3.7 อิทธิพลของความเป็นกรดร่วมกับการรักษาอุณหภูมิ	52
2.2.3.8 การตรวจวัดระดับของ permethrin ในสัตว์ทดลอง	52
2.2.3.9 วิธีการสกัดตัวอย่างพลาสมา	53
2.3 เครื่องมือและสภาวะในการวิเคราะห์ HPLC	53
2.4 วิเคราะห์ผลการทดลอง	54
3 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง	55
3.1 ความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (method validation) สำหรับวิเคราะห์ trans-permethrin และ phenoxybenzyl alcohol ในตัวอย่างพลาสมา	55
3.2 การวิเคราะห์โครมาโทกราฟ	60
3.3 การศึกษาความเสถียรของ permethrin ในตัวอย่างเลือด	62
3.3.1 อิทธิพลของตัวกลาง	62
3.3.2 อิทธิพลของอุณหภูมิและเวลา	63
3.3.3 อิทธิพลของความเป็นกรด	66
3.3.4 อิทธิพลของความเป็นกรดร่วมกับการลดอุณหภูมิ	69
3.3.5 การประยุกต์วิธีการเตรียมตัวอย่างเลือดเพื่อใช้วัด permethrin และ phenoxybenzyl alcohol ในหนูขาว	69
3.3.6 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ permethrin ในพลาสมากับเวลาในหนูขาว	72
4 บทสรุปและข้อเสนอแนะ	75
4.1 บทสรุป	75
4.2 ข้อเสนอแนะ	76
บรรณานุกรม	77
ภาคผนวก	84
ก. การตรวจสอบความถูกต้องของวิธี (Method validation) สำหรับวิเคราะห์ trans-permethrin และ phenoxybenzyl alcohol ในพลาสมา	85
ข. การศึกษาความเสถียรของ permethrin ในตัวอย่างเลือด	100
ค. วิธีการสกัด	113
ประวัติผู้เขียน	128

รายการตาราง

ตารางที่	หน้า
1.1 การจำแนกเอนไซม์	5
1.2 การแบ่งประเภทและการตั้งชื่อของเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเทอร์เอสเทอเรส ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม	6
1.3 สารออกฤทธิ์ 6 ชนิด ในไพรีทริน	14
1.4 สารกำจัดแมลงกลุ่มไพรีทรอยด์สังเคราะห์	20
1.5 อาการแสดงความเป็นพิษของ pyrethroid type I และ type II ในหนูขาว	23
1.6 ตัวอย่างโครงสร้างทางเคมีของสาร pyrethrins ที่ได้จากธรรมชาติ	23
1.7 ตัวอย่างโครงสร้างทางเคมีของสาร synthetic pyrethroids (type I)	24
1.8 ตัวอย่างโครงสร้างทางเคมีของสาร synthetic pyrethroids (type II)	26
2.1 สารเคมีที่ใช้ในการศึกษา	45
2.2 วัสดุและเครื่องมือที่ใช้ในการศึกษา	46
3.1 ค่าความเที่ยงภายในวันเดียวกัน (intra-day) และความเที่ยง ระหว่างวัน (inter-day) ของวิธีสำหรับตรวจวัด trans-permethrin ในพลาสมา	56
3.2 ค่าความเที่ยงภายในวันเดียวกัน (intra-day) และความเที่ยง ระหว่างวัน (inter-day) ของวิธีสำหรับตรวจวัด phenoxybenzyl alcohol ในพลาสมา	56
3.3 ความแม่นยำภายในวันเดียวกัน (intra-day) และความแม่นยำระหว่างวัน (inter-day) ของวิธีสำหรับตรวจวัด permethrin ในพลาสมา	57
3.4 ความแม่นยำภายในวันเดียวกัน (intra-day) และความแม่นยำระหว่างวัน (inter-day) ของวิธีสำหรับตรวจวัด phenoxybenzyl alcohol ในพลาสมา	57
3.5 ร้อยละของการคืนกลับ (%recovery) ของการสกัด permethrin ในพลาสมา	58
3.6 ร้อยละของการคืนกลับ (%recovery) ของการสกัด phenoxybenzyl- alcohol ในพลาสมา	58
3.7 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถคำนวณปริมาณได้อย่างถูกต้องและแม่นยำ (Lower limit of quantification, LLOQ) ของ trans-permethrin ในพลาสมา	59
3.8 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถคำนวณปริมาณได้อย่างถูกต้องและแม่นยำ (Lower limit of quantification, LLOQ) ของ phenoxybenzyl alcohol ในพลาสมา	59

รายการตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
3.9 ค่าความเข้มข้นของ <i>trans</i> -permethrin และ phenoxybenzyl alcohol ในตัวอย่างเลือดที่ไม่เติมกรดร่วมกับการรักษาอุณหภูมิและในตัวอย่างเลือดที่มีการเติมกรดร่วมกับการรักษาอุณหภูมิ หลังจากป้อน permethrin แก่หนู ในขนาด 215 mg/kg	70
3.10 ค่าความเข้มข้นของ <i>trans</i> -permethrin และ phenoxybenzyl alcohol ในตัวอย่างเลือดที่ไม่เติมกรดร่วมกับการรักษาอุณหภูมิและในตัวอย่างเลือดที่มีการเติมกรดร่วมกับการรักษาอุณหภูมิ หลังจากให้ permethrin แก่หนูในขนาด 344 mg/kg โดยการป้อนทางปาก	73

รายการรูป

รูปที่	หน้า
1.1 แสดงกลไกการเกิดปฏิกิริยา hydrolysis ของเอนไซม์ esterase โดยทำปฏิกิริยารวมตัวกับน้ำได้เป็น alcohol และ acid	8
1.2 แสดงกลไกการทำงานของเอนไซม์ carboxylesterase ในการเกิดปฏิกิริยา hydrolysis ของสาร permethrin	10
1.3 แสดงโครงสร้างทางเคมีของไพรีทริน	13
1.4 แสดงลักษณะโครงสร้างโมเลกุลของออร์กาโนคลอรีน 2 ชนิด ซึ่งจัดอยู่ในแต่ละกลุ่มย่อย	16
1.5 แสดงลักษณะโครงสร้างทั่วไปของสารกำจัดแมลงกลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัส	18
1.6 แสดงลักษณะโครงสร้างทั่วไปของสารกำจัดแมลงกลุ่มคาร์บาเมต	18
1.7 แสดงตัวอย่างโครงสร้างโมเลกุลของสารกำจัดแมลงกลุ่มคาร์บาเมต	18
1.8 แสดงสูตรโครงสร้างทางเคมีของ <i>trans</i> -permethrin และ <i>cis</i> -permethrin	27
1.9 แสดงวิธีเมแทบอลิซึมของ <i>cis</i> - and <i>trans</i> -permethrins ในตับหนูขาว	30
1.10 แสดงกลไกการเกิดของแอกชันโพเทนเชียล	32
3.1 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นกับค่าเฉลี่ยพื้นที่ใต้กราฟ (mean±S.D.) ของ <i>trans</i> -permethrin ในพลาสมา	54
3.2 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นกับค่าเฉลี่ยพื้นที่ใต้กราฟ (mean±S.D.) ของ phenoxybenzyl alcohol ในพลาสมา	55
3.3 โครมาโทแกรมของ phenoxybenzyl alcohol และ permethrin ซึ่งประกอบด้วย <i>trans</i> -permethrin และ <i>cis</i> -permethrin ในตัวอย่างพลาสมา; (A) blank plasma , (B) blank plasma ที่มีการเติมสารมาตรฐาน phenoxybenzyl alcohol และ permethrin (5 µg/mL)	60
3.4 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าเฉลี่ยพื้นที่ใต้กราฟ (± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน) ของ <i>trans</i> permethrin, <i>cis</i> -permethrin และ phenoxybenzyl alcohol ที่อยู่ในตัวทำละลายอินทรีย์ (acetonitrile) กับ ในตัวอย่างเลือด	61
3.5 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง metabolic ratio (MR) สำหรับ <i>trans</i> -permethrin ($MR_{trans\text{-permethrin}}$) และ <i>cis</i> -permethrin ($MR_{cis\text{-permethrin}}$) กับเวลาต่างๆ ที่อุณหภูมิ 25°C (A), 4°C (B) และ -20 °C (C)	64

รายการรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
3.6 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างการทำตัวอย่างให้เป็นกรดด้วย TFA, HClO ₄ ที่อัตราส่วน 100:1 และ 200:1 กับ metabolic ratio (MR) และค่าร้อยละของการกลับคืน (%recovery) ของ <i>trans</i> -permethrin และ <i>cis</i> -permethrin	66
3.7 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างการทำตัวอย่างให้เป็นกรดด้วย HClO ₄ ที่อัตราส่วน 50:1, 200:1, 225:1, 250:1, และ 200:1 และ 225:1 ร่วมกับการแช่ตัวอย่างในน้ำแข็ง (ice cooled) กับ metabolic ratio (MR) และค่าร้อยละของการกลับคืน (%recovery) ของ <i>trans</i> -permethrin และ <i>cis</i> -permethrin	67
3.8 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเวลากับความเข้มข้นของ <i>trans</i> -permethrin และ phenoxybenzyl alcohol ในตัวอย่างเลือดที่เติมกรดร่วมกับการแช่ในน้ำแข็งหลังจากให้permethrin แก่หนูในขนาด 344 mg/kg โดยการป้อนทางปาก	74

สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ

Cmax	Maximum plasma concentration
CES	Carboxylesterase
DEV	Deviation
EC	Enzyme commission
ER	Endoplasmic reticulum
ESI	Electrospray ionization
FDA	Food and drug administration
FID	Flame ionization detector
g	Gram
GC/MS	Gas chromatography-mass spectrometry
GLU	Glutamate
GLY	Glycine
h	Hour
HClO ₄	Perchloric acid
HIS	Histidine
HPLC	High performance liquid chromatography
kg	Kilogram
L	Litre
LC-ESI-MS	Liquid chromatography electrospray ionization source mass spectroscopy
LD ₅₀	Median lethal dose
LLOQ	Lower limit of quantification
LOD	Limit of detection
mg	Milligram
min	Minute
mL	Milliliter
mm	Millimeter
MR	Metabolic ratio

mw.	Molecular weight
ng	Nanogram
nm	Nanometer
pH	-log hydrogen ion concentration
r	Correlation coefficient
RP-HPLC	Reverse phase - high performance liquid chromatography
RSD	Relative standard deviation
SER	Serine
SD	Standard deviation
SPE	Solid phase extraction
TFA	Trifluoroacetic acid
Tmax	Time to maximal plasma concentration
UV	Ultraviolet
°C	Degree Celsius
%	Percent
β	Beta
α	Alpha
λ	Lamda

บทที่ 1

บทนำ

1.1 บทนำต้นเรื่อง

เนื่องจากประชากรส่วนใหญ่ในประเทศไทยมีอาชีพเกษตรกรรม ดังนั้นจึงมีความจำเป็นในการนำสารกำจัดแมลงมาใช้ในการป้องกันการทำลายแมลงศัตรูพืช เพื่อรักษาและเพิ่มจำนวนของผลผลิต สารกำจัดแมลงส่วนใหญ่โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารอินทรีย์สังเคราะห์เป็นสารซึ่งมีความเป็นพิษสูงและบางชนิดยังมีความคงทนในสิ่งแวดล้อม การนำมาใช้นอกจากให้ประโยชน์แล้วย่อมมีโทษควบคู่ด้วยเสมอ สารกำจัดแมลงอาจเป็นอันตรายต่อมนุษย์และสัตว์ได้ทั้งโดยตรงและทางอ้อม ทางตรงเกิดจากการได้รับสารระหว่างการใช้อย่างไรก็ตามทางอ้อมเกิดจากการได้รับสารกำจัดแมลงตกค้างที่มีอยู่ในอาหารที่ใช้บริโภค การได้รับพิษเฉียบพลันโดยตรงเป็นอันตรายที่เด่นชัดที่สุดอาจมีผลให้ต้องสูญเสียชีวิต เสียเวลา ลดความสามารถในการทำงาน ตลอดจนเสียค่าใช้จ่ายในการรักษาพยาบาล สาเหตุของการได้รับสารกำจัดแมลงอาจเกิดมาจากหลายสาเหตุ ได้แก่ 1) การฆ่าตัวตายโดยเจตนา 2) การประกอบอาชีพ ได้แก่ ผู้ที่ประกอบอาชีพที่เกี่ยวข้องกับการเกษตร 3) อุบัติเหตุได้รับสารโดยไม่เจตนา เช่น โดยการกินเนื่องจากเข้าใจผิดว่าเป็นยารักษาโรค 4) กินอาหารที่มีสารกำจัดแมลงโดยการปนเปื้อนมากับผักและผลไม้ที่มีวิธีปฏิบัติในการใช้สารไม่ถูกต้อง เช่น เก็บเกี่ยวผลผลิตทันทีหลังจากการใช้สาร 5) การฆาตกรรม ได้รับพิษโดยผู้อื่นเจตนา (สุภาณี, 2540) นอกจากสาเหตุเหล่านี้แล้วอาจมีการนำสารกำจัดแมลงมาใช้ในทางที่ผิดกฎหมายโดยได้นำมาเป็นส่วนผสมในสารเสพติด เช่น สี่คูณร้อย ซึ่งมีหลายสูตร ได้แก่ น้ำต้มใบกระท่อมผสมกับโค้ก ยาแก้ไอที่ผสมโคเคอีนและยากันยุง และพบว่าในส่วนของยากันยุงมีส่วนผสมของสารกำจัดแมลงกลุ่ม synthetic pyrethroids ดังนั้นจากสาเหตุทั้งหมดที่กล่าวมาข้างต้นโอกาสการได้รับสารกำจัดแมลงกลุ่ม synthetic pyrethroids มีค่อนข้างสูงทำให้คนมีความเสี่ยงต่อการเกิดพิษจากสารกลุ่ม synthetic pyrethroids โดยในการศึกษานี้เลือกใช้ permethrin เป็นตัวแทนของสารกลุ่ม synthetic pyrethroids

สาร permethrin เป็นสารกำจัดแมลงกลุ่ม synthetic pyrethroids ที่พัฒนามาจากสาร pyrethrum ซึ่งสกัดจากดอกไม้กลุ่มเบญจมาศ (*Chrysanthemum spp.*) synthetic pyrethroids มีความเสถียรต่อแสงมากกว่าสาร pyrethrum และมีความเป็นพิษต่อสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมต่ำกว่า (Wolansky and Harrill, 2008) สาร pyrethroids แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ type I และ type II โครงสร้างทางเคมีของทั้ง 2 กลุ่มแตกต่างกันตรงที่ type II มี cyanide อยู่ด้วย จึงเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า α -cyanopyrethroids โครงสร้างที่แตกต่างกันนี้ทำให้สาร 2 กลุ่ม มีความเป็นพิษ

แตกต่างกัน ความเป็นพิษในคนมักเกิดจาก type II มากกว่า type I จากการศึกษาในสัตว์ทดลองพบว่าสาร pyrethroids type I ทำให้เกิดกลุ่มอาการ tremor syndrome ได้แก่ fine tremor, hyperreflexia และ sympathetic activation ส่วน pyrethroids type II ทำให้เกิดกลุ่มอาการ choreoathetosis/salivation syndrome ซึ่งได้แก่ salivation, coarse tremor, choreoathetosis, hyperreflexia, sympathetic activation และ convulsion (Soderlund *et al.*, 2002) สารกลุ่ม synthetic pyrethroids เมื่อเข้าสู่ร่างกายจะเกิดเมแทบอลิซึมที่ตับเป็นส่วนใหญ่ โดยการเกิดปฏิกิริยา hydrolysis ด้วยเอนไซม์ carboxylesterase ทำให้ได้ phenoxybenzyl alcohol ซึ่งไม่มีพิษ ก่อนจะถูกขับออก (Choi *et al.*, 2002; Nakamura *et al.*, 2007) carboxylesterase นอกจากจะมีอยู่ที่ตับแล้วยังมีอยู่ที่อวัยวะอื่นๆ ได้แก่ ไต ลำไส้เล็ก และเลือด (Sato *et al.*, 2006; Crow *et al.*, 2007) ในด้านการแพทย์ พิษวิทยา และนิติวิทยาศาสตร์ ที่ต้องมีการเก็บตัวอย่างเลือดเพื่อตรวจวัดระดับสาร permethrin จึงควรตระหนักถึงการเกิดปฏิกิริยา hydrolysis โดยเอนไซม์ดังกล่าวในตัวอย่างเลือดซึ่งจะมีผลต่อความเสถียรของ permethrin ก่อนที่จะนำมาสกัดและวิเคราะห์หาปริมาณของ permethrin ได้อย่างถูกต้อง

1.2 การตรวจเอกสาร

1.2.1 เอนไซม์ carboxylesterase

1.2.1.1 นิยามของเอนไซม์

เอนไซม์ คือ ตัวเร่งที่ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาที่เกิดในสิ่งมีชีวิต (biocatalyst) ทำให้อัตราเร็วของปฏิกิริยาเพิ่มสูงขึ้นมากกว่าปฏิกิริยาที่ไม่มีตัวเร่ง ในปฏิกิริยาที่มีเอนไซม์เป็นตัวเร่งนั้นสารที่เข้าทำปฏิกิริยากันมีชื่อเรียกว่าสับสเตรต (substrate) โดยส่วนใหญ่แล้วเอนไซม์ชนิดหนึ่งๆ จะสามารถเร่งปฏิกิริยาที่มีสับสเตรตชนิดใดชนิดหนึ่งโดยเฉพาะเท่านั้น นั่นคือเอนไซม์เป็นตัวเร่งที่มีความจำเพาะต่อสับสเตรต เอนไซม์ส่วนใหญ่เป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาต่างๆ ที่เกิดในสิ่งมีชีวิต ซึ่งโปรตีนเป็นชีวโมเลกุลขนาดใหญ่ (macromolecule) ที่มีอยู่ในเซลล์มากที่สุดคือประมาณ 50% โดยน้ำหนักของสารทั้งหมดที่มีอยู่ในเซลล์ โปรตีนอาจแบ่งตามรูปร่างลักษณะได้เป็น โปรตีนลักษณะเส้น (fibrous protein) และโปรตีนลักษณะก้อน (globular protein) โปรตีนลักษณะเส้นได้แก่ โปรตีนที่เป็นเส้นยาวซึ่งอาจบิดเป็นเกลียว โปรตีนลักษณะเส้นจะไม่ละลายน้ำ มีความแข็งแรงเหมาะสำหรับทำหน้าที่เป็นโปรตีนโครงสร้าง (structural protein) ส่วนโปรตีนลักษณะก้อนมักจะละลายน้ำและอาจเตรียมได้ในรูปผลึก จะเห็นว่าสายโพลีเพปไทด์ของเอนไซม์ไม่ได้อยู่ในรูปเส้นตรง แต่จะอยู่ในรูปที่พันกันจนเป็นก้อน มีผลทำให้หมู่แขนงข้าง R (side chain R group) ของกรดอะมิโนที่ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยา (active amino acid) ซึ่งจะอยู่ห่างกันมาก ถ้าสายโพลีเพปไทด์ไม่เกิดการพันกันจนเป็นก้อนให้เข้ามาอยู่ใกล้กันเกิดเป็นบริเวณแอคทีฟ (active site) ของเอนไซม์ บริเวณแอคทีฟของเอนไซม์นี้จะมีกรดอะมิโนที่

ทำหน้าที่เป็นบริเวณจับ (binding site) สำหรับสับสเตรต โคเอนไซม์ โคแฟกเตอร์ หรือสารที่มีโครงสร้างคล้ายกับสับสเตรต และจะมีกรดอะมิโนที่ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการสร้างหรือการแตกออกของพันธะเรียกว่าเป็นบริเวณเร่ง (พัชรา, 2541)

1.2.1.2 คุณสมบัติในการเป็นตัวเร่งของเอนไซม์

การเร่งปฏิกิริยา (catalysis) หมายถึงการเปลี่ยนแปลงอัตราเร็วของปฏิกิริยาเคมีที่เกิดขึ้นภายใต้การทำงานของสารที่เรียกว่าตัวเร่งปฏิกิริยา (catalyst) ในการเร่งปฏิกิริยาตัวเร่งจะเข้าร่วมทำปฏิกิริยาเกิดเป็นปฏิกิริยาขั้นตอนมูลฐานต่างๆ (elementary step) และในปฏิกิริยาขั้นตอนมูลฐานสุดท้ายจะให้ตัวเร่งที่ไม่มีเปลี่ยนแปลงทางเคมีกลับคืนมา ดังนั้นเมื่อเปรียบเทียบปฏิกิริยาขณะที่ไม่มีตัวเร่งกับปฏิกิริยาที่มีตัวเร่ง จะพบว่าปฏิกิริยาขณะที่มีตัวเร่งจะมีการเปลี่ยนแปลงเกี่ยวกับจำนวนและชนิดของปฏิกิริยาขั้นตอนมูลฐานที่เกิดขึ้น นอกจากนี้ตัวเร่งจะไม่ทำให้ค่าสมดุลคงที่ของปฏิกิริยาเปลี่ยนแปลงไป โดยตัวเร่งเพียงแต่ไปทำให้อัตราเร็วคงที่ของปฏิกิริยาไปทางขวา (forward reaction) และของปฏิกิริยาทวนกลับ (reverse reaction) เพิ่มขึ้นในปริมาณที่เท่าๆกันเท่านั้นและเมื่อพิจารณาถึงการทำงานของเอนไซม์ จะเห็นว่าเอนไซม์ก็คือตัวเร่งของปฏิกิริยาเคมีต่างๆ ที่เกิดในสิ่งที่มีชีวิตนั่นเอง

การที่เอนไซม์สามารถเร่งให้ปฏิกิริยาเกิดได้เร็วขึ้น เพราะเอนไซม์สามารถลดพลังงานที่สับสเตรตต้องใช้ในการทำปฏิกิริยาได้ พลังงานจำนวนนี้เรียกว่า พลังงานของการกระตุ้น (activation energy, E_a) หรือพลังงานอิสระของการกระตุ้น (free energy of activation) โดยก่อนที่โมเลกุลของสับสเตรตจะเกิดปฏิกิริยาเปลี่ยนเป็นโมเลกุลของผลิตภัณฑ์ได้นั้น โมเลกุลของสับสเตรตจะต้องได้รับพลังงานเพิ่มเติมมาจำนวนหนึ่งก่อน พลังงานเพิ่มเติมนี้ก็คือพลังงานอิสระของการกระตุ้น ซึ่งจะทำให้โมเลกุลของสับสเตรตถูกเปลี่ยนเป็นสารที่ถูกกระตุ้นแล้ว (activated complex) ซึ่งเป็นสารที่มีพลังงานสูงอยู่ที่สภาพเปลี่ยน สารที่ถูกกระตุ้นแล้วนี้มีความไม่เสถียร (unstable) โดยมีโครงสร้างอยู่ระหว่างตัวทำปฏิกิริยากับผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาและพร้อมที่จะเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาได้อย่างรวดเร็ว โมเลกุลของสับสเตรตที่มีพลังงานเท่ากับหรือมากกว่าพลังงานอิสระของการกระตุ้นและมีสภาพอยู่ที่สภาพเปลี่ยนเท่านั้นที่สามารถเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาได้ ดังนั้นอัตราเร็วของปฏิกิริยาการเปลี่ยนสับสเตรตไปเป็นผลิตภัณฑ์ จะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นของสับสเตรตที่อยู่ที่สภาพเปลี่ยน ดังนั้นสามารถทำให้ปฏิกิริยาเกิดเร็วขึ้นได้โดยการเพิ่มพลังงานให้แก่สับสเตรต เช่น ให้ความร้อนแก่สับสเตรต หรือโดยการลดพลังงานอิสระของการกระตุ้นลง ถ้าพลังงานอิสระของการกระตุ้นมีค่าน้อยจะทำให้จำนวนโมเลกุลของสับสเตรตสามารถเปลี่ยนไปอยู่ที่สภาพเปลี่ยนได้มากขึ้นทำให้ปฏิกิริยาเกิดได้เร็วขึ้น เอนไซม์เป็นตัวเร่งโดยไปลดพลังงานอิสระของการกระตุ้น โดยเอนไซม์จะจับกับสับสเตรตแล้วทำให้สับสเตรตนั้นเปลี่ยนเป็นสารที่สภาพเปลี่ยนที่แตกต่างไปจากขณะที่ไม่มีเอนไซม์จับอยู่ โดยสารที่สภาพเปลี่ยนขณะมีเอนไซม์จับอยู่จะมีความเสถียรมากกว่าสารที่สภาพ

เปลี่ยนขณะไม่มีเอนไซม์จับอยู่ทำให้สารที่สภาพเปลี่ยนขณะมีเอนไซม์จับอยู่จะมีระดับพลังงานอิสระต่ำกว่าสารที่สภาพเปลี่ยนขณะไม่มีเอนไซม์จับอยู่นั้นคือค่าพลังงานอิสระของการกระตุ้นของปฏิกิริยาที่มีเอนไซม์เป็นตัวเร่งจะมีค่าน้อยกว่าพลังงานอิสระของการกระตุ้นของปฏิกิริยาขณะไม่มีเอนไซม์เป็นตัวเร่ง นอกจากนี้การจับของเอนไซม์กับซับสเตรตจะทำให้ซับสเตรตเปลี่ยนเป็นสารที่สภาพเปลี่ยนได้ง่ายและรวดเร็วขึ้น การที่มีซับสเตรตอยู่ที่สภาพเปลี่ยนได้มากขึ้นทำให้เกิดผลผลิตของปฏิกิริยาได้มากขึ้น นั่นคืออัตราเร็วของปฏิกิริยาจะเพิ่มขึ้น (พัชรา, 2541)

1.2.1.3 การตั้งชื่อและการจำแนกชนิดของเอนไซม์

สหภาพชีวเคมีนานาชาติ (The International Union of Biochemistry) ได้ตั้งคณะกรรมการเอนไซม์ (The Enzyme Commission) ขึ้นเพื่อกำหนดวิธีการตั้งชื่อเอนไซม์ (nomenclature) โดยได้จัดแบ่งเอนไซม์ออกเป็นพวกต่าง ๆ (classification) ตามชนิดของเอนไซม์ที่ปฏิกิริยานั้นเร่งและกำหนดวิธีการตั้งชื่อเอนไซม์

1.) การตั้งชื่อเอนไซม์

ชื่อของเอนไซม์ที่ตั้งขึ้นโดยคณะกรรมการของเอนไซม์เรียกว่า ชื่อตามระบบ (systematic name) ส่วนชื่อที่เคยใช้เรียกกันมาก่อน เช่น แลกเทส หรือพิวมาเรสนั้นเรียกว่า ชื่อทั่วไป (trivial name) สำหรับชื่อตามระบบนั้น ประกอบด้วยชื่อของซับสเตรตแล้วตามด้วยคำที่บ่งบอกถึงชนิดของปฏิกิริยาที่ลงท้ายด้วย “เอส” ซึ่งส่วนใหญ่จะเป็นชื่อของพวกใหญ่ (main class) หรือพวกย่อย (subclass) ของเอนไซม์นั้น และถ้าปฏิกิริยาที่ถูกเร่งด้วยเอนไซม์มีอยู่สองชนิด เช่น มีทั้งออกซิเดชัน (oxidation) และดีคาร์บอกซิเลชัน (decarboxylation) ก็ให้เขียนปฏิกิริยาชนิดที่สองไว้ในวงเล็บ เช่น oxidoreductase (decarboxylation)

2.) การจำแนกชนิดของเอนไซม์

คณะกรรมการเอนไซม์นานาชาติ (International Enzyme Commission) ได้จัดระบบจำแนกชนิดของเอนไซม์และระบุชนิดด้วยเลขรหัสสี่ตัว โดยที่รหัสตัวแรกจะใช้แบ่งเอนไซม์เป็นหกจำพวกใหญ่ (class) ตามลักษณะกว้างๆของปฏิกิริยาซึ่งแต่ละจำพวกนี้ยังแบ่งออกเป็นพวกย่อย (subclass) (ดังตารางที่ 1.1) และรหัสสองตัวสุดท้ายมักจะหมายถึงซับสเตรตของเอนไซม์อย่างละเอียดขึ้น ดังนั้นชื่อตามระบบ (systematic name) ของเอนไซม์จะบอกถึงซับสเตรตที่เกี่ยวข้องและลักษณะสำคัญของปฏิกิริยา (มนตรี, 2542)

ตารางที่ 1.1 การจำแนกเอนไซม์

Class และลักษณะของปฏิกิริยา	หมายเลข subclass	ส่วนของสับสเตรตที่เกี่ยวข้อง
1. Oxido-reductases ออกซิเดชัน/รีดักชัน	1.1	-CH-OH
	1.2	>C=O
	1.3	-CH=CH-
	1.4	>CH-NH ₂
	1.5	>CH-NH-
	1.6	NADH, NADPH
2. Transferases การเคลื่อนย้ายอะตอมหรือหมู่ที่เกิดขึ้น ระหว่างโมเลกุลสองโมเลกุล	2.1	-CH ₃ , -CH ₂ -OH
	2.2	H-CH=O, >C=O
	2.3	R-CH=O (acyl)
	2.4	C ₆ H ₁₂ O ₅ (glucosyl)
	2.7	-PO ₃ H ₂ (phosphoryl)
	2.8	ส่วนที่มีอะตอมกำมะถัน
3. Hydrolases การแยกสลายด้วยน้ำ	3.1	R-CH=O
	3.2	C ₆ H ₁₂ O ₅ -O-R
	3.3	R-O-R'
	3.4	-CO-NH-
	3.5	C-N bond
	3.6	-CO-O=CO-
4. Lyases เติมเข้าไปในพันธะคู่	4.1	>C=C<
	4.2	>C=O
	4.3	>C=N-
5. Isomerases เปลี่ยนไอโซเมอร์	5.1	L-isomer \rightleftharpoons D-isomer
	5.2	Cis-isomer \rightleftharpoons trans-isomer
6. Lygases การเชื่อมโมเลกุลสองโมเลกุลเข้าด้วยกัน ซึ่งจะเกิดควบคู่ (couple) กับการแตกออก ของ pyrophosphate (สร้างพันธะโดยการ ใช้ ATP)	6.1	C-O
	6.2	C-S
	6.3	C-N
	6.4	C-C

สำหรับเอนไซม์ carboxylesterase จัดอยู่ใน EC 3.1.1.1 ของระบบ Enzyme Comission เป็นเอนไซม์พวกไฮโดรเลส (hydrolase) ซึ่งเอนไซม์พวกนี้จะเร่งปฏิกิริยาการแยกสลายด้วยน้ำ (hydrolytic reaction) ดังนี้ (Wheelock *et al.*, 2005 ; Hosokawa, 2008)



ตารางที่ 1.2 การแบ่งประเภทและการตั้งชื่อของเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเทอเรสในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Sato and Hosokawa, 2006)

Gene symbol	Trivial name	Species	Homology	Genebank
CES1A1	Macrophage/hCE1/HU1a/	<i>Homo sapiens</i>	100.0	L07765/AB119995
CES1A2	CES HU1b	<i>H. sapiens</i>	99.3	AB119996
CES1A3	Human placenta	<i>H. sapiens</i>	93.3	MN016280
CES1A4	Monkey CES1	<i>Macaca fascicularis</i>	92.9	AB010633
CES1A5	Rabbit 1	<i>Orytolagus cuniculus</i>	81.1	AF036930
CES1B1	Hamster AT31	<i>Mesocricetus auratus</i>	79.0	D50578
CES1B2	Mouse TGH	<i>Mus musculus</i>	78.0	AF378751
CES1B3	Mouse CES MH1	<i>M. musculus</i>	77.9	AB023631
CES1B4	Rat ES-10	<i>Rattus norvegicus</i>	77.6	X51974
CES1B5	Rat BC078681	<i>R. norvegicus</i>	76.9	BC078681
CES1C1	Dog CESD1	<i>Canis familiaris</i>	79.7	AB023629
CES1C2	Felica-CESK1	<i>Felis catus</i>	78.5	AB114676
CES1C3	Felis-CES1	<i>F. catus</i>	78.0	AB094147
CES1C4	Pig CES1	<i>Sus scrofa</i>	77.6	AF064741
CES1C5	Pig CES	<i>S. scrofa</i>	76.6	X63323
CES1D1	Mouse ES22 (Egasin)	<i>M. musculus</i>	75.5	S8091
CES1D2	Rat ES-3 (Egasin)	<i>R. norvegicus</i>	75.0	X81395
CES1E1	Mouse EST1	<i>M. musculus</i>	73.2	Y12887

ตารางที่ 1.2 การแบ่งประเภทและการตั้งชื่อของเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเทอเรสในสัตว์เลี้ยงลูก
ด้วยนม (ต่อ)

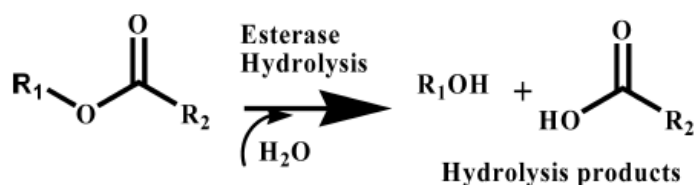
Gene symbol	Trivial name	Spicies	Homology	Genebank
CES1F1	Bovine-REH	<i>Bos taurus</i>	71.5	AY369075
CES1G1	Rat CES 60KDa	<i>R. norvegicus</i>	69.1	M20629
CES1G2	Mouse EST-N	<i>M. musculus</i>	65.5	M57960
CES1H1	Mouse ES-4	<i>M. musculus</i>	67.3	BC013479
CES1H2	Rat hydrolaseC	<i>R. norvegicus</i>	67.4	U10698
CES1H3	Rat ES-4/hydrolaseB	<i>R. norvegicus</i>	67.0	X81825
CES1H4	Rat CES RL1	<i>R. norvegicus</i>	66.0	AB023630
CES2A1	Human CES2/hCE2	<i>H. sapiens</i>	46.8	U60553
CES2A2	Rabbit 2	<i>O. cuniculus</i>	46.9	P14943 (protein)
CES2A3	HamsterAT41	<i>M. auratus</i>	46.2	D50577
CES2A4	Mouse BC022148	<i>M. musculus</i>	45.9	BC022148
CES2A5	Bovine CES2	<i>B. taurus</i>	43.8	NM001034260
CES2A6	Mouse mCES2	<i>M. musculus</i>	43.5	BC031170/BC015
CES2A7	Mouse CESBC015286	<i>M. musculus</i>	43.5	290 BC015286
CES2A8	Rat BC097486	<i>R. norvegicus</i>	44.3	BC097486
CES2A9	Rat SICES	<i>R. norvegicus</i>	44.1	AB010632
CES2A10	Rat CES RL4 (mCES2)	<i>R. norvegicus</i>	42.8	AB010635/AB191
CES2A11	Hamstar AT51	<i>M. auratus</i>	45.7	005 D28566
CES2A12	Rat CES6	<i>R. norvegicus</i>	44.5	NM144743
CES3A1	Human hCE3	<i>H. sapiens</i>	44.8	XM016735
CES3A2	Mouse ES31	<i>M. musculus</i>	41.1	S64130
CES4A1	Dog CAUXIN	<i>C. familiaris</i>	45.5	AB186392
CES4A2	Felica CAUXIN	<i>F. catus</i>	45.5	AB045377
CES4B1	Rat CUXIN	<i>R. norvegicus</i>	42.4	AF479659
CES4B2	Mouse CAUXIN	<i>M. musculus</i>	41.9	AB186393

ตารางที่ 1.2 การแบ่งประเภทและการตั้งชื่อของเอนไซม์คาร์บอกซิลเอสเทอร์ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (ต่อ)

Gene symbol	Trivial name	Species	Homology	Genebank
CES4C1	Human AcylCoA	<i>H. sapiens</i>	36.8	AK056109
CES5A1	Human AADAC	<i>H. sapiens</i>	31.3	NM001086
CES5B1	Mouse AADAC	<i>M. musculus</i>	29.9	BC054823
CES5B2	Rat AADAC	<i>R. norvegicus</i>	25.6	BC088143

1.2.1.4 การทำงานของเอนไซม์ carboxylesterase

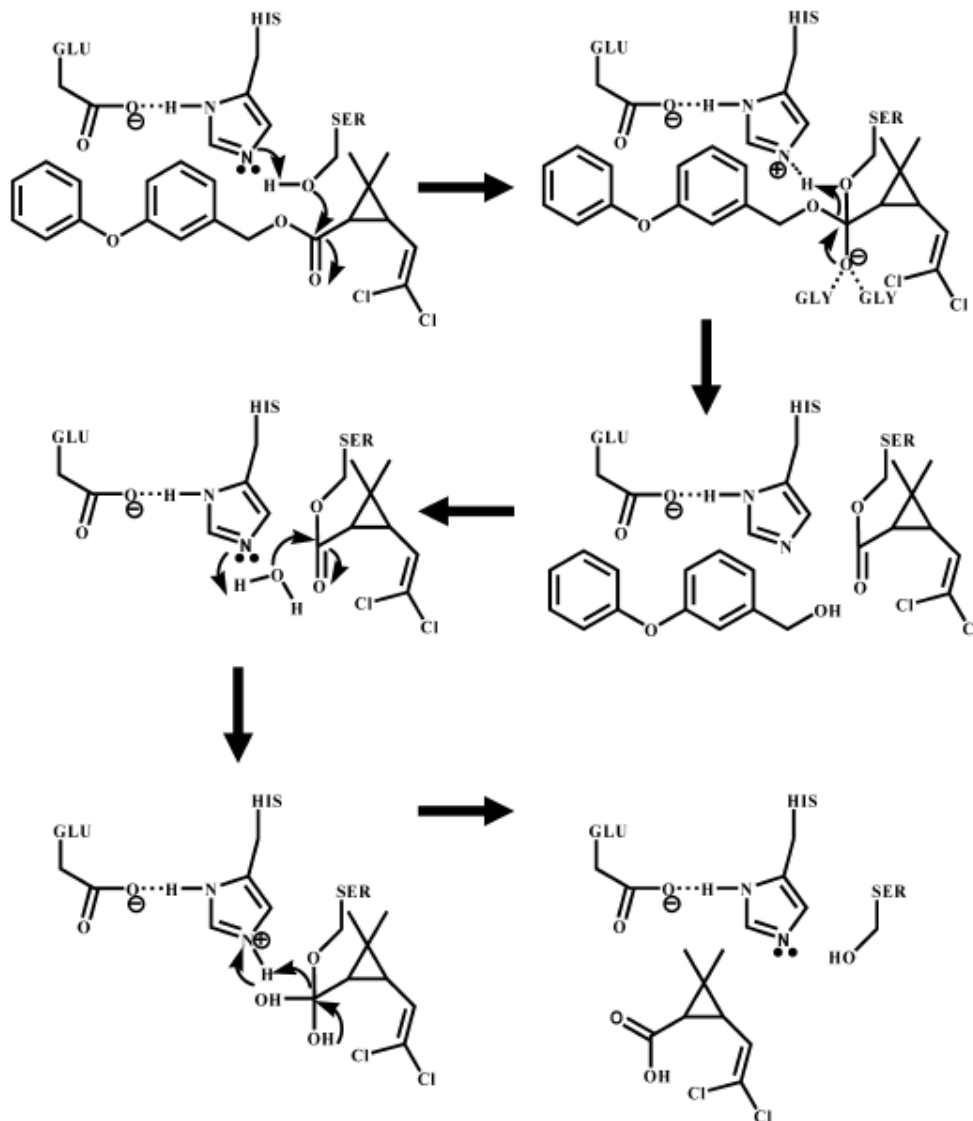
เอนไซม์ carboxylesterase (CES) หรือเอนไซม์ esterase เป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการเกิด hydrolysis ของเอสเทอร์ภายในเซลล์และภายนอกเซลล์ ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยานี้คือ carboxylic acid กับ alcohol (ดังแสดงรูปที่ 1.1) เอนไซม์ carboxylesterase ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมประกอบด้วยกลุ่มของยีนจำนวนมากซึ่งจะอยู่บริเวณ endoplasmic reticulum (ER) ของเนื้อเยื่อต่างๆ เอนไซม์ carboxylesterase มีประสิทธิภาพในการกระตุ้นปฏิกิริยา hydrolysis ของสารเคมีที่มีองค์ประกอบของหมู่เอสเทอร์และเอไมด์ รวมถึงการกำจัดพิษหรือการทำงานในกระบวนการเมแทบอลิซึมของยาชนิดต่างๆ ซึ่งการทำงานของเอนไซม์ carboxylesterase มีระดับสูงที่สุดในไมโครโซมตับของสัตว์จำนวนมาก เอนไซม์ carboxylesterase ในกระบวนการเมแทบอลิซึมของยาจะเกิดขึ้นในตับรวมทั้งขบวนการเปลี่ยนแปลงทางชีวภาพของสารประกอบทั้งภายในเซลล์และภายนอกเซลล์ให้เปลี่ยนไปเป็นสารประกอบที่มีความเป็นขั้วเพื่อกำจัดออกจากร่างกาย



รูปที่ 1.1 แสดงกลไกการเกิดปฏิกิริยา hydrolysis ของเอนไซม์ esterase โดยทำปฏิกิริยารวมตัวกับน้ำได้เป็น alcohol และ acid (Wheelock *et al*, 2005)

หน้าที่ของเอนไซม์ carboxylesterase ในการทำลายความเป็นพิษของ permethrin เนื่องจากในการกำจัดสิ่งแปลกปลอมจำนวนมากที่ละลายในไขมันออกจากร่างกายนั้นขึ้นอยู่กับ การที่สิ่งแปลกปลอมเหล่านี้จะถูกเปลี่ยนแปลงให้เป็นสารประกอบที่ละลายน้ำได้ ซึ่งสารกำจัด แมลงกลุ่ม pyrethroids เป็นสารประกอบที่มีความเป็นขั้วน้อยมากและมีการสะสมในเนื้อเยื่อ ไขมัน ดังนั้นเอนไซม์ carboxylesterase จึงมีผลมากที่สุดในการเพิ่มความสามารถในการละลาย น้ำของสารที่มีหมู่ carboxyl และ ester ในปฏิกิริยา hydrolysis ซึ่งประกอบด้วย alcohol และ carboxylic acid โดยเมแทบอลิท์ของสารกำจัดแมลงกลุ่ม pyrethroids ที่ได้จากปฏิกิริยา hydrolysis สามารถเปลี่ยนเป็นสารประกอบที่ละลายน้ำได้และถูกกำจัดออกจากร่างกายทาง ปัสสาวะ (Sogorb *et al.*, 2002)

จากรูปที่ 1.2 แสดงการทำงานของเอนไซม์ carboxylesterase ในการเกิดปฏิกิริยา hydrolysis ของสาร permethrin โดยเกิดจากการเคลื่อนย้ายโปรตอนจาก HIS ไปยัง SER ทำให้เพิ่มความเป็น nucleophilicity ของ SER ที่หมู่ hydroxyl ที่อยู่บริเวณปลายสุด หลังจากนั้นมีการเปลี่ยนแปลงความเสถียรของ HIS โดยจะสร้างพันธะไฮโดรเจนไปจับกับ GLU และ SER ที่เป็น nucleophile ก็จะจับกับหมู่ carbonyl ที่มีการสูญเสียอิเล็กตรอนของสาร permethrin ที่เป็นเอสเทอร์ซึ่งทำให้มีความเสถียรโดยการจับกับ GLY 2 หมู่ที่เหลือโดยจะเกาะอยู่กับออกซิเจนที่เป็น ประจุลบ (oxyanion) จากนั้นก็เปลี่ยนไปอยู่ในรูปของ acyl-enzyme complex ทำให้เกิด กระบวนการปลดปล่อย SER และส่วนที่เป็น alcohol ของสาร permethrin หลังจากนั้นการ กระตุ้น HIS โดยโมเลกุลของน้ำทำให้มีการจับกับ acyl-enzyme complex ขั้นตอนนี้จะเกิดขึ้น ซ้ำๆ และมีการปลดปล่อยในส่วนที่เป็นกรดของสาร permethrin (Wheelock *et al.*, 2005)



รูปที่ 1.2 แสดงกลไกการทำงานของเอนไซม์ carboxylesterase ในการเกิดปฏิกิริยา hydrolysis ของสาร permethrin (GLU=glutamate, HIS=histidine, SER=serine, GLY=glycine)

1.2.1.4 ปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ carboxyl esterase

1) อิทธิพลของ pH ต่อความเสถียรของเอนไซม์

ความสามารถของเอนไซม์ในการจับกับสับสเตรตและในการเร่งปฏิกิริยาขึ้นอยู่กับประจุของเอนไซม์หรือของสับสเตรต ที่ pH ต่ำหรือสูงเกินไปมักทำให้ประจุเปลี่ยนไปจนไม่เหมาะสมที่จะทำปฏิกิริยากัน นอกจากนี้ที่ pH สูงมากหรือต่ำมากอาจทำให้โครงสร้างของเอนไซม์เสียสภาพธรรมชาติไปด้วย (มนตรี, 2542)

2) อิทธิพลของอุณหภูมิต่อความเสถียรของเอนไซม์

อัตราเร็วของปฏิกิริยาเคมีจะเพิ่มเมื่อเพิ่มอุณหภูมิ การเพิ่มอุณหภูมิจะทำให้สารที่ทำปฏิกิริยากันมีพลังงานมากพอที่จะทำให้สารนั้นกลายเป็นสารที่ถูกกระตุ้นแล้วมีพลังงานสูงอยู่ที่สภาพเปลี่ยน สารที่ถูกกระตุ้นแล้วมีความไม่เสถียรและจะเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาอย่างรวดเร็ว ดังนั้น อัตราเร็วของปฏิกิริยาการเปลี่ยนสารทำปฏิกิริยาไปเป็นผลิตภัณฑ์จะแปรเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นของสารที่สภาพเปลี่ยนสำหรับปฏิกิริยาที่มีเอนไซม์เป็นตัวเร่งก็เช่นกัน การเพิ่มอุณหภูมิจะทำให้อัตราเร็วของปฏิกิริยาเพิ่มแต่การเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิเพื่อให้อัตราเร็วของปฏิกิริยาเอนไซม์เพิ่มนั้นมีขีดจำกัด ทั้งนี้เนื่องจากเอนไซม์เป็นโปรตีนที่มีโครงสร้างสามมิติที่สลับซับซ้อนและการที่เอนไซม์สามารถเร่งปฏิกิริยาได้เอนไซม์จะต้องมีโครงสร้างสามมิติที่เหมาะสมแก่การทำงานโดยมีการจัดเรียงตัวของหมู่แขนงข้าง R ของกรดอะมิโนต่างๆ โดยเฉพาะที่บริเวณแอคทีฟอย่างพอเหมาะที่จะให้ซับสเตรตเข้าจับแล้วเกิดปฏิกิริยาเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์ขึ้นได้ โครงสร้างสามมิติของเอนไซม์ที่จำเป็นแก่การทำงานนี้จะคงรูปอยู่ได้ก็ต้องอาศัยแรงอย่างอ่อนของพันธะไฮโดรเจน ionic bond และพันธะอื่นๆ จำนวนมาก ซึ่งพันธะเหล่านี้ง่ายแก่การถูกทำลาย ดังนั้นในทางปฏิบัติแล้วโมเลกุลของเอนไซม์เป็นสิ่งที่ละเอียดอ่อนง่ายแก่การถูกทำลายทำให้เอนไซม์เสียสภาพธรรมชาติและไม่สามารถเร่งปฏิกิริยาได้อีกต่อไป ดังนั้นเมื่อเพิ่มอุณหภูมิให้สูงขึ้นในตอนแรกจะทำให้อัตราเร็วของปฏิกิริยาเพิ่มเพราะมีการเพิ่มความเข้มข้นของสารที่สภาพเปลี่ยนแต่ถ้าเพิ่มอุณหภูมิสูงขึ้นไปอีกจนทำให้เอนไซม์เสียสภาพธรรมชาติไปจะทำให้อัตราเร็วของปฏิกิริยาลดลงเพราะมีการเพิ่มอัตราเร็วของการเกิดการเสียสภาพธรรมชาติของเอนไซม์ทำให้เอนไซม์ที่สามารถทำงานได้มีปริมาณลดลง (พัชรา, 2541)

3) สารยับยั้งเอนไซม์ (inhibitor)

Djeridane และคณะ (2008) ได้ค้นพบสาร flavone ชนิดใหม่คือ flavone-3,4', 7-trihydroxy-3'-methoxy-7-glucoside ซึ่งมีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ carboxylesterase ในตับหนู การยับยั้งเป็นแบบแข่งขัน (competitive inhibition) ซึ่งตัวยับยั้งแบบแข่งขันเป็นสารที่จับกับเอนไซม์อิสระแล้วทำให้เอนไซม์ไม่สามารถจับกับที่ซับสเตรตได้หรือในทางตรงกันข้ามเอนไซม์ที่มีซับสเตรตจับอยู่แล้วจะไม่สามารถจับกับตัวยับยั้งได้เช่นกัน ทั้งนี้ อาจเป็นเพราะตัวยับยั้งไปจับกับเอนไซม์ตรงบริเวณเดียวกันกับที่ซับสเตรตจับ หรือจับที่คนละบริเวณกับที่ซับสเตรตจับแต่การจับของตัวยับยั้งกับเอนไซม์ไม่สามารถจับซับสเตรตได้ ตัวยับยั้งแบบแข่งขันนี้อาจเป็นสารที่มีโครงสร้างคล้ายซับสเตรต ซึ่งพบว่าสาร flavone-3,4',7-trihydroxy-3'-methoxy-7-glucoside มีค่า inhibition constant เท่ากับ 16 μM ขึ้นอยู่กับลักษณะเฉพาะของโครงสร้างของ flavone-3,4',7-trihydroxy-3'-methoxy-7-glucoside ซึ่งเป็นตัวยับยั้งบริเวณ active site ของเอนไซม์ โดยสารนี้จะจับบริเวณผิวหน้าของเอนไซม์ carboxylesterase

Zhang และ Fariss (2002) พบว่าสาร thenoyltrifluoroacetone มีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ carboxylesterase ในตับหมู ในการเพิ่มความสามารถของเอนไซม์ carboxylesterase ในการยับยั้งการทำงานของ mitochondrial complex II การยับยั้งเป็นแบบไม่แข่งขัน (non-competitive inhibition) ตัวยับยั้งประเภทนี้ไม่มีผลต่อการจับของสับสเตรตกับเอนไซม์ ทั้งสับสเตรตและตัวยับยั้งสามารถจับกับเอนไซม์ได้โดยไม่มีอิทธิพลต่อกัน ตัวยับยั้งสามารถจับได้ทั้งกับเอนไซม์อิสระและสารประกอบเชิงซ้อนเอนไซม์-สับสเตรต และสับสเตรตสามารถจับได้ทั้งกับเอนไซม์อิสระและสารประกอบเชิงซ้อนเอนไซม์-ตัวยับยั้ง แต่สารประกอบเชิงซ้อนที่เกิดขึ้นไม่สามารถสลายให้ผลิตภัณฑ์ ทั้งนี้อาจเป็นเพราะการจับของตัวยับยั้งกับเอนไซม์จะทำให้หมู่เร่งไม่อยู่ในตำแหน่งเหมาะสมสำหรับการเร่งปฏิกิริยา เมื่อสับสเตรตเข้าจับกับเอนไซม์ เอนไซม์จะเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างไปทำให้หมู่เร่งมาอยู่ในตำแหน่งที่ใกล้เคียงกันกับพันธะที่จะถูกทำให้แตกออกของสับสเตรต ตัวยับยั้งมีอิทธิพลต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเอนไซม์แต่ไม่มีอิทธิพลต่อการเข้าจับของสับสเตรตกับเอนไซม์ ซึ่งสาร thenoyltrifluoroacetone มีค่า K_i เท่ากับ 0.61×10^{-6} และค่า IC_{50} เท่ากับ 0.54×10^{-6} M

Hicks และคณะ (2007) ได้สังเคราะห์และประเมินความสามารถของสาร fluorobenzoins และ fluorobenzils ในการยับยั้งเอนไซม์ carboxylesterase ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม พบว่าสาร fluorobenzoins เป็นตัวยับยั้งเอนไซม์ carboxylesterase ที่ดีมากที่สุด จากการทดลองในการตรวจวิเคราะห์การยับยั้งเอนไซม์ carboxylesterase พบว่า benzoin เป็นตัวยับยั้งเอนไซม์ carboxylesterase ที่ไม่ดี มีค่า K_i เท่ากับ 2.7 และ 7.2 μ M สำหรับเอนไซม์ carboxylesterase ในลำไส้เล็กและในตับของคน ตามลำดับ ในการเติมอะตอมของ fluorine ที่วง benzene ใน benzoins ผลที่ได้คือสารจะมีความแรงในการยับยั้งเอนไซม์ carboxylesterase ส่วนใหญ่ fluorobenzoins analogs จะมีค่า K_i อยู่ในช่วง 8 nM ถึง 1.3 μ M ซึ่งตัวยับยั้งที่มีความแรงมากที่สุดคือสาร 1,2-bis (2,3,4-trifluorophenyl)-2-hydroxyethanone มีค่า K_i เท่ากับ 8.3 nM สำหรับเอนไซม์ carboxylesterase ในหนู fluorobenzoins เป็นตัวยับยั้งที่มีความแรงมากกว่า benzoin ในทางตรงกันข้าม benzyl analogs และ fluorine substitution บนวง benzene มีผลในการเพิ่มความแรงในการยับยั้งของสาร benzoin

1.2.2 สารกำจัดแมลง

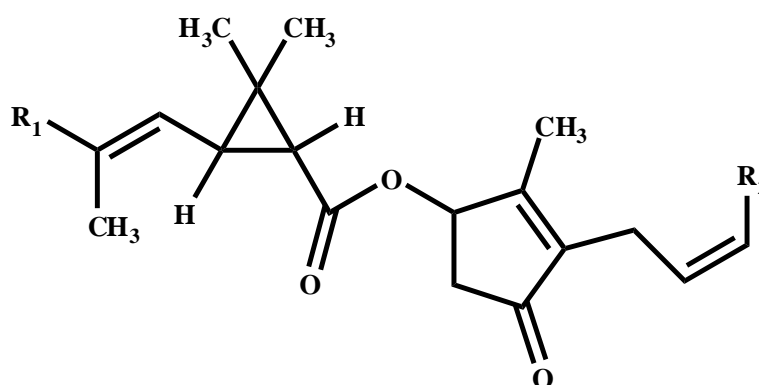
สารกำจัดแมลง หมายถึง สารเคมีเป็นพิษซึ่งแสดงผลในการกำจัดหรือป้องกันแมลงได้ โดยอาจจะเป็นสารประกอบทางเคมีที่มนุษย์สังเคราะห์ขึ้น หรือเป็นสารเคมีที่ได้จากธรรมชาติ ลักษณะสารกำจัดแมลงที่ดีนั้นควรจะฆ่าแมลงได้อย่างรวดเร็ว ไม่มีพิษต่อสัตว์ที่มีกระดูกสันหลัง รวมทั้งมนุษย์ ราคาถูก สามารถหาง่าย สถานะทางเคมีคงทน ไม่ติดไฟ ไม่มีสีและไม่มีกลิ่น (อรัญ, 2547)

1.2.2.1 ประเภทของสารกำจัดแมลง

สารกำจัดแมลงถูกแบ่งได้เป็น 4 กลุ่ม ตามแหล่งที่มา ดังนี้

1) สารกำจัดแมลงที่ได้จากพืช (Plant insecticides) ตัวอย่างเช่น

สารกำจัดแมลงในกลุ่มนี้ได้แก่ ไพรีทริน (รูปที่ 1.3)



	R ¹	R ²
Pyrethrin I	CH ₃	CH=CH ₂
Pyrethrin II	COOCH ₃	CH=CH ₂
Cinerin I	CH ₃	CH ₃
Cinerin II	COOCH ₃	CH ₃
Jasmolin I	CH ₃	CH ₂ CH ₃
Jasmolin II	COOCH ₃	CH ₂ CH ₃

รูปที่ 1.3 แสดงโครงสร้างทางเคมีของไพรีทริน

ไพรีทรินเป็นสารซึ่งสกัดได้จากส่วนดอกของพืชในวงศ์ Compositae สกุล *Crysanthemum* มีชื่อสามัญเรียกทั่วไปว่า ไพรีทรัม (pyrethrum) ปัจจุบันที่ปลูกเป็นการค้า มี 3 ชนิด คือ *C. cinerariaefolium*, *C. coccineum* และ *C. marshallii* ชนิดแรกมีความสำคัญทางเศรษฐกิจมากที่สุด มนุษย์รู้จักนำไพรีทรัมมาใช้เพื่อกำจัดแมลงมาเป็นเวลาหลายร้อยปีมาแล้ว ไพรีทรัมมีถิ่นกำเนิดอยู่บริเวณเทือกเขาคอเคซัส (Caucasus) หลังจากนั้นการปลูกไพรีทรัมจึงกระจายไปยังแหล่งอื่นๆ เช่น ยูโกสลาเวีย และญี่ปุ่น ปัจจุบันแหล่งผลิตประมาณร้อยละ 90 อยู่ในประเทศแถบแอฟริกาตะวันออก เช่น เคนยา แทนซาเนีย ราแวนดา เป็นต้น

สารออกฤทธิ์ที่สำคัญมี 6 ชนิด (ตารางที่ 1.3) เรียกรวมว่า ไพรีทริน ปริมาณสารไพรีทรินส่วนใหญ่อยู่ในดอกชั้นใน (disc floret) ช่วงเวลาที่เหมาะสมต่อการเก็บเกี่ยวเพื่อจะให้ได้สารไพรีทรินสูงที่สุด คือ ช่วงระยะที่ดอกชั้นในบานประมาณ 3 แถว หรือประมาณร้อยละ 50 ต่อจากนั้นเมื่อดอกชั้นในบานเพิ่มมากขึ้นปริมาณสารไพรีทรินจะลดน้อยลงเรื่อยๆ การเก็บดอกไพรีทรินจึงต้องทำเป็นระยะๆ โดยใช้มือเลือกเก็บเฉพาะดอกที่พอเหมาะ ซึ่งเป็นสาเหตุอย่างหนึ่งที่ทำให้ต้นทุนการผลิตสูง นอกจากนั้นไพรีทรินยังเป็นพืชที่ต้องการสภาพพื้นที่และสภาพภูมิอากาศที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตอยู่ในช่วง 16-23 °C และต้องการอุณหภูมิต่ำกว่า 16.7 °C เป็นเวลานาน 6 สัปดาห์ เพื่อกระตุ้นให้เกิดการออกดอก

ในประเทศไทยมีการปลูกไพรีทรินครั้งแรกในปี พ.ศ. 2514 ที่ดอยอ่างขาง ตามโครงการหลวงพัฒนาภาคเหนือ โดยนำพันธุ์ชिरายูกิ จากประเทศญี่ปุ่น มาทดลองปลูก ปรากฏว่าได้ผลดีเป็นที่น่าพอใจ ผลผลิตสูงประมาณไร่ละ 83-143 กิโลกรัม ผลผลิตที่ได้อยู่ในระดับดีเท่าหรือดีกว่าผลผลิตจากประเทศเคนยา ซึ่งเป็นประเทศผู้ผลิตและส่งออกรายใหญ่ของโลก

ไพรีทรินใช้ในการป้องกันและกำจัดแมลงในบ้านเรือนได้ดี มีพิษสูง ฆ่าแมลงได้มากชนิดอย่างรวดเร็วในลักษณะสัมผัสตาย และมีพิษต่ำต่อสัตว์เลือดอุ่น นอกจากนั้นไพรีทรินยังมีคุณสมบัติในการ น็อก-ดาวน แมลงได้คืออีกด้วย การน็อก-ดาวน คือ ลักษณะอาการอย่างหนึ่งที่เกิดขึ้นกับแมลงที่ได้รับสารไพรีทรินและสารกำจัดแมลงชนิดอื่นบางชนิด ส่วนใหญ่เกิดกับแมลงสองปีกในอันดับ Diptera เช่น ยุง และแมลงวัน แมลงที่ได้รับสารจะไม่สามารถบินต่อไปได้ร่วงลงสู่พื้น และทรงตัวไม่ได้ ในกรณีที่แมลงได้รับสารในปริมาณต่ำ อาการดังกล่าวนี้จะเกิดขึ้นเพียงช่วงระยะเวลาหนึ่งโดยที่แมลงจะสามารถฟื้นตัวกลับสู่สภาพปกติได้

ตารางที่ 1.3 สารออกฤทธิ์ 6 ชนิด ในไพรีทริน

แอกอฮอลล์	กรด	
	chrysanthemic	pyrethric
Pyrethrolone	pyrethrin I (35 %)	pyrethrin II (32 %)
Cinerolone	cinerin I (10 %)	cinerin II (14 %)
Jasmolone	jasmolin I (5 %)	jasmolin II (4 %)

คุณสมบัติของสารไพรีทริน

สารไพรีทรินมีคุณสมบัติ คือ เป็นผงสีเหลือง มีกลิ่นหอม ไม่ละลายน้ำแต่ละลายได้ในน้ำมัน หรือ organic solvent เมื่อละลายหรือผสมแล้วไม่สามารถรักษาฤทธิ์ในการฆ่าแมลงไว้ได้นาน เสื่อมสลายได้ง่ายในต่าง แสง และอากาศ ไม่มีพิษตกค้าง สลายตัวได้ดีมากในสิ่งแวดล้อม สารนี้จะเข้าสู่ตัวแมลงโดยซึมผ่านผนังลำตัวและโดยการกินเข้าไป และออกฤทธิ์ต่อระบบประสาทของแมลง ทำให้แมลงสลบและตายอย่างรวดเร็ว นอกจากนี้สารไพรีทรินยังมีคุณสมบัติเป็นสารเสริมฤทธิ์ คือ เมื่อใช้สารไพรีทรินจำนวนเล็กน้อยร่วมกับสารกำจัดแมลงชนิดอื่น ๆ จะเป็นตัวช่วยเสริมให้สารกำจัดแมลงที่มีไพรีทรินผสมมีประสิทธิภาพในการฆ่าแมลงสูงขึ้น

สารไพรีทรินมีพิษต่อคนหรือสัตว์เลือดอุ่นน้อยมาก หากได้รับสารนี้ทางผิวหนังหรือจากการหายใจ จะทำให้ผิวหนังเป็นผื่นคัน บวมหรือเป็นตุ่มใสๆ หายใจหอบ น้ำมูกไหล จาม ไอ ถ้ากินเข้าไปจะรู้สึกชาที่ลิ้นและในปาก ปวดศีรษะ คลื่นไส้ อาเจียน และท้องเดิน กล้ามเนื้อกระตุก หรือมีอาการชักได้

2) สารกำจัดแมลงที่ได้จากจุลินทรีย์ (microbial insecticide)

สารกำจัดแมลงที่ได้จากจุลินทรีย์ หมายถึง สารกำจัดแมลงซึ่งผลิตขึ้นจากเชื้อจุลินทรีย์ ซึ่งทำให้แมลงเกิดโรคและนำมาใช้ในลักษณะเดียวกับสารกำจัดแมลงทั่วไป เพื่อให้แมลงซึ่งเป็นเป้าหมายในการกำจัดเกิดโรคและตายในที่สุด

ในสภาพธรรมชาติจุลินทรีย์เป็นชีวปัจจัยอย่างหนึ่งซึ่งควบคุมการเพิ่มประชากรของแมลง จุลินทรีย์เหล่านี้ได้แก่ แบคทีเรีย ไวรัส รา และโปรโตซัว เป็นต้น การนำเชื้อจุลินทรีย์มาใช้ในลักษณะเดียวกันกับการใช้สารกำจัดแมลงได้รับความสนใจ เนื่องจากคุณสมบัติเด่นหลายอย่าง เช่น ไม่ทำให้สัตว์เลือดอุ่นและพืชเป็นโรค มีความจำเพาะในการทำลายแมลงเฉพาะกลุ่ม

3) สารกำจัดแมลงอนินทรีย์ (inorganic insecticides)

สารอนินทรีย์เป็นสารกำจัดแมลงในยุคแรก เป็นสารที่มีโครงสร้างโมเลกุลไม่ซับซ้อน ปัจจุบันมีปริมาณการใช้ไม่มากนัก ตัวอย่างเช่น

- สารไซโอไซยาเนต (thiocyanate)

สารชนิดนี้มีชื่อเรียกทั่วไปว่า ลีเทน (lethane) หรือธาไมท์ (thamite) ซึ่งใช้พ่นหรือทาตามตัวของสัตว์เลี้ยงเพื่อป้องกันแมลงไล่ตอม

- คอปเปอร์ อะซิโต-อาร์ซีไนต์ (copper aceto-arsenite)

สารชนิดนี้มีชื่อเรียกทั่วไปว่า paris green ซึ่งเป็นสารผสมระหว่างสารหนู และทองแดง มีลักษณะเป็นผงสีเขียว ใช้พ่นหรือโรยตามแหล่งน้ำเพื่อทำลายลูกน้ำยุง แต่สารชนิดนี้มีพิษสูงต่อมนุษย์มาก

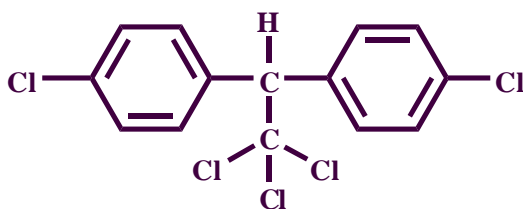
- ฟอสฟอรัส (phosphorus)

สารนี้มีลักษณะเป็นขี้ผึ้ง มีกลิ่นฉุน ละลายน้ำได้เล็กน้อย มีพิษได้ถ้ากินเข้าไป เมื่อถูกตามผิวหนังจะทำให้ผิวหนังไหม้พุพอง สารฆ่าแมลงชนิดนี้มักใช้กำจัดแมลงสาบ

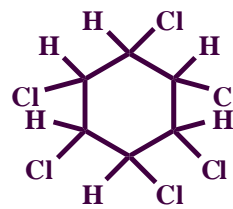
4) สารกำจัดแมลงอินทรีย์สังเคราะห์ (synthesized organic insecticides)

4.1) ออร์กาโนคลอรีน (organochlorine) ลักษณะทั่วไปของโครงสร้างโมเลกุลของสารกำจัดแมลงในกลุ่มนี้ ได้แก่

- ประกอบด้วยอะตอมของคาร์บอน ไฮโดรเจน และคลอรีน เป็นองค์ประกอบหลัก (บางกรณีอาจมีออกซิเจนและกำมะถันด้วย) และมีพันธะ C-Cl ในโมเลกุล
- ไม่มีตำแหน่งทำปฏิกิริยา (reaction site) ภายในโมเลกุล
- มีโครงสร้างส่วนที่เป็นวงแหวนคาร์บอนอยู่ในโมเลกุล รวมทั้งวงแหวนเบนซีน (benzene ring) ด้วย
- โมเลกุลไม่มีขั้ว (nonpolar molecule) ละลายในไขมันได้ดี
- มีเสถียรภาพ ไม่สลายตัวง่ายในสิ่งแวดล้อม



DDT



Hexachlorocyclohexane

รูปที่ 1.4 แสดงลักษณะโครงสร้างโมเลกุลของออร์กาโนคลอรีน 2 ชนิด ซึ่งจัดอยู่ในแต่ละกลุ่มย่อย

กลุ่มย่อยที่ 1 : dichlorodiphenyl trichloroethane (DDT) และสารคล้าย DDT (DDT and DDT analogues) DDT เป็นสารกำจัดแมลงที่มีการใช้แพร่หลายทั่วโลกในช่วงระยะเวลา 20 ปี ได้รับการยกย่องว่าเป็นสารกำจัดแมลงสมบูรณ์แบบ เพราะเหตุผลหลายประการ คือ มีพิษต่อแมลงหลายชนิด มีความคงทนออกฤทธิ์ อยู่ได้นาน มีพิษเฉียบพลันต่อคนและสัตว์เลือดอุ่นค่อนข้างต่ำ (จัดอยู่ในระดับพิษปานกลาง) และราคาถูกเพราะต้นทุนการผลิตต่ำ ปริมาณการใช้ DDT เริ่มลดลงภายหลังปี พ.ศ. 2514 เนื่องจากปัญหามลภาวะในสิ่งแวดล้อมและการสร้างความต้านทานโดยแมลงศัตรู ได้มีการประกาศห้ามใช้ DDT ในประเทศที่พัฒนาแล้วหลายประเทศ รวมทั้งสหรัฐอเมริกา ซึ่งประกาศห้ามใช้ภายในประเทศ แต่ยังมีการผลิตเพื่อส่งขายประเทศ

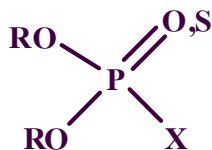
กำลังพัฒนาเพื่อใช้ในการควบคุมโรคมalaria และแมลงเบียนภายนอก เช่น หมัด และเหา ในประเทศไทยก็มีการห้ามใช้ DDT ในการเกษตร

สารคล้าย DDT ซึ่งเคยมีการใช้เป็นสารกำจัดแมลง ได้แก่ [1,1-dichloro-2,2-bis(4-chlorophenyl) ethane] (TDE), methoxychor, perthane, dicofol และ chlorobenzilate แต่ในปัจจุบันเฉพาะสองชนิดหลังเท่านั้นที่ยังมีการใช้ทั่วไปรวมทั้งในประเทศไทยเพื่อกำจัดไรศัตรูพืช

กลุ่มย่อยที่ 2 : เฮกซาคลอร์ไซโคลเฮกเซน (hexachlorocyclohexane) สารกำจัดแมลงในกลุ่มนี้มีชนิดเดียว คือ BHC (benzenehexachloride) BHC เป็นสารผสมของ 5 ไอโซเมอร์ ซึ่งมีระดับความเป็นพิษต่อแมลงแตกต่างกัน แกมมาไอโซเมอร์ (gamma isomer) มีความเป็นพิษสูงสุด จึงมีการผลิตแยกเฉพาะแกมมาไอโซเมอร์อย่างเดียว มีชื่อสามัญว่า lindane มีสมบัติละลายน้ำได้ดีกว่า DDT ประมาณ 100 เท่า และเนื่องจากมีค่าความดันไอสูงระเหยเป็นไอได้ง่าย จึงมีความเป็นพิษทางการหายใจด้วย BHC ใช้ได้กับแมลงประเภทปากกัดกิน เช่น หนอนผีเสื้อ และประเภทปากดูดกิน เช่น เพลี้ยและมวน BHC มีพิษสูงต่อปลวก ผึ้ง และศัตรูธรรมชาติ

4.2) ออร์กาโนฟอสฟอรัส (organophosphorus) เป็นสารกำจัดแมลงกลุ่มใหญ่ซึ่งมีจำนวนชนิดของสารออกฤทธิ์มากที่สุด การพัฒนาใช้สารในกลุ่มนี้เริ่มตั้งแต่ระหว่างสงครามโลกครั้งที่ 2 นักวิทยาศาสตร์ชาวเยอรมันนำโดย Gerhard Schrader เป็นผู้เริ่มทำการวิจัยสารประกอบในกลุ่มนี้ซึ่งนำไปสู่การพัฒนาเป็นแก๊สพิษซึ่งมีผลต่อระบบประสาท เช่น ทาบูน และซาริน

ปัจจุบันมีสารประกอบออร์กาโนฟอสฟอรัสมากกว่า 100,000 ชนิด ที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นเพื่อศึกษาความเป็นพิษต่อแมลงและมีประมาณมากกว่า 100 ชนิดที่ได้มีการผลิตขายในเชิงการค้า ชนิดแรกมีพัฒนาขึ้นแนะนำให้ใช้เป็นสารกำจัดแมลงใน พ.ศ.2488 คือ ชราดาน แต่ยังไม่แพร่หลายเท่าสารในกลุ่มออร์กาโนคลอรีน จนถึงประมาณ พ.ศ. 2505 จึงได้มีการยอมรับนำสารในกลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัสชนิดต่างๆ มาใช้ทดแทนสารออร์กาโนคลอรีน เนื่องจากมีข้อดีต่างๆ ได้แก่ การมีประสิทธิภาพสูงต่อแมลงที่สร้างความต้านทานต่อสารออร์กาโนคลอรีน มีการแตกสลายในสิ่งมีชีวิต (biodegradable) และมีการปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมน้อยกว่า

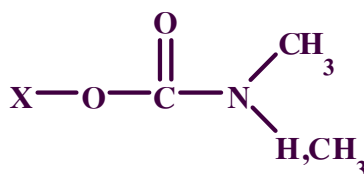


รูปที่ 1.5 แสดงลักษณะโครงสร้างทั่วไปของสารกำจัดแมลงกลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัส

R ทั้ง 2 หมู่จะเหมือนกัน อาจเป็นหมู่เมทิล (methyl) หรือเอทิล (ethyl) หรือเป็นหมู่ที่ค่อนข้างซับซ้อนกว่า โดยอาจเป็นสารแอลลิฟาติก (aliphatic) โฮโมไซคลิก (homocyclic) หรือเฮเทอโรไซคลิก (heterocyclic) ซึ่งต่อกับอะตอมฟอสฟอรัสโดยตรงหรือบางครั้งต่อดังนี้มีเอสเทอร์ (ester) หรือไทโอเอสเทอร์ (thioester) เป็นตัวเชื่อมโยง ได้แก่ P-O-X หรือ P-S-X

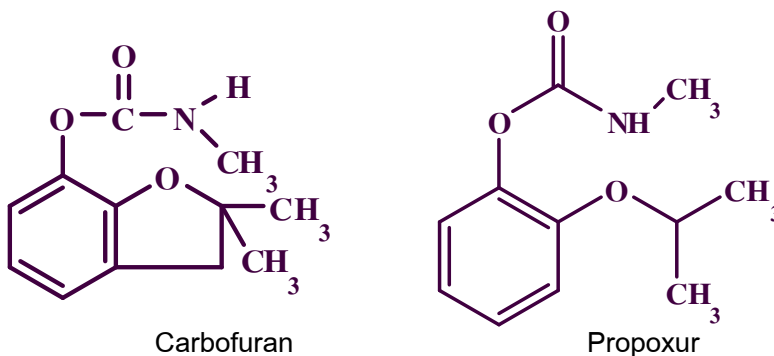
ตัวอย่างของสารกำจัดแมลงออร์กาโนฟอสฟอรัส ได้แก่ malathion, parathion, methyl parathion, diazinon และ fenitrothion

4.3) คาร์บาเมต (carbamate) : สารกำจัดแมลงในกลุ่มคาร์บาเมตที่ใช้อยู่ปัจจุบัน ถึงแม้จะมีไม่มากนักแต่มีความสำคัญในด้านประโยชน์ใช้กำจัดแมลงได้ดี คาร์บาเมตที่ใช้เป็นสารกำจัดแมลงทั้งหมดเป็นเอสเทอร์ของกรดคาร์บาเมก (carbamic acid) มีลักษณะโครงสร้างโมเลกุลดังนี้



รูปที่ 1.6 แสดงลักษณะโครงสร้างทั่วไปของสารกำจัดแมลงกลุ่มคาร์บาเมต

X เป็นหมู่คาร์โบไซคลิก (carbocyclic group) หรือหมู่เฮเทอโรไซคลิก (heterocyclic group) หรืออนุพันธ์ของออกซิม (oxime derivative)



Carbaryl

Carbofuran

Propoxur

รูปที่ 1.7 แสดงตัวอย่างโครงสร้างโมเลกุลของสารกำจัดแมลงกลุ่มคาร์บาเมต

การค้นพบสารกำจัดแมลงกลุ่มคาร์บาเมตมีความเกี่ยวเนื่องกับการค้นพบสารพิษจากพืชในธรรมชาติ ชาวพื้นเมืองในอาฟริกาตะวันตกมีการใช้เมล็ดถั่วคาลาบาร์ (calabar bean) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Physostigma benenosum* (Balfour) ให้ผู้ถูกกล่าวหากินเพื่อพิสูจน์ความบริสุทธิ์ กล่าวคือ ถ้าผู้ถูกกล่าวหากินแล้วไม่ตายแสดงว่าเป็นผู้บริสุทธิ์ ต่อมาได้มีการสกัดแยกสารไฟโซสติกมีน (physostigmine) ซึ่งเป็นเอสเทอร์ของกรดคาร์บาเมกได้จากเมล็ดพืชชนิดนี้ และพบว่าสารนี้มีพิษร้ายแรงในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ในระบบประสาท การที่ผู้ถูกกล่าวหาบางคนรอดตายอาจเป็นเพราะได้อาเจียนเอาสารพิษออกมา เนื่องจากเมล็ดพืชชนิดนี้มีสารซึ่งมีฤทธิ์กระตุ้นกระเพาะอาหารด้วย

4.4) ไพริทรอยด์สังเคราะห์ (synthetic pyrethroid) : เป็นกลุ่มของสารกำจัดแมลง ซึ่งได้จากการสังเคราะห์เลียนแบบโครงสร้างพื้นฐานของสาร pyrethrin ซึ่งสกัดจากดอก pyrethrum สารคล้ายสาร pyrethrin ซึ่งมีคุณสมบัติในการฆ่าแมลงนี้เรียกรวมว่า synthetic pyrethroid จากการค้นพบโครงสร้างโมเลกุลของ pyrethrin และสามารถสังเคราะห์กรดคริสซานทีมิก (chrysanthemic acid) ได้ จึงเริ่มมีการสังเคราะห์สารขึ้นเลียนแบบ โดยพยายามปรับเปลี่ยนโครงสร้างโมเลกุลเพื่อให้ได้สารที่มีคุณสมบัติบางอย่างที่ต้องการเพิ่มขึ้น เช่น มีความคงทนต่อแสงเพิ่มขึ้น มีการหนีอกดาวน้แมลงเร็วขึ้น มีพิษในการฆ่าแมลงสูงขึ้น และมีพิษต่อสัตว์เลือดอุ่นต่ำลง ความสำเร็จในการพัฒนาสาร synthetic pyrethroids เป็นตัวอย่างของความสำเร็จอย่างสูงในการใช้สารเคมีธรรมชาติเป็นต้นแบบเพื่อสังเคราะห์สารกำจัดแมลงชนิดใหม่ๆ เนื่องจาก pyrethroid แต่ละชนิดมีไอโซเมอร์ได้หลายรูป ปัจจุบันจึงมีการสังเคราะห์ pyrethroid ขึ้นมากมาย บางชนิดมีลักษณะโครงสร้างโมเลกุลที่แตกต่างไปจาก pyrethrin มาก รวมทั้งการพยายามปรับบางส่วนของโมเลกุลให้คล้ายโมเลกุลของ DDT การจำแนกกลุ่มย่อยของสารกำจัดแมลง synthetic pyrethroid จึงทำได้ยาก

Allethrin และ bioallethrin เป็นสารสองชนิดแรกที่สังเคราะห์ขึ้นได้สำเร็จโดยการเลียนแบบ pyrethrin I เริ่มผลิตออกขายประมาณปี พ.ศ. 2492 ชนิดอื่นๆ ที่มีผลผลิตตามมา ได้แก่ resmethrin และ bioresmethrin ซึ่ง resmethrin เป็น synthetic pyrethroid ชนิดแรกที่มีประสิทธิภาพฆ่าแมลงได้หลายชนิดในระดับเดียวกับ pyrethrin I โดยมีประสิทธิภาพสูงขึ้นไปกว่า allethrin ประมาณ 40 เท่า

สาร synthetic pyrethroid ซึ่งผลิตขึ้นในยุคต้นๆ นี้ ทุกชนิดยังมีข้อเสีย กล่าวคือ โมเลกุลจะแตกสลายง่ายในสภาพที่ถูกแสงโดยเฉพาะอย่างยิ่งแสงอัลตราไวโอเล็ตจึงใช้ประโยชน์ได้ดีเฉพาะการกำจัดแมลงในบ้านเรือนเท่านั้น จนกระทั่งปี พ.ศ. 2515 ได้ประสบความสำเร็จในการสังเคราะห์ permethrin เป็น synthetic pyrethroid ชนิดแรกซึ่งมีเสถียรภาพต่อแสงสามารถใช้กำจัดแมลงในสภาพไร้อากาศได้

ในช่วงเวลาตั้งแต่ประมาณปี พ.ศ. 2513 เป็นต้นมาถึงปัจจุบัน ได้มีความก้าวหน้าอย่างมากในการพัฒนาสารกลุ่มนี้ ตัวอย่างสารกำจัดแมลงกลุ่ม synthetic pyrethroid ซึ่งมีการผลิตจำหน่าย ได้แก่ cypermethrin, deltamethrin และ fenvalerate เป็นต้น สารเหล่านี้ในโมเลกุลจะมีส่วนที่เป็นหมู่อัลฟาไซยาโน (alpha-cyano group) อยู่ด้วย มีคุณสมบัติในการกำจัดแมลงได้ดีสามารถใช้ฉีดพ่นเพื่อป้องกันกำจัดแมลงศัตรูพืชในสภาพไร้อากาศได้

สาร synthetic pyrethroid มีข้อดีคือ มีพิษสูงและออกฤทธิ์เร็ว ฆ่าแมลงได้หลายชนิด มีพิษต่อสัตว์เลือดอุ่นต่ำ และไม่ทำให้เกิดปัญหาพิษตกค้างในสิ่งแวดล้อมแต่ก็มีข้อเสียเนื่องจากไม่ปลอดภัยต่อแมลงที่มีประโยชน์ เช่น ผึ้ง และแมลงตัวห้ำต่างๆ นอกจากนี้ยังมีพิษสูงมากต่อสัตว์น้ำ เช่น ปลา และสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังต่างๆ

เนื่องจากการเสื่อมพิษของ synthetic pyrethroid จะเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วภายในร่างกายของสัตว์เลือดอุ่นเนื่องจากสัตว์เลือดอุ่นมีระบบเอนไซม์ไมโทออกซิจีเนส และเอนไซม์ esterase หลายชนิด ซึ่งสามารถเร่งปฏิกิริยาสลายไพรีทรอยด์ก่อนที่จะเคลื่อนย้ายไปถึงตำแหน่งออกฤทธิ์ที่ระบบประสาท (สุภานี, 2540)

ตารางที่ 1.4 สารกำจัดแมลงกลุ่มไพรีทรอยด์สังเคราะห์

ชื่อสามัญ	ชื่อเคมี	ตัวอย่างชื่อทางการค้า	LD50 หนู (มก./กก.)	
			ทางปาก	ทางผิวหนัง
allethrin	(RS)-3-allyl-2-methyl-4-oxocyclopent-2-enyl(1RS)-cis/trans chrysanthemate	ไพนามิน อัลลีเวียท	685-1,100	>2,500
alpha-cypermethrin	Cyclopropane-carboxylic acid 3-(2,2-dichloroethenyl)-2,2-dimethylcyano(3-phenoxyphenyl) methyl ester, [1-alpha(s), 3-alpha]-(\pm)	บาลา เบสท็อกซ์ โดมิเนกซ์	79	>2,000
s-bioallethrin	De-2-allyl-4-hydroxy-3-methyl-2-cyclopentane-1-one ester of d-trans chrysanthemummonocarboxylic acid		680-784	
bioresmethrin	5-benzyl-3-furylmethyl(1R,3R)-2,2-dimethyl-3-(2-methylprop-1-enyl)cyclopropanecarboxylate	โครสัน ฟอร์เต้	7,070-8,000	>10,000
biphenthrin	(2-methyl[1,1'-biphenyl]-3-yl) methyl-3-(2-chloro-3,3,3-trifluoro-1-propenyl)-2,2-dimethylcyclopropanecarboxylate	เทลสตาร์	375	

ตารางที่ 1.4 สารกำจัดแมลงกลุ่มไพรีทรอยด์สังเคราะห์ (ต่อ)

ชื่อสามัญ	ชื่อเคมี	ตัวอย่างชื่อ ทางการค้า	LD50 หนู (มก./กก.)	
			ทาง ปาก	ทาง ผิวหนัง
cyfluthrin	Cyano(4-fluoro-3-phenoxybenzyl)methyl-3-(2,2-dichloroethenyl)-2,2-dimethylcyclopropanecarboxylate	ไพโรยด์	900	>5,000
cyhalothrin	(RS)-alpha-cyano-3-phenoxybenzyl(Z)-(1RS,3RS)-(2-chloro-3,3,3-trifluoropropenyl)-2,2-Z dimethylcyclopropanecarboxylate	กรีเนาร์ดี คาราเต้	144-243	
cypermethrin	(±)-alpha-cyano(3-phenoxybenzyl (±)cis,trans-3-(2,2-dichlorovinyl) (±)2,2 dimethylcyclopropanecarboxylate	ซิมบุซ ริบคอร์ดี	251-4,123	>2,000 (กระต่าย)
deltamethrin	(S)-alpha-cyano-m-phenoxybenzyl (1R,3R)-3,(2,2-dichlorovinyl)-2, dimethylcyclopropanecarboxylate	บิวท็อกซ์ เดซีส	128.5	>2,000 (กระต่าย)
fenpropathrin	(RS)-alpha-cyano-3-phenoxybenzyl 2,2,3,3-tetramethylcyclopropane carboxylate	แดนิตอล	71.8-72.4	>2,000 (กระต่าย)
fenvalerate	(RS)-alpha-cyano-3-phenoxybenzyl(RS)-2-(4-chlorophenyl)-3-methylbutyrate	ซันรอยด์ ซูมิไซดิน	>451	>5,000
fluvalinate	(RS)-alpha-cyano-3-phenoxybenzyl N-(2-chloro-alpha-alpha-alpha-trifluoro-p-tolyl-D-valinate)		261-282	>20,000
permethrin	3-phenoxybenzyl (1RS,3RS:1RS,3RS) -3-(2,2-dichlorovinyl)-2,2-dimethylcyclopropanecarboxylate	แอมบุซ คูแพกซ์	430-4,000	>4,000
d-phenothrin	3-phenoxybenzyl(1RS,3RS : 1RS,3SR)-2,2-dimethyl-3-(2-methylprop-1-enyl)=cyclopropanecarboxylate		>10,000	>10,000

ตารางที่ 1.4 สารกำจัดแมลงกลุ่มไพรีทรอยด์สังเคราะห์ (ต่อ)

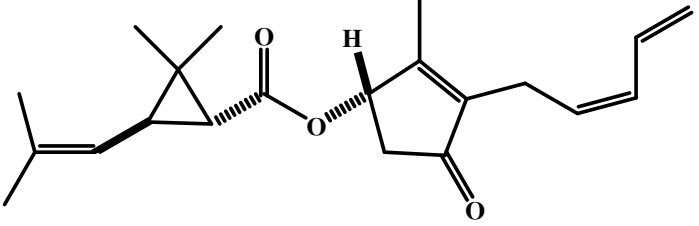
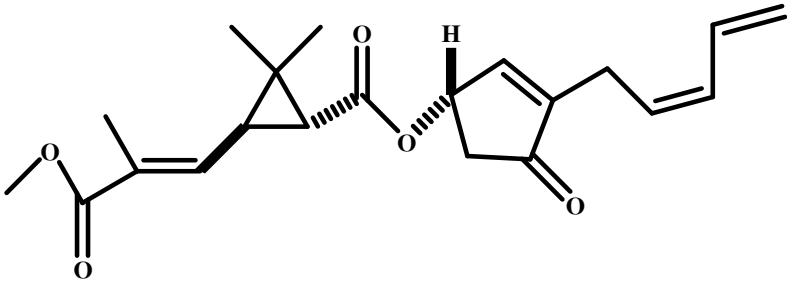
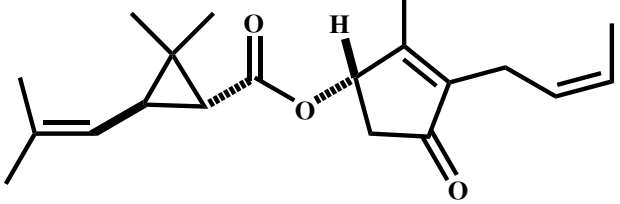
ชื่อสามัญ	ชื่อเคมี	ตัวอย่างชื่อทางการค้า	LD50 หนู (มก./กก.)	
			ทางปาก	ทางผิวหนัง
tetramethrin	3,4,5,6-tetrahydrophthalimidomethyl(IRS)-cis-trans-chrysanthemate		>5,000	>5,000
tralomethrin	(1R,3S) 3[(1',RS)(1'2'2'2'-tetrabromoethyl)]-2,2-dimethylcyclopropanecarboxylic acid(S)-alpha-cyano-3-phenoxybenzylester	ทราเลท	1,070-1,250	>2,000 (กระต่าย)

สารกำจัดแมลงกลุ่ม synthetic pyrethroid สามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มย่อย คือ Type I (ตารางที่ 1.7) และ Type II (ตารางที่ 1.8) ซึ่งมีความแตกต่างกันคือโครงสร้างของสาร pyrethroids Type II มี cyanide (CN) อยู่ด้วย จึงเรียกอีกชื่อว่า “ α -cyanopyrethroids” โครงสร้างที่ต่างกันนี้ทำให้สาร 2 กลุ่ม มีความเป็นพิษและลักษณะทางคลินิกต่างกัน ส่วนที่ก่อให้เกิดภาวะเป็นพิษในคนมักเกิดจาก Type II (α -cyanopyrethroids) มากกว่า type I การศึกษาในสัตว์ทดลองพบว่าสาร pyrethroids type I ทำให้เกิดกลุ่มอาการ “tremor syndrome” คือมี fine tremor, hyperreflexia และ sympathetic activation ส่วน Type II ทำให้เกิดกลุ่มอาการ “choreoathetosis/salivation syndrome” ซึ่งได้แก่ salivation, coarse tremor, choreoathetosis, hyperreflexia, sympathetic activation และ convulsion (Soderlund *et al.*, 2002)

ตารางที่ 1.5 อาการแสดงความเป็นพิษของ pyrethroid type I และ type II ในหนูขาว (Ray and Forshaw., 2000; Ray, 2001)

Type I poisoning	Type II poisoning
Severe fine tremor	Profuse watery salivation Coarse tremor Increased extensor tone
Marked reflex hyperexcitability	Moderate reflex hyperexcitability
Sympathetic activation	Sympathetic activation Choreoathetosis Seizures
Paresthesia (dermal exposure)	Paresthesia (dermal exposure)

ตารางที่ 1.6 ตัวอย่างโครงสร้างทางเคมีของสาร pyrethrins ที่ได้จากธรรมชาติ (Soderlund *et al.*, 2002)

ชื่อสาร	สูตรโครงสร้าง
Pyrethrin I	
Pyrethrin II	
Cinerin I	

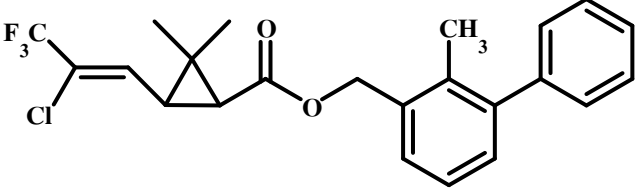
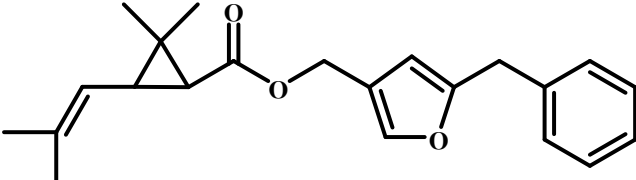
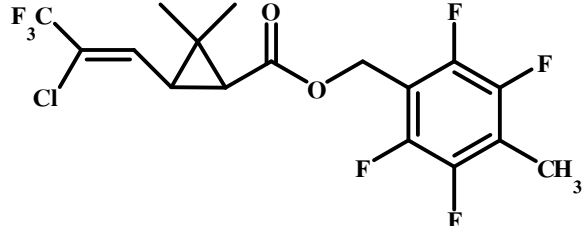
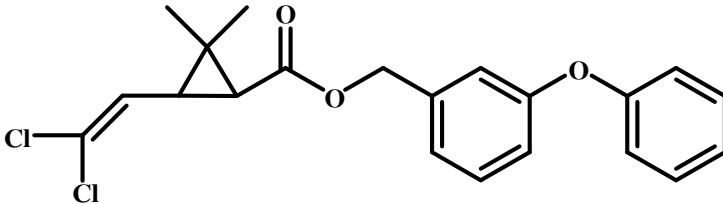
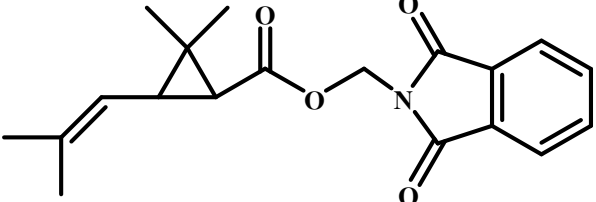
ตารางที่ 1.6 ตัวอย่างโครงสร้างทางเคมีของสาร pyrethrins ที่ได้จากธรรมชาติ (ต่อ)

ชื่อสาร	สูตรโครงสร้าง
Cinerin II	
Jasmolin I	
Jasmolin II	

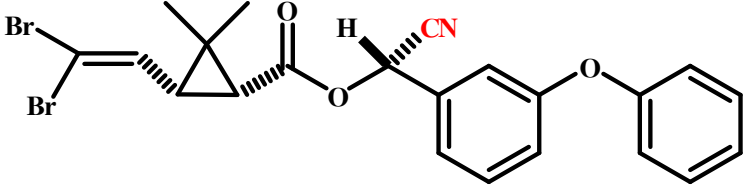
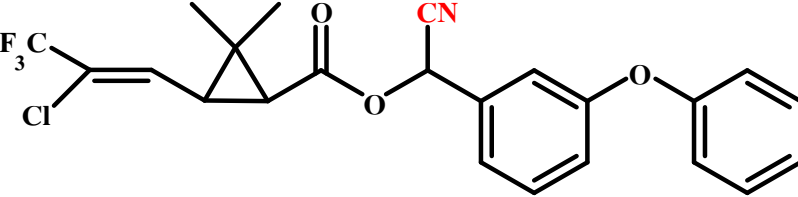
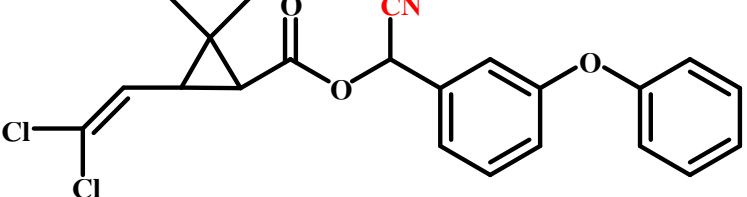
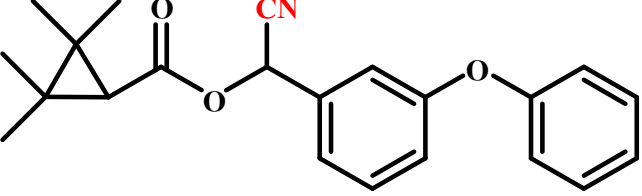
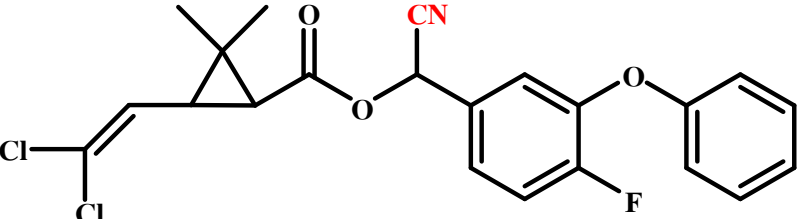
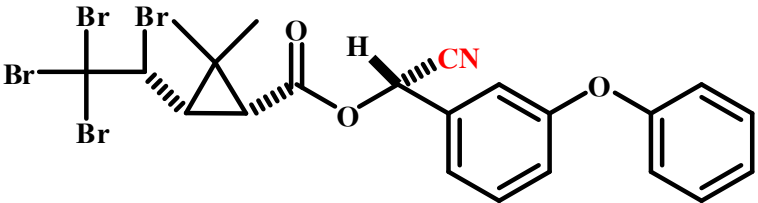
ตารางที่ 1.7 ตัวอย่างโครงสร้างทางเคมีของสาร synthetic pyrethroids (type I) (Soderlund et al., 2002)

ชื่อสาร	สูตรโครงสร้าง
Allethrin	

ตารางที่ 1.7 ตัวอย่างโครงสร้างทางเคมีของสาร synthetic pyrethroids (type I) (ต่อ)

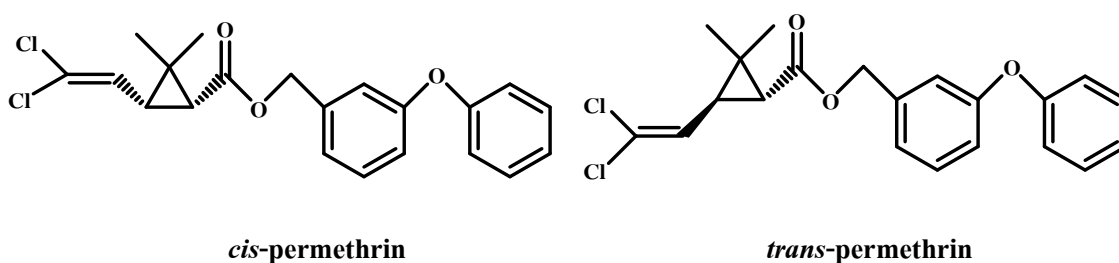
ชื่อสาร	สูตรโครงสร้าง
Bifenthrin	
Resmethrin	
Tefluthrin	
Tetramethrin	
Permethrin	

ตารางที่ 1.8 ตัวอย่างโครงสร้างทางเคมีของสาร synthetic pyrethroids (type II) (Soderlund et al., 2002)

ชื่อสาร	สูตรโครงสร้าง
Deltamethrin	
Cyhalothrin	
Cypermethrin	
Fenpropathrin	
Cyfluthrin	
Tralomethrin	

1.2.3 Permethrin

Permethrin เป็นสารกำจัดแมลงกลุ่ม synthetic pyrethroids แบบ type I ทำให้เกิดกลุ่มอาการ “tremor syndrome” คือมี fine tremor, hyperreflexia และ sympathetic overactivity ในสัตว์ทดลอง (Soderlund *et al.*, 2002) และเป็น synthetic pyrethroid ชนิดแรกที่มีเสถียรภาพต่อแสงสามารถใช้กำจัดแมลงในสภาพไร่ได้ permethrin มีสูตรโครงสร้างทางเคมีที่ประกอบด้วย 2 ไอโซเมอร์ คือ *cis*-permethrin และ *trans*-permethrin (รูปที่ 1.8) ซึ่ง *cis*-permethrin จะมีความเป็นพิษมากกว่า *trans*-permethrin เพราะเกิดเมแทบอลิซึมในการกำจัดพิษออกจากร่างกายได้ช้ากว่า *trans*-permethrin (Katawa *et al.*, 2007)



รูปที่ 1.8 สูตรโครงสร้างทางเคมีของ *trans*-permethrin และ *cis*-permethrin (Garcia *et al.*, 2001)

1.2.3.1 คุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของ permethrin (Laskowski, 2002; Holmstead *et al.*, 1978)

ชื่อทางเคมี	3-phenoxybenzyl(1RS,3RS; 1RS, 3SR)-3-(2,2-dichlorovinyl)-2,2 dimethylcyclopropanecarboxylate
ชื่อทางการค้า	แอมบุซ, ดูแพ็กซ์
LD ₅₀ (หนู rat เพศผู้)	460 mg/kg (ทางปาก)
สูตรโมเลกุล	C ₂₁ H ₂₀ Cl ₂ O ₃
มวลโมเลกุล	391.3
ความหนาแน่น	1.19 ถึง 1.27 ที่อุณหภูมิ 20 °C
จุดหลอมเหลว	34-35 °C
จุดเดือด	198-200 °C ที่ 0.3 mmHg
จุดวาบไฟ	>100 °C
ความดันไอ	0.045 mPa ที่อุณหภูมิ 25 °C
การละลาย	ละลายในน้ำได้น้อยแต่ละลายได้ดีในไขมัน (non polar)

ความเสถียร	มีความเสถียรในสภาวะที่เป็นกรดมากกว่าในสภาวะที่เป็นด่าง
การระเหย	ระเหยเป็นไอได้น้อย
การสลายตัว	มีการสลายตัวได้อย่างรวดเร็วภายใต้อิทธิพลของแสง

1.2.3.2 พิษจลนศาสตร์

การดูดซึม

ในปี 1991 Anadon และคณะ ได้ศึกษาพิษจลนศาสตร์ของ permethrin ในหนูขาวเพศผู้ หลังจากได้รับสาร permethrin ในขนาด 460 mg/kg โดยการกินแบบครั้งเดียว พบว่า permethrin มีการดูดซึมอย่างช้าๆ โดยมีค่า T_{max} (เวลาที่ความเข้มข้นของ permethrin ในเลือด มีค่าสูงสุด) เท่ากับ 3.52 ชั่วโมง และ C_{max} (ความเข้มข้นสูงสุดของ permethrin ในเลือด) มีค่าเท่ากับ 49.46 $\mu\text{g/mL}$ ค่า bioavailability ของ permethrin (สัดส่วนปริมาณที่เข้าสู่ระบบไหลเวียนเลือด) มีค่าเท่ากับ 60.69 %

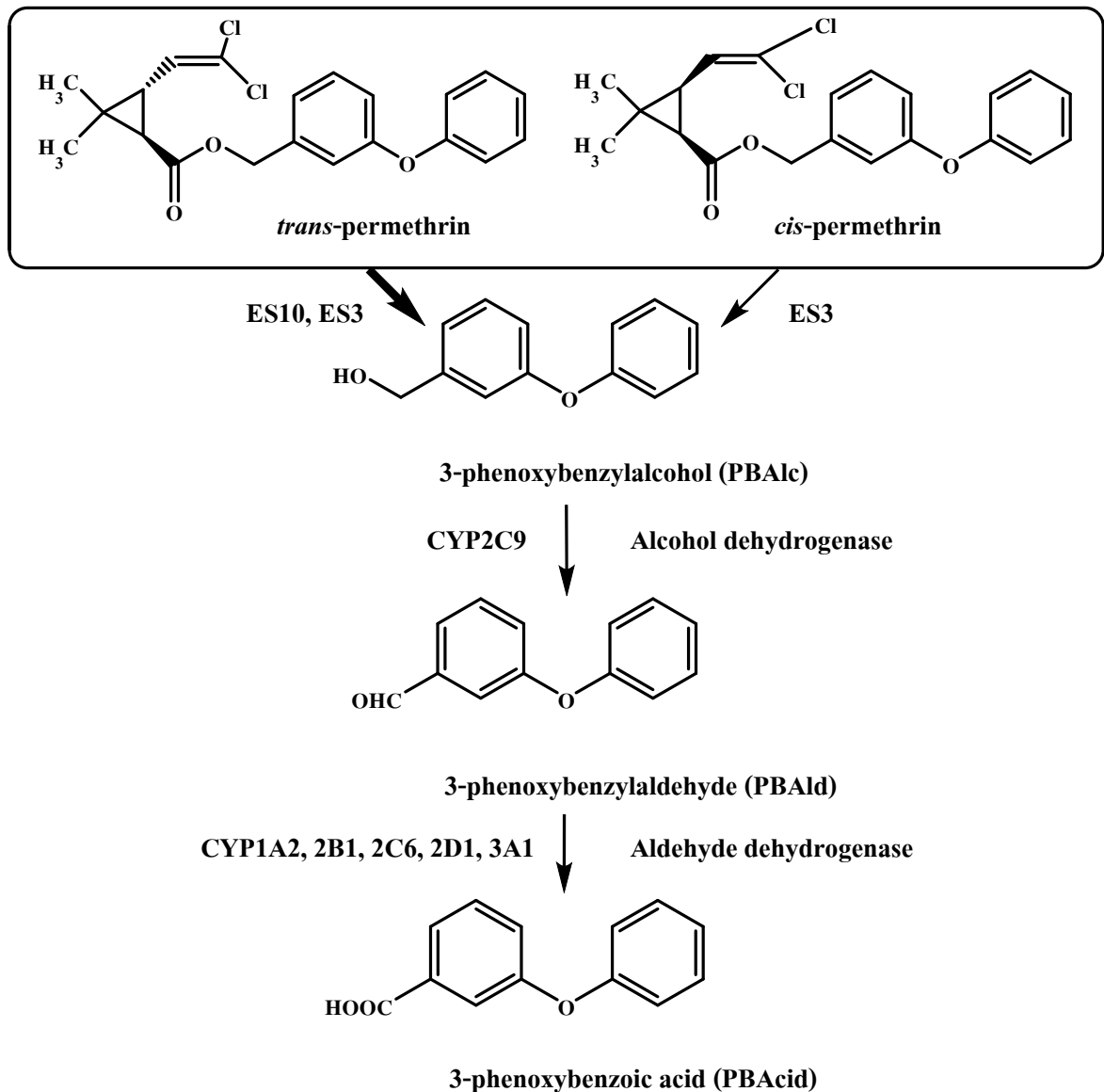
การแพร่กระจาย

จากการศึกษาในหนูขาวที่ได้รับ permethrin ทางปาก พบว่า permethrin มีการแพร่กระจายอย่างรวดเร็วในเนื้อเยื่อประสาท ซึ่ง half-life การแพร่กระจายมีค่าเท่ากับ 4.85 ชั่วโมง หลังจากได้รับ permethrin ขนาด 460 mg/kg โดยการกิน และ 46 mg/kg ฉีดเข้าทางหลอดเลือดดำ พบว่าระดับของ permethrin ใน cerebellum, hippocampus, caudate putamen, frontal cortex, hypothalamus และ sciatic nerve มีค่าสูงสุดที่เวลา 1.5, 2, 2, 2.7, 4.8 และ 7.5 ชั่วโมงตามลำดับ ซึ่งมีค่าสูงกว่าในพลาสมา การสะสมของ permethrin ในเนื้อเยื่อประสาทแสดงให้เห็นโดย curve ratios ของความเข้มข้นของ permethrin ในเนื้อเยื่อเมื่อเปรียบเทียบกับในพลาสมา มีค่าเท่ากับ 1.16, 3.71, 1.57, 4.27, 3.48 และ 8.77 $\mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ (Anadon *et al.*, 1991)

เมแทบอลิซึม

Nakamura และคณะ (2007) ได้ศึกษาเมแทบอลิซึมของ permethrin และสารเมแทบอลิท์ที่ได้จากการ เกิดปฏิกิริยา hydrolysis ของ permethrin ในหลอดทดลองในหนูขาว พบว่าทั้ง *cis* - และ *trans*-permethrin เกิดเมแทบอลิซึมโดยการเกิดปฏิกิริยา hydrolysis ในไมโครโซมตับของหนูขาวเป็นหลัก (Miyamoto, 1976) นอกจากนี้ยังเกิดปฏิกิริยา hydrolysis ในไมโครโซมที่อยู่ในลำไส้เล็กได้ด้วย ซึ่ง *trans*-permethrin จะเกิดปฏิกิริยา hydrolysis ได้มากกว่า *cis*-permethrin โดยที่ *trans*-permethrin เกิดปฏิกิริยา hydrolysis โดยเอนไซม์ carboxylesterase (CES) (Ross *et al.*, 2006; Ueyama *et al.*, 2010) ไอโซฟอร์ม ES-3 และ

ES-10 และ *cis*-permethrin เกิดปฏิกิริยา hydrolysis โดยเอนไซม์ carboxylesterase ไอโซฟอร์ม ES-3 เพียงอย่างเดียว ซึ่งไอโซฟอร์มทั้ง 2 จัดอยู่ใน family CES 1 ได้เมแทบอลิท์เป็นสาร 3-phenoxybenzyl alcohol (PBAIc) ซึ่งจะถูกรอกออกซิไดส์ต่อไปเป็น 3-phenoxybenzyl aldehyde (PBAId) โดยอาศัย CYP2C9 และสุดท้ายจะถูกรอกออกซิไดส์ต่อไปเป็น 3-phenoxybenzoic acid (PBAcid) โดยอาศัย CYP1A2, 2B1, 2C6, 2D1 และ 3A1 ตามลำดับ ปฏิกิริยาออกซิเดชันที่เกิดผ่าน CYP1A2, 2B1, 2C6, 2D1 และ 3A1 นี้ต้องอาศัย NADPH อย่างไรก็ตามปฏิกิริยาออกซิเดชันในการทำให้เกิดเป็นเมแทบอลิท์ PBAId และ PBAcid อาจเกิดโดยอาศัยเอนไซม์ alcohol dehydrogenase และ aldehyde dehydrogenase ได้ด้วย (ดังรูปที่ 1.9)



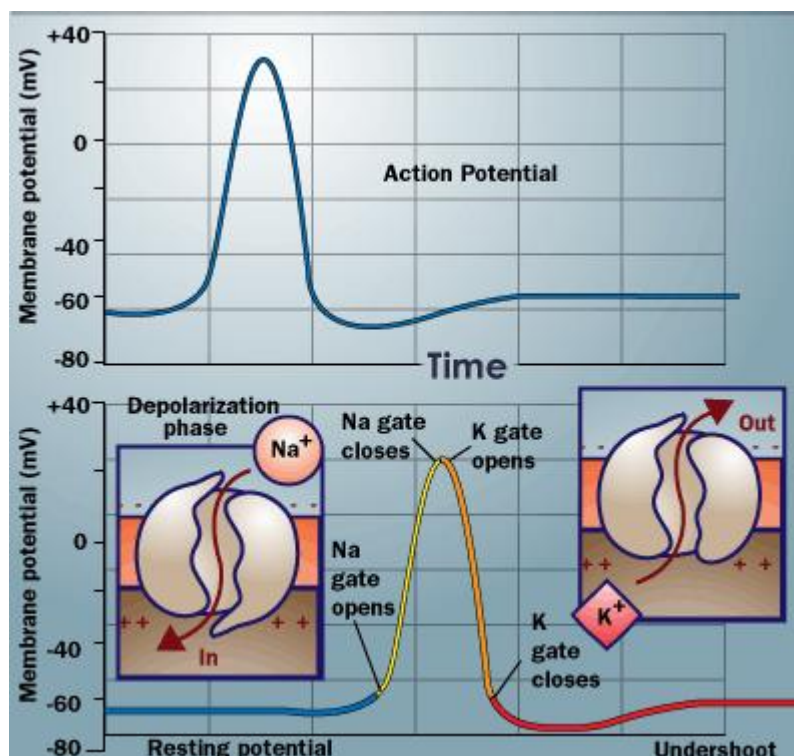
รูปที่ 1.9 แสดงวิถีเมแทบอลิซึมของ *cis*- and *trans*-permethrins ในตับหนูขาว

การขับออกจากร่างกาย

ในหนูขาวเพศผู้หลังจากได้รับ permethrin ขนาด 460 และ 46 mg/kg โดยการกิน และฉีดเข้าทางหลอดเลือดดำ ตามลำดับ พบว่า elimination half-life ของ permethrin ในพลาสมา มีค่าเท่ากับ 8.67 ชั่วโมงหลังจากได้รับ permethrin ทางหลอดเลือดดำและ 12.37 ชั่วโมง หลังจากได้รับ permethrin โดยการกิน ค่าการชำระยา (clearance) ของ permethrin ซึ่งไม่ขึ้นกับขนาดหรือวิธีบริหารมีค่าเท่ากับ 0.058 ลิตรต่อชั่วโมง elimination half-life ของ permethrin สำหรับ hippocampus, medulla oblongata, frontal cortex, และ sciatic nerve มีค่าเท่ากับ 23.10, 22.36, 13.86 และ 16.27 ชั่วโมง ตามลำดับ (Anadon *et al.*, 1990)

1.2.3.3 กลไกการออกฤทธิ์

ปกติแล้วข้างในเซลล์และนอกเซลล์ประสาทมีความต่างศักย์ทางไฟฟ้า ความต่างศักย์ทางไฟฟ้าที่วัดได้เรียกว่า ความต่างศักย์เยื่อหุ้มเซลล์ (membrane potential) โดยข้างในเป็นลบ เมื่อเทียบกับข้างนอก การเปลี่ยนแปลงของเมมเบรนโพเทนเชียลจะเกิดขึ้นเมื่อมีการทำงานของเซลล์ ความต่างศักย์เยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์ปกติที่ไม่ถูกกระตุ้น เรียกว่า เรสติงเมมเบรนโพเทนเชียล (resting membrane potential; RMP) ในเซลล์ประสาทและกล้ามเนื้อลายจะมีค่าประมาณ -55 ถึง -100 มิลลิโวลท์ ส่วนเมมเบรนโพเทนเชียลขณะที่มีคลื่นประสาทวิ่งผ่านเรียกว่า คลื่นประสาทหรือแอกชั่นโพเทนเชียล (action potential) ซึ่งกลไกการเกิดของแอกชั่นโพเทนเชียล (ดังรูปที่ 1.10) เกิดขึ้นโดยเมื่อกระตุ้นใยประสาท (nerve fiber) แรงพอถึงจุดหนึ่งที่เรียกว่า เทรชโฮลด์ (threshold) จะทำให้ช่องโซเดียม (Na^+ channel) ที่เยื่อหุ้มเซลล์เปิดออกทำให้ Na^+ เข้าสู่เซลล์ทำให้เกิด depolarization (ระยะที่ 1) แล้วตามมาด้วยการเปิดของช่อง โปแตสเซียม (K^+ channel) ทำให้ K^+ ออกจากเซลล์ เกิด repolarization (ระยะที่ 2) การเปลี่ยนแปลงของความต่างศักย์เยื่อหุ้มเซลล์ (membrane potential) นี้เรียกว่าแอกชั่นโพเทนเชียล (action potential) ความแรงของการกระตุ้นที่น้อยที่สุดทำให้เกิดแอกชั่นโพเทนเชียลนี้เรียกว่า เทรชโฮลด์ ถ้าเราเพิ่มความแรงของการกระตุ้นเหนือเทรชโฮลด์ (supra threshold) ก็ยังคงได้แอกชั่นโพเทนเชียลที่มีขนาดเท่าเดิม แต่ถ้าลดความแรงของการกระตุ้นต่ำกว่าความแรงเทรชโฮลด์จะไม่มีแอกชั่นโพเทนเชียลเกิดขึ้น ทั้งนี้เพราะใยประสาทมีคุณสมบัติที่เรียกว่า all-or-none ซึ่งหมายความว่าถ้าใช้ความแรงน้อยกว่าเทรชโฮลด์ จะไม่ทำให้เกิดแอกชั่นโพเทนเชียล แต่ถ้าใช้ความแรงสูงกว่าเทรชโฮลด์ก็จะได้แอกชั่นโพเทนเชียลที่มีขนาดเท่ากันกับตอนกระตุ้นด้วยความแรงเท่าเทรชโฮลด์ ภายในเซลล์เป็นลบน้อยลงจนถึงเป็นบวก (ระยะที่ 1) และในระยะที่ 2 ภายในเซลล์กลับเป็นลบเหมือนเดิม ในขณะที่เกิดแอกชั่นโพเทนเชียลจะมีการผ่านของ Na^+ และ K^+ คลื่นประสาทที่เกิดขึ้นที่จุดหนึ่งจะชักนำให้จุดถัดไปเกิดคลื่นใหม่ต่อเนื่องกันแบบลูกโซ่ จึงคล้ายกับว่าคลื่นประสาทวิ่งไปตามแอกซอน



รูปที่ 1.10 แสดงกลไกการเกิดของแอกชันโพเทนเชียลในสภาวะปกติ

Permethrin มีผลต่อระบบประสาทส่วนกลางและระบบประสาทส่วนปลายในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมและในแมลง โดยการทำให้การเปิดของช่องโซเดียมนานขึ้นกว่าปกติ ทำให้เกิด negative after depolarization และยับยั้งการทำงานของ GABA receptor โดยการยับยั้งช่องคลอไรด์ รวมถึงขัดขวางการทำงานของ adenosine triphosphatase (ATPase) ซึ่งเป็นเอนไซม์สำคัญที่ใช้ในการแลกเปลี่ยน Na⁺ และ K⁺ ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้การเกิด action potential ของเส้นประสาทลดลง เส้นประสาทก็จะถูกกระตุ้นอยู่ตลอดเวลา ผลที่เกิดกับร่างกายขึ้นกับขนาดที่ได้รับในกรณีที่กลืนหรือกินเข้าไปทำให้ปวดศีรษะ คลื่นไส้ วิงเวียน อาเจียน ท้องร่วง มีน้ำลายมาก เป็นลม กล้ามเนื้อบิดตัว และอาจมีอาการทางประสาท ตื่นเต้น กรณีรุนแรงอาจชักและหมดสติ (Caroline, 1998)

1.2.3.4 อาการแสดงความเป็นพิษของ permethrin

1) ผลต่อระบบประสาท (effect on nervous system)

Permethrin มีผลต่อระบบประสาทส่วนกลางและระบบประสาทส่วนปลายในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมและในแมลง โดยการทำให้การเปิดของช่องโซเดียมนานขึ้นกว่าปกติ ทำให้เกิด negative after depolarization และยับยั้งการทำงานของ GABA receptor โดยการยับยั้งช่อง

คลอไรด์ รวมถึงขัดขวางการทำงานของ adenosine triphosphatase (ATPase) ซึ่งเป็นเอนไซม์สำคัญที่ใช้ในการแลกเปลี่ยน Na^+ และ K^+ ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้การเกิด action potential ของเส้นประสาทลดลง เส้นประสาทก็จะถูกกระตุ้นอยู่ตลอดเวลา ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมถ้าได้รับในปริมาณที่สูง (high doses) ทำให้เกิดอาการความเป็นพิษต่อประสาทได้แก่อาการ tremors, incoordination, hyperactivity, paralysis และทำให้มีการเพิ่มของอุณหภูมิภายในร่างกาย ผลต่อพฤติกรรมที่สังเกตในหนูขาวพบว่ามีอาการกล้ามเนื้อกระตุก สะดุ้ง สั่นทั้งตัว และหมอบราบ และพฤติกรรมที่สังเกตในแมลงสาบจะมีอาการ กระสับกระส่าย การหมอบราบ และอัมพาต (Caroline, 1998; Ray and Forshaw, 2000)

2) การทำให้เกิดการระคายเคือง (irritation)

Permethrin มีผลทำให้เกิดการระคายเคืองต่อตาคือทำให้มีอาการสายตารั่ว (Caroline, 1998) และถ้าสัมผัสบริเวณผิวหนังทำให้เกิดอาการผิวหนังอักเสบคือ ผิวหนังแดงผิปกติ บวม มีเม็ดพุพองอย่างรุนแรง (Soderlund *et al.*, 2002)

3) ผลต่อระบบภูมิคุ้มกัน (effect on the immune system)

ในการทดลองในสัตว์เกี่ยวกับระบบภูมิคุ้มกัน เมื่อสัตว์ทดลองได้รับ permethrin เข้าไปโดยการกินทางปากทำให้ T-lymphocytes มีความสามารถในการจดจำและตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอมลดน้อยลง ปริมาณ (Dose) ของ permethrin ที่เท่ากับ LD_{50} จนถึงปริมาณ $1/100$ ของ LD_{50} ทำให้สามารถยับยั้ง T-lymphocytes ได้มากกว่า 40% และการกิน permethrin ยังทำให้ลดการทำงานของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันแบบ second type มาเซลล์ชนิด natural killer cell ประมาณ 40% อีกด้วย (Blaylock *et al.*, 1995)

4) ผลต่อระบบสืบพันธุ์ (effect on reproductive system)

Permethrin มีผลต่อระบบสืบพันธุ์ทั้งในเพศชายและเพศหญิง โดยจับกับ receptor ของ androgen ซึ่งเป็นฮอร์โมนเพศชาย เซลล์ผิวหนังในคนที่เป็นเพศชาย (Eil and Nisula, 1990) และ permethrin ก็ยังจับกับ receptor อีกหลายชนิดด้วยกัน เช่น peripheral benzodiazepine receptor กระตุ้นการผลิตฮอร์โมนเพศชายคือ testosterone (Ramadon *et al.*, 1988) ส่วนในเพศหญิงการได้รับ permethrin เป็นสาเหตุทำให้เกิดอันตรายต่อตัวอ่อนในกระต่ายและในหนูขาวที่ตั้งครรภ์ (Caroline, 1998)

5) การทำให้เกิดมะเร็ง (carcinogenicity)

จากรายงานขององค์การอนามัยโลก (World Health Organization; WHO) พบว่า permethrin ทำให้มีการเพิ่มอัตราการเกิดเนื้องอกในปอดของหนู mice เพศเมียและเพิ่มอัตราการเกิดเนื้องอกในตับของหนู mice ทั้งเพศผู้และเพศเมีย (Caroline, 1998) การเกิดมะเร็งจาก permethrin เกิดจากกลไกของ epigenetic โดยการที่ 1) permethrin จะลดการทำงานของเอนไซม์รวมทั้งทำลายกรดอะมิโน tryptophan นำไปสู่กระบวนการเจริญเติบโตในการเกิดมะเร็ง (Touky *et al.*, 1989) 2) permethrin ยับยั้งการสื่อสารระหว่างเซลล์โดยการยับยั้งการทำงานของ gap junction (Tateno *et al.*, 1993)

1.2.3.5 การรักษาอาการพิษ

ไม่มี specific antidote โดยทั่วไปแล้วอาการพิษที่พบบ่อยไม่รุนแรง การรักษาเป็นการรักษาตามอาการดังนี้

1. ให้ยา diazepam หรือ barbiturates เพื่อระงับอาการชัก
2. ล้างท้อง และให้ผงถ่านกัมมันต์ (activated charcoal) เพื่อลดการดูดซึมของสารที่อาจมีหลงเหลืออยู่ในทางเดินอาหาร
3. ถ้ามีอาการเนื่องจากการแพ้ให้ใช้ antihistamines และ corticosteroids

1.2.4 เทคนิคที่ใช้ในการวิเคราะห์

1.2.4.1 การวิเคราะห์สาร permethrin และเมแทบอลไลท์ 3-phenoxybenzyl alcohol (PBAIc) และ 3-phenoxybenzoic acid (PBAcid) ร่วมกับสารอื่นๆ โดยเทคนิค High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

Anadon และคณะ (1991) ได้มีการศึกษาเภสัชจลนศาสตร์ของ permethrin ในหนูขาว โดยการป้อนทางปากแบบครั้งเดียวในปริมาณ 460 mg/kg และฉีดทางเส้นเลือดดำในปริมาณ 46 mg/kg ทำการศึกษาในหนูขาวเพศผู้สายพันธุ์ sprague-Dawley เก็บตัวอย่างเลือดอย่างต่อเนื่องหลังจากให้สารทางปากและทางเส้นเลือดดำ เก็บตัวอย่างตับและสมองในส่วน medulla oblongata และเส้นประสาท sciatic nerve หลังจากให้สารทางปาก การเตรียมตัวอย่างใช้วิธี Liquid-Liquid extraction โดยใช้ตัวทำละลาย n-pentane ระบบการแยกเป็นแบบ reversed-phase ประกอบด้วย คอลัมน์ C₁₈ ใช้ acetic acid 5 mL, chloroform 25 mL และ distilled deionized water (42%) in methanol (pH 2.4) เป็นสารละลายเคลื่อนที่ในการแยกสาร และมีอัตราการไหลเท่ากับ 1.1 ml/min ทำการตรวจวัดด้วยเครื่อง UV detector ที่ความยาวคลื่น 254 nm จากการตรวจวิเคราะห์พบว่าค่า limits of detection ของสาร permethrin และเมแทบอลไลท์ในตัวอย่างพลาสมามีค่าเท่ากับ 0.1 µg/mL ส่วนในตัวอย่างเนื้อเยื่อมีค่า limits of detection ของสาร permethrin และเมแทบอลไลท์ เท่ากับ 0.2 µg/mL ค่า %recovery สาร permethrin และเมแทบอลไลท์ ในตัวอย่างพลาสมาและในตัวอย่างเนื้อเยื่ออื่นๆ ยกเว้นในตับมีค่ามากกว่า 94% ส่วน ค่า %recovery สาร permethrin และเมแทบอลไลท์ในตับมีค่ามากกว่า 80% ผลจากการศึกษาเภสัชจลนศาสตร์พบว่า profile ของ permethrin ในพลาสมาสามารถอธิบายโดยใช้ two-compartment model มีค่าครึ่งชีวิตของการกำจัด (elimination half-life) เท่ากับ 8.67 ชม. และ mean residence time เท่ากับ 11.19 ชม. หลังจากให้สารทางเส้นเลือดดำ และมีค่า elimination half-life เท่ากับ 12.37 ชม. และ mean residence time เท่ากับ 17.77 ชม. หลังจากให้สารทางปาก มีค่าชำระล้างของสารทั้งหมดในพลาสมา (total plasma clearance) เท่ากับ 0.058 ลิตร/ชม. หลังจากให้สารทางปากแบบครั้งเดียว permethrin มีการดูดซึมอย่างช้าๆ โดยมีค่าเวลาที่สารมีระดับสูงสุดในเลือด (T_{max}) เท่ากับ 3.52 ชม. และค่าความเข้มข้นสูงสุด (C_{max}) เท่ากับ 49.46 µg/mL และมีค่า bioavailability เท่ากับ 60.69% หลังจากให้สารทางปาก ข้อมูล concentration-time ของเมแทบอลไลท์ในพลาสมาและข้อมูล concentration-time ของ permethrin และเมแทบอลไลท์ในเนื้อเยื่อหลังจากให้สาร permethrin ทางปากพบว่า เป็นแบบ one-compartment model มีค่า elimination half-life ของ permethrin ในเนื้อเยื่อต่างๆ ได้แก่ hippocampus, medulla oblongata, frontal cortex และ sciatic nerve (23.10, 22.36, 13.86, และ 16.27 ชม. ตามลำดับ) มากกว่าในพลาสมา (12.37 ชม.) ปริมาณของ permethrin มีมากที่สุดที่ cerebellum, hippocampus, caudate putamen, frontal cortex,

hypothalamus และ sciatic nerve ที่เวลา 1.5, 2, 2, 2.7, 4.8 และ 7.5 ชม. ตามลำดับ ซึ่งมีค่าสูงกว่าในพลาสมา การสะสมของ pyrethroids มีการสะสมเฉพาะในเนื้อเยื่อประสาท

Abu-Qare และ Abu-Donia (2000) ได้พัฒนาวิธีการตรวจวัดในครั้งเดียวกันของ pyridostigmine bromide, N,N-diethyl-m-toluamide, permethrin และเมแทบอลิท์ของสารเหล่านี้ได้แก่ N-methyl-3-hydroxypyridinium bromide, m-toluamide และ m-toluic acid, m-phenoxybenzyl alcohol และ m-phenoxybenzoic acid ตามลำดับ ในพลาสมาและปัสสาวะของหนูขาวโดยใช้เทคนิค High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ทำการเตรียมตัวอย่างโดยการปรับ pH 5 ของตัวอย่างด้วย 1N acetic acid จากนั้นทำการสกัดโดยใช้เทคนิค solid phase extraction (SPE) โดยใช้ Sep-Pak[®] C₁₈ เริ่มจากการ precondition cartridge ด้วย acetonitrile 3 mL ตามด้วยการ equilibrate ด้วย water 3 mL หลังจากนั้น load ตัวอย่างใส่ลงใน cartridge ทำการล้างด้วย water 2 mL แล้วชะด้วย methanol 1 mL (2 ครั้ง) ตามด้วย acetonitrile 1 mL (2 ครั้ง) ส่วนในระบบการแยกของ HPLC เป็นแบบ reversed-phase ประกอบด้วย คอลัมน์ C₁₈ ใช้ 99% acetonitrile in water (pH 3.20) เป็นสารละลายเคลื่อนที่ในการแยกสาร และมีอัตราการไหลของสารในช่วงระหว่าง 0.5 และ 1.7 mL/min เป็นเวลา 17 นาที ทำการตรวจวัดด้วยเครื่อง UV detector ที่ความยาวคลื่น 208 และ 230 nm จากการตรวจวิเคราะห์พบว่าค่า retention time ของสารอยู่ในช่วง 5.7-14.5 นาที ค่า limits of detection ของสารอยู่ในช่วงระหว่าง 20 และ 100 ng/mL ค่า limits of quantitation อยู่ในช่วง 150-200 ng/mL ค่าเฉลี่ย %recovery ในตัวอย่างพลาสมา มีค่าอยู่ระหว่าง 51.4 ± 10.6 ถึง 82.6 ± 8.1 และในปัสสาวะ มีค่าอยู่ระหว่าง 55.9 ± 9.8 ถึง 77.9 ± 9.1 Calibration curve ที่ได้เป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 100-5000 ng/mL

ต่อมาในปี 2001 คณะผู้วิจัยได้ศึกษาการตรวจวัดในครั้งเดียวกันของ malathion, permethrin, DEET (N,N-diethyl-m-toluamide) และเมแทบอลิท์ของสารเหล่านี้ได้แก่ malaoxon (O,O-dimethyl-S-(1,2-carbethoxyethyl)phosphorothioate), m-phenoxybenzyl alcohol และ m-phenoxybenzoic acid, m-toluamide และ m-toluic acid ตามลำดับ ในพลาสมาและปัสสาวะของหนูขาวโดยใช้เทคนิค High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ทำการเตรียมตัวอย่างโดยการปรับ pH (3.5) ของตัวอย่างด้วย 1N acetic acid จากนั้นทำการสกัดโดยใช้เทคนิค solid phase extraction (SPE) โดยใช้ Sep-Pak[®] C₁₈ เริ่มจากการ precondition cartridge ด้วย acetonitrile 3 mL ตามด้วยการ equilibrate ด้วย water 3 mL หลังจากนั้น load ตัวอย่างใส่ลงใน cartridge ทำการล้างด้วย water 3 mL แล้วชะด้วย acetonitrile 3 mL (2 ครั้ง) ตามด้วย methanol 3 mL ส่วนในระบบการแยกของ HPLC เป็นแบบ reversed-phase เลือกใช้คอลัมน์ C₁₈ ใช้ 45-99% acetonitrile in water (pH 3.5) เป็นสารละลายเคลื่อนที่ในการแยกสาร และมีอัตราการไหลของสารในช่วงระหว่าง 0.5 และ 2 mL/min เป็นเวลา 15 นาที ทำการตรวจวัดด้วยเครื่อง UV detector ที่ความยาวคลื่น 210 nm

จากการตรวจวิเคราะห์พบว่าค่า retention time ของสารอยู่ในช่วง 7.4-12.3 นาที ค่า limits of detection ของสารอยู่ในช่วงระหว่าง 20 และ 100 ng/mL ค่า limits of quantitation อยู่ในช่วง 50-150 ng/mL ค่าเฉลี่ย %recovery จากการ spike ตัวอย่าง 5 ซ้ำ ในตัวอย่างพลาสติก มีค่าอยู่ระหว่าง 75.2 ± 4.6 ถึง 84.5 ± 4.0 และในปลั๊สวาระ มีค่าอยู่ระหว่าง 78.8 ± 3.9 ถึง 84.5 ± 3.8 Calibration curve ที่ได้เป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 100-1000 ng/mL

Garcia และคณะ (2001) ศึกษาความถูกต้องของวิธี (validate) ตามวิธีของ ICH guideline recommendation สำหรับหาปริมาณ permethrin ในเกสรชัณฆ์โดยใช้เทคนิค High Performance Liquid Chromatography (HPLC) การเตรียมตัวอย่างใช้วิธี Liquid-Liquid extraction โดยใช้ตัวทำละลาย n-pentane มีระบบการแยกที่ประกอบด้วย คอลัมน์ C_{18} ที่ให้ความร้อน $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ ใช้ methanol และ water ผสมกันในอัตราส่วน 78:22 v/v เป็นสารละลายเคลื่อนที่ในการแยกสาร และมีอัตราการไหลของสารเท่ากับ 1 mL/min ทำการตรวจวัดด้วยเครื่อง UV detector ที่ความยาวคลื่น 272 nm จากการตรวจวิเคราะห์พบว่ามีค่า correlation coefficient มากกว่า 0.9999 สำหรับ relative standard deviations (RSD) อยู่ในช่วง 0.51-1.95% และมีค่าเฉลี่ย recovery ในช่วง 98.44-100.21%

Wang และคณะ (2003) ได้ศึกษาการใช้เทคนิค reversed phase liquid chromatography สำหรับตรวจวิเคราะห์ในครั้งเดียวกันของสาร (S)-methoprene, MGK264, piperonyl butoxide, sumithrin และ permethrin ในสูตรของยาฆ่าแมลง โดยการวิเคราะห์ด้วย Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography (RP-HPLC) มีระบบการแยกที่ประกอบด้วย คอลัมน์ C_8 ที่ให้ความร้อน $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ ใช้ water, methanol และ acetonitrile ผสมกันในอัตราส่วน 35:10:55 โดยปริมาตร เป็นสารละลายเคลื่อนที่ในการแยกสาร และมีอัตราการไหลของสารเท่ากับ 1 mL/min ทำการตรวจวัดด้วยเครื่อง diode-array detector ที่ความยาวคลื่น 240 nm การวิเคราะห์ด้วย liquid chromatography electrospray ionization source mass spectroscopy (LC-ESI-MS) มีระบบการแยกที่ประกอบด้วย คอลัมน์ C_8 ที่ให้ความร้อน $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ ใช้ water, methanol และ acetonitrile ผสมกันในอัตราส่วน 35:10:55 โดยปริมาตร เป็นสารละลายเคลื่อนที่ในการแยกสาร และมีอัตราการไหลของสารเท่ากับ 0.8 mL/min ทำการตรวจวัดด้วยเครื่อง quadrupole MS detector ประกอบด้วย standard positive และ negative ionization modes, และ electrospray ionization source (ESI) ซึ่ง ESI source condition ใช้ PI mode ประกอบด้วย vaporizer temperature $350\text{ }^{\circ}\text{C}$, nebulizer (nitrogen) pressure 60 p.s.i., drying gas (nitrogen) flow-rate 10 mL/min, drying gas temperature $350\text{ }^{\circ}\text{C}$, capillary voltage 4000 V และ fragmentor voltage 40 V ที่ความยาวคลื่น 240 nm สำหรับการทำ Calibration curve มีค่า correlation coefficient (R^2) เท่ากับ 1-0.9993 มีค่าเฉลี่ย % recovery ในช่วง 94.6-103.3% มีค่า % relative standard deviations (RSD) ในช่วง 0.8-1.9 %

1.2.4.2 การวิเคราะห์สาร permethrin และเมแทบอลไลท์ 3-phenoxybenzyl alcohol (PBAIc) และ 3-phenoxybenzoic acid (PBAcid) ร่วมกับสารอื่นๆโดยเทคนิค gas chromatography

ในปี 1991 Junting และ Chuichang ได้ศึกษาการใช้เทคนิคการสกัดแบบ Solid Phase Extraction (Sep-Pak[®] C₁₈) ซึ่งเป็นวิธีที่รวดเร็วในการแยกสารกำจัดแมลงกลุ่ม pyrethroids สังเคราะห์ (methrothrin, fenprothrin, cyhalothrin, permethrin, cypermethrin, fenvalerate และ deltamethrin) ในตัวอย่างปัสสาวะและพลาสมา การเตรียมตัวอย่างใช้ตัวอย่างปัสสาวะหรือพลาสมา 1 mL ผสมกับ 70% methanol 10 mL จากนั้นทำการ precondition Sep-Pak[®] C₁₈ cartridges ด้วย chloroform, methanol, methanol : deionized water (อัตราส่วน 1:1) และ deionized water อย่างละ 5 mL ตามลำดับ หลังจากนั้น load ตัวอย่างพลาสมาใส่ลงใน cartridge ทำการล้างด้วย deionized water 5 mL แล้วชะด้วย chloroform 5 mL และตรวจวัดโดยเทคนิค gas chromatography ซึ่งใช้ flame ionization detector (FID) เป็นตัวตรวจวัด จากการตรวจวิเคราะห์พบว่าในตัวอย่างปัสสาวะมีค่า %recovery อยู่ในช่วงระหว่าง 90% ถึง 102% และในตัวอย่างพลาสมามีค่า %recovery อยู่ในช่วงระหว่าง 81% ถึง 93% ค่า limits of detection ของสารเท่ากับ 2 ng/mL

Angerer และ Ritter (1997) ได้ศึกษาการใช้เทคนิค gas chromatography-mass spectrometry สำหรับตรวจวิเคราะห์สาร permethrin, cypermethrin, deltamethrin, λ -cyhalothrin, fenvalerate, phenothrin และ β -cyfluthrin และเมแทบอลไลท์ของสารเหล่านี้ได้แก่ *cis*-3-(2,2-dichlorovinyl)-2,2-dimethylcyclopropane-1-carboxylic acid (*cis*-Cl₂CA), *trans*-3-(2,2-dichlorovinyl)-2,2-dimethylcyclopropane-1-carboxylic acid (*trans*-Cl₂CA), *cis*-3-(2,2-bromovinyl)-2,2-dimethylcyclopropane-1-carboxylic acid (Br₂CA), fluoro-3-phenoxybenzoic acid (F-PBA) และ 3-phenoxybenzoic acid (3-PBA) ตามลำดับ ในปัสสาวะของคน การเตรียมตัวอย่างใช้วิธี Solid-phase extraction ระบบการแยกเป็นแบบ reversed-phase จากการตรวจวิเคราะห์พบว่าค่า limits of detection ของสารอยู่ในช่วงระหว่าง 0.3 และ 0.5 μ g/mL สำหรับปัสสาวะ ค่า relative standard deviation อยู่ระหว่าง 1% ถึง 6% ค่า %recovery อยู่ระหว่าง 90% ถึง 98%

Arrebola และคณะ (1999) ได้พัฒนาวิธีการตรวจวัดสาร permethrin, acrinathrin, cypermethrin, fenvalerate, deltamethrin, cyfluthrin และ cyhalothrin และเมแทบอลไลท์ของสารเหล่านี้ได้แก่ *cis*- และ *trans*- 3-(2,2-dichlorovinyl)-2,2-dimethylcyclopropane-1-carboxylic acid (Cl₂CA), *cis*-3-(2,2-bromovinyl)-2,2-dimethylcyclopropane-1-carboxylic acid (*cis*-Br₂CA *cis*-, *trans*), 2-(4-chlorophenyl)-3-methylbutyric acid (2-CIBA) และ 3-phenoxybenzoic acid (3-PBA) ในปัสสาวะของคน การเตรียมตัวอย่างใช้วิธี solid-phase

extraction และเพิ่มวิธี liquid-liquid extraction และมีการทำ derivitized และตรวจวัดโดย gas chromatography-tandem mass spectrometry ใช้ 3-(2-methoxyphenoxy) benzoic acid เป็น internal standard จากการตรวจวิเคราะห์พบว่าค่า %recovery มีค่าอยู่ระหว่าง 87.4% ถึง 113.3% ค่า relative standard deviation (RSD) ต่ำกว่า 14.6%

Ramesh และ Ravi (2004) ได้พัฒนาความไวและความรวดเร็วของวิธี electron ionization gas chromatography-mass spectrometry ใน selective ion monitoring mode สำหรับการตรวจวัดสาร pyrethroids สังเคราะห์ทั้ง 13 ชนิด ได้แก่ allethrin, bifenthrin, cypermethrin, cyphothrin, cyfluthrin, lambda- cyhalothrin, deltamethrin, fenvalerate, fenprothrin, imiprothrin, permethrin, prallethrin และ transfluthrin ในตัวอย่างเลือดของคน การเตรียมตัวอย่างใช้เทคนิคการสกัดแบบ liquid-liquid extraction โดยใช้ตัวทำละลายผสมระหว่าง hexane กับ acetone ในอัตราส่วน 80:20 จากการตรวจวิเคราะห์พบว่าค่า %recovery มีค่าอยู่ระหว่าง 91% ถึง 103% ค่า limits of quantitation อยู่ในช่วง 1-1000 ng/mL

Leng และ Gries (2005) ได้พัฒนาความไวของวิธี gas chromatography-high resolution mass spectrometry สำหรับการตรวจวัดในครั้งเดียวกันของสาร *trans*-chrysanthemumdicarboxylic acid, *cis*- and *trans*-3-(2,2-dichlorovinyl)-2,2-dimethylcyclopropanecarboxylic acid, *cis*-3-(2,2-dibromovinyl)-2,2-dimethylcyclopropane carboxylic acid, 3-phenoxybenzoic acid and 4-fluoro-3-phenoxybenzoic acid ในปัสสาวะของคนซึ่งสารเหล่านี้เป็นเมแทบอลิท์ที่เป็นตัวชี้วัดทางชีวภาพสำหรับการได้รับสาร pyrethrum, allethrin, resmethrin, phenothrin, tetramethrin, cyfluthrin, cypermethrin, deltamethrin หรือ permethrin ด้วยเหตุนี้วิธีนี้สามารถช่วยประเมินในครั้งแรกของการได้รับสารฆ่าแมลงกลุ่มไพรีทรอยด์ และ pyrethrin การเตรียมตัวอย่างหลังจากเกิดปฏิกิริยา hydrolysis ของกรด แล้วทำการสกัดด้วย tert-butyl-methyl-ether นำส่วนที่เหลือทำ derivitized ด้วย 1,1,1,3,3,3-hexafluoroisopropanol และวิเคราะห์โดย gas chromatography-high resolution mass spectrometry ใน electron impact mode จากการตรวจวิเคราะห์พบว่าค่า limits of detection ของสารน้อยกว่า 0.1 µg/mL ซึ่งดีเท่ากับ negative chemical ionization mode มีค่า limits of detection ของสารน้อยกว่า 0.05 µg/mL สำหรับปัสสาวะ

Ogata-Kawata และคณะ (2007) ได้ศึกษาวิธีการตรวจวัด permethrin โดยตรงในเลือดซึ่งให้ค่าการคืนกลับและความไวในการตรวจวัดสูงเป็นการพัฒนาที่ใช้ร่วมกับการเตรียมตัวอย่างแบบ solid-phase extraction (SPE) และวิเคราะห์ด้วยเทคนิค gas chromatography-mass spectrometry (GC/MS) สำหรับการเตรียมตัวอย่างเป็นการนำตัวอย่างเลือดมาเจือจางด้วยน้ำ จากนั้นนำมา loaded ใน solid-phase Oasis HLB cartridge ที่ได้มีการปรับสถานะแล้วต่อจากนั้น permethrin จะถูกชะด้วย toluene นำสารสกัดผสมกับ internal standard แล้วนำมา

ระเหยภายใต้ไอ N₂ ก่อนที่จะวิเคราะห์ด้วย capillary GC/MS ใน electron ionization mode สารประกอบ *cis*- และ *trans*-permethrin เป็นการแยกและหาปริมาณใน selected ion monitoring mode ผลจากการวิเคราะห์พบว่าประสิทธิภาพของ %recovery ในการเตรียมตัวอย่างด้วย SPE ของ *cis*- และ *trans*-permethrin มีค่าเท่ากับ 97.7±7.9 และ 99.7±7.7% ตามลำดับ ค่า limits of detection และ limits of quantitation ของ *cis*- และ *trans*-permethrin ในเลือดมีค่าเท่ากับ 0.21 และ 0.67ng/mL, 0.20 และ 0.64 ng/mL ตามลำดับ ซึ่งการใช้วิธีนี้สามารถตรวจวัด permethrin ในเลือดของผู้ที่ใช้สารกำจัดแมลง

Huang และคณะ (2007) ได้พัฒนาวิธีการตรวจวัดในครั้งเดียวกันของสารกำจัดแมลง 102 ชนิด ในชา (tea) การเตรียมตัวอย่างใช้วิธี liquid-liquid extraction โดยใช้ตัวทำละลาย acetone-ethylacetate-n-hexane (1:2:1 v/v/v) ตามด้วยการ clean-up ซึ่งใช้เทคนิค gel permeation chromatography (GPC) และสกัดด้วยเทคนิค solid-phase extraction หลังจากนั้นนำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค gas chromatography-mass spectrometry คอลัมน์ที่ใช้ HP-5 MS fuse silica (30 m × 0.02 mm I.D., 0.25 µm film thickness) ใช้ Helium เป็นแก๊สพาโดยมีอัตราการไหล 0.6 mL/min อุณหภูมิของ injection เท่ากับ 220 °C อุณหภูมิของ oven เริ่มต้นที่ 50 °C (เป็นเวลา 1 ชม.) ถึง 250 °C อัตราการเพิ่ม 2 °C/min หลังจากนั้นอัตราการเพิ่มเป็น 8 °C/min จนถึงอุณหภูมิ 280 °C (เป็นเวลา 45 min) ผลจากการวิเคราะห์พบว่าการทำ calibration curve มีค่า correlation coefficient (R²) มากกว่า 0.999 ยกเว้นสาร 4-t-pentylphenol (R²>0.910) และ mefenacet (R²>0.905) มีค่า relative standard deviations (RSD) ในช่วง 3.0-30.8 % ค่าเฉลี่ย %recovery อยู่ในช่วง 60.7-136.7% และจากการตรวจวัดในตัวอย่างจริงซึ่งเป็นชาทั้งหมด 3042 ชนิด ซึ่งประกอบด้วย green tea จำนวน 1532 ตัวอย่าง black tea จำนวน 620 ตัวอย่าง และ oo-long tea จำนวน 727 ตัวอย่าง และ flower tea จำนวน 163 ตัวอย่าง พบสารกำจัดแมลงหลายชนิดในชา เช่น fenvalerate cypermethrin, fenpropathrin, buprofezin, triazophos มีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 0.050-0.250 (fenvalerate), 0.010-0.050 (cypermethrin), 0.030-0.300 (fenpropathrin), 0.060-0.250 (buprofezin) และ 0.020-0.200 (triazophos) mg/kg ตามลำดับ ค่า relative standard deviations (RSD) ของ fenvalerate, cypermethrin, fenpropathrin, buprofezin, triazophos อยู่ในช่วง 1.32-12.5%, 3.2-5.8%, 4.7-13.2%, 7.8-13.9% และ 5.4-24.7% ตามลำดับ

1.2.5 ปัจจัยที่มีผลต่อความเสถียรของ permethrin

Hengel และคณะ (1997) ได้พัฒนาวิธีสำหรับการตรวจวัดสารกลุ่ม pyrethroids ได้แก่ esfenvalerate, *cis*-permethrin และ *trans*-permethrin ในตัวอย่างน้ำ โดยใช้วิธีการสกัดแบบ solid-Phase Extraction และวิเคราะห์ด้วยเทคนิค gas chromatography มีการศึกษาความเสถียรในการเก็บรักษา โดยเวลาที่ใช้ในการเก็บรักษาตัวอย่างน้ำธรรมชาติที่มีการปนเปื้อนสาร esfenvalerate, *cis*-permethrin และ *trans*-permethrin คือ 2, 4 และ 8 วัน ในการศึกษาความเสถียรของสารในระหว่างการเก็บรักษาใช้ตัวทำละลาย ethyl acetate ล้างขวดที่ใช้เป็นภาชนะสำหรับเก็บสารโดยในขวดไม่มีการปนเปื้อนของสาร esfenvalerate, *cis*-permethrin และ *trans*-permethrin เพื่อไม่ให้เกิดการสูญหายที่เป็นผลมาจากการดูดซับของสารกำจัดแมลงที่เกิดมาจากภาชนะที่บรรจุ แม้ว่าประมาณ 60% ของสาร permethrin มีรายงานว่ามีการดูดซับต่อภาชนะที่เป็นแก้วภายในเวลา 48 ชม. (Sharom and Solomon, 1981a) ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่าลักษณะทางกายภาพในการดูดซับอาจจะเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิดการสูญหายของสารที่ลอยตัวอยู่ในตัวอย่างน้ำ การเสื่อมสลายของสารเคมีโดย oxidative free-radicals ตัวอย่างเช่น alkylperoxy และ hydroxyl radicals มีในตัวอย่างน้ำธรรมชาติ หรือการเสื่อมสลายที่เกิดจากเชื้อจุลินทรีย์ (Sharom and Solomon, 1981b) ดังนั้นจึงสมควรที่จะทำการวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำในธรรมชาติภายใน 24 ชม. ผลการวิเคราะห์พบว่า จากการเก็บตัวอย่างน้ำจากแหล่งน้ำ Putah Creek และ Sacramento River เวลาในการเก็บรักษาตัวอย่างคือ 0, 1, 2, 4 และ 8 ชม. พบว่าที่ 0 ชม. ค่า %recovery ของ esfenvalerate, *cis*-permethrin และ *trans*-permethrin อยู่ในช่วง 84-95% ที่เวลา 1 ชม. ค่า %recovery อยู่ในช่วง 84-95% ที่เวลา 2 ชม. ค่า %recovery อยู่ในช่วง 35-38% ที่เวลา 4 ชม. ค่า %recovery อยู่ในช่วง 44-48% และที่เวลา 8 ชม. ค่า %recovery อยู่ในช่วง 40-47%

Kocourek และคณะ (1998) ได้ศึกษาความเสถียรของสารกำจัดแมลงในสารสกัดที่ได้จากพืช เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษา และควบคุมการทดสอบในห้องปฏิบัติการก่อนการตรวจวัดด้วยเทคนิค gas chromatography การทดสอบอิทธิพลของการสกัดร่วมกันต่อความเสถียรของสารกำจัดแมลง ความแตกต่างของสิ่งปนเปื้อนในตัวอย่างที่แตกต่างกัน ได้แก่ เมล็ดข้าวสาลี ส้ม และกะหล่ำปลี ซึ่งเป็นสินค้าประเภทอาหารที่มีความสำคัญ สิ่งปนเปื้อนที่อยู่ในอาหารแต่ละชนิด ได้แก่ ไขมัน ความชื้น เม็ดสี และองค์ประกอบอื่นๆ ซึ่งมีอิทธิพลต่อความเสถียรของสารกำจัดแมลง ตัวอย่างแต่ละชนิดจะละลายอยู่ในตัวทำละลาย ethyl acetate และกำจัดน้ำออกด้วย anhydrous sodium sulfate ได้เป็นสารสกัดหยาบ หลังจากนั้นเติมสารละลายมาตรฐานของสารกำจัดแมลง แล้วเก็บรักษาเป็นเวลา 60 วัน ที่อุณหภูมิ 20 °C หรือ 40 °C จากผลการทดลองพบว่า ที่อุณหภูมิ 20 °C ในระยะเวลา 40 วัน ความเข้มข้นของสาร chlorothalonil และ iprodione ในสารสกัดในตัวอย่างกะหล่ำปลีลดลง ส่วนสารกำจัดแมลงกลุ่ม pyrethroid ในสารสกัดทั้งหมดที่ทำการทดสอบไม่มีการสลายตัว ความ

เสถียรของสารกำจัดแมลงในสารสกัดตัวอย่างเมล็ดข้าวสาลีสูงกว่าในสารสกัดอื่นๆ การสลายตัวของสารกำจัดแมลงบางส่วนในสารละลาย ethyl acetate สำหรับสารกลุ่ม organophosphate ได้แก่ mevinphos, methamidophos, dichlorvos, heptenophos, pirimiphos-methyl หลังจาก 60 วัน ที่อุณหภูมิ 40 °C

Afridi และคณะ (2001) ได้ศึกษาความเสถียรของสารกำจัดแมลงกลุ่ม organophosphate และ pyrethroids (chlorpyrifos-methyl, pirimiphos-methyl, permethrin) ในเมล็ดข้าวสาลี โดยได้เก็บรักษาเป็นระยะเวลา 52 สัปดาห์ ที่อุณหภูมิ 25, 30, 35 และ 40 °C ที่ความชื้น 10 และ 13 %m.c. จากผลการทดลองพบว่า สารตกค้าง chlorpyrifos-methyl และ pirimiphos-methyl มีการสลายตัวอย่างรวดเร็วที่อุณหภูมิ 40 °C ที่ความชื้น 13 %m.c. อัตราการสลายตัวในระยะเวลาการเก็บรักษาเริ่มต้นสูงกว่าระยะหลัง สาร organophosphate พบที่ระดับต่ำกว่าขีดจำกัดของการตรวจวัด (limit of detection) หลังจากเก็บสารเป็นเวลา 52 สัปดาห์ ที่อุณหภูมิ 35 และ 40 °C ความชื้น 10 และ 13 %m.c. ในทางตรงกันข้ามสารตกค้างของ permethrin มีความคงทนสูงในการเก็บรักษาเมล็ดข้าวสาลีในช่วงระยะเวลา 13 สัปดาห์แรก สาร permethrin มีความคงทน 68.4 และ 73.6% ที่อุณหภูมิ 25 °C ความชื้น 10 และ 13 %m.c. ดังนั้นจะเห็นได้ว่าสาร chlorpyrifos-methyl สลายตัวได้รวดเร็วมากที่สุด รองลงมาคือ pirimiphos-methyl ส่วนสาร permethrin มีความเสถียรมากที่สุด

Lee และคณะ (2002) ได้ศึกษาการคืนกลับ (recovery) ของสารกลุ่ม pyrethroids ได้แก่ bifenthrin, permethrin และ deltamethrin ในน้ำในระหว่างการเก็บไว้ในภาชนะที่เป็นแก้วและทำการสกัดโดยใช้เทคนิค solid-phase membrane ใน solid-free water ความเข้มข้นของสารประกอบทั้งหมดมีการลดลงอย่างรวดเร็วและยังคงเหลืออยู่เพียง 58-72% ของความเข้มข้นเริ่มต้น มีความเป็นไปได้ว่ามีการดูดซับของสารบริเวณผิวหน้าของแก้วที่ใช้เป็นภาชนะในการเก็บ การคืนกลับเพิ่มมากขึ้นในตัวอย่างของเหลวที่ลอยอยู่ในของแข็ง อย่างไรก็ตามการสูญหายที่สำคัญเกิดขึ้นเมื่อตัวอย่างของเหลวไม่มีการเขย่าก่อนทำการสกัด และการสูญหายในปริมาณมากมาจากการแยกออกไปของ suspended solids ที่มาจากชั้นของเหลว การคืนกลับจากการสกัดเกือบ 100% ได้มาจากการใช้ C₈ หรือ C₁₈ membranes ที่ใช้สำหรับการสกัดตัวอย่างของเหลว พบว่าความเสถียรของ solid-free water จากการคืนกลับของ bifenthrin, permethrin และ deltamethrin ที่อยู่ในน้ำ deionize water ที่เก็บไว้ในภาชนะที่เป็นขวดแก้วที่อุณหภูมิ 4 และ 20 °C ความเข้มข้นของสารกำจัดแมลงลดลงโดยในระยะเวลา 3-18 วัน ค่าเฉลี่ยความเข้มข้นของ bifenthrin, cis-permethrin, trans-permethrin และ deltamethrin มีค่าเท่ากับ 37, 29, 41 และ 28% ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบความเข้มข้นของสารกำจัดแมลงที่ยังเหลืออยู่จากการเก็บตัวอย่างเป็นระยะเวลา 3-18 วัน จากการวิเคราะห์ค่าทางสถิติพบว่าที่อุณหภูมิเดียวกัน ความเข้มข้นสารแต่ละชนิดไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ยกเว้น trans-permethrin ที่อุณหภูมิ 20 °C จะมีความเข้มข้นน้อยกว่าที่อุณหภูมิ 4 °C

Avramides (2005) ได้ศึกษาความเสถียรในระยะยาวของ pure standard และ stock standard solution หลังจากนั้นตรวจวัดสารที่เหลือนด้วย gas chromatography โดยในการทดลองนี้ได้มีการเตรียมสาร standard บริสุทธิ์และสารละลาย stock standard ในตัวทำละลาย toluene, acetone หรือ ethyl acetate ผลการทดลองพบว่า สาร pure standard และ stock standard solution มีความเสถียรที่อุณหภูมิ ≤ -20 °C เป็นระยะเวลา 4-8 และ 2-8 ปี ตามลำดับ และตัวทำละลายที่มีความเหมาะสมในการเตรียมสาร standard บริสุทธิ์และสารละลาย stock standard ในการทดลองนี้คือ toluene เพราะเป็นตัวทำละลายที่ระเหยได้น้อยที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับ acetone หรือ ethyl acetate

Leng และ Gries (2005) ได้พัฒนาความไวของวิธี gas chromatography-high resolution mass spectrometry สำหรับการตรวจวัดในครั้งเดียวกันของสาร trans-chrysanthemumdicarboxylic acid, cis- and trans-3-(2,2-dichlorovinyl)-2,2-dimethylcyclopropanecarboxylic acid, cis-3-(2,2-dibromovinyl)-2,2-dimethylcyclopropane carboxylic acid, 3-phenoxybenzoic acid and 4-fluoro-3-phenoxybenzoic acid ในปัสสาวะของคนซึ่งสารเหล่านี้เป็นเมแทบอลิท์ที่เป็นตัวชี้วัดทางชีวภาพสำหรับการได้รับสาร pyrethrum, allethrin, resmethrin, phenothrin, tetramethrin, cyfluthrin, cypermethrin, deltamethrin และ permethrin ได้ทำการศึกษาความเสถียรของสารโดยการเก็บสารละลายไว้ที่อุณหภูมิต่างๆ กัน ได้แก่ -21, -18 และ 4 °C ตามลำดับ พบว่าเมื่อเก็บสารละลายไว้ที่อุณหภูมิ -18 °C (deep freezer) สามารถเก็บรักษาสารละลาย (stock solution) ไว้ได้อย่างน้อยประมาณ 6 เดือน ตัวอย่างปัสสาวะสามารถเก็บได้เป็นระยะเวลามากกว่า 1 ปี ที่อุณหภูมิ -21 °C (deep freezer) และตัวอย่างที่ทำอนุพันธ์ (derivatized) สามารถเก็บไว้ได้ประมาณ 1 เดือน ที่อุณหภูมิ 4 °C (refrigerator)

Wang และคณะ (2009) ได้พัฒนาวิธีการสำหรับวิเคราะห์สารกำจัดแมลงกลุ่ม organophosphate และ pyrethroid ซึ่งประกอบด้วย diazinon, chlorpyrifos, bifenthrin, fenpropathrin, permethrin, λ -cyhalothrin, cyfluthrin, cypermethrin, esfenvalerate และ deltamethrin ที่ระดับส่วนในพันล้านส่วน (parts per trillion) ในตัวอย่างน้ำ โดยใช้วิธีการสกัด 2 แบบ คือ liquid-liquid extraction and subsequent normal phase solid-phase extraction cleanup (LLE-NPSPE) และ reversed phase solid-phase extraction พบว่าวิธีการสกัดแบบ LLE-NPSPE เป็นวิธีที่ดีที่สุดในการสกัดสารกำจัดแมลงที่มีปริมาณน้อยในตัวอย่างน้ำ %recovery จากการใช้วิธีการสกัดแบบ LLE-NPSPE อยู่ในช่วง 63.2-148.8% ค่า limit of detection อยู่ในช่วง 0.72-1.69 ng/L และศึกษาความเสถียรของสารกำจัดแมลงในตัวอย่างน้ำในทะเลสาบที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 1 ชม., 1, 4 และ 7 วัน ซึ่งตัวอย่างน้ำที่ศึกษามีสภาวะที่แตกต่างกัน ได้แก่ 1. ตัวอย่างน้ำบริสุทธิ์ 2. ตัวอย่างน้ำที่มีการเติมตัวทำละลาย hexane 20 mL 3. ตัวอย่างน้ำที่มีการปรับ pH ด้วยกรด HCl (pH 2) จากผลการทดลองพบว่า

ตัวอย่างน้ำที่มีการปรับ pH ด้วยกรด HCl มีความเสถียรของสารกำจัดแมลงมากที่สุดคือ สามารถเก็บตัวอย่างได้มากกว่า 7 วัน

Yoshida (2009) ได้พัฒนาความไวของวิธี gas chromatography mass spectrometry สำหรับตรวจวัดในครั้งเดียวกันของสารกลุ่ม pyrethroids 17 ชนิด (allethrin, bifenthrin, cypermethrin, cyphenothrin, deltamethrin, empenethrin, fenpropathrin, furamethrin, imiprothrin, metofluthrin, permethrin, phenothrin, prallethrin, profluthrin, resmethrin, tetramethrin และ transfluthrin) ในอากาศ (indoor air) ซึ่งจะเก็บตัวอย่าง pyrethroids เป็นเวลา 24 ชม. ในตัวดูดซับ (quartz fiber filter และ Empore C₁₈ disk) ร่วมกับการป้องกันแสง โดยการห่อด้วยอะลูมิเนียมฟอยล์ พบว่าตัวอย่าง pyrethroids สามารถเก็บรักษาไว้ได้ประมาณ 1 เดือนที่อุณหภูมิ 4 °C (refrigerator) โดยที่ไม่มีการเสื่อมสลายของสาร

1.3 วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาผลของปัจจัยทางกายภาพ ได้แก่ อุณหภูมิ เวลา ความเป็นกรด ต่อระดับของ permethrin และ phenoxybenzyl alcohol ในตัวอย่างเลือด
2. ศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมที่จะทำให้ permethrin ในตัวอย่างเลือดมีความเสถียรสูงสุด

บทที่ 2

วิธีการวิจัย

2.1 สารเคมีและเครื่องมือ

2.1.1 สารเคมี

ตารางที่ 2.1 สารเคมีที่ใช้ในการศึกษา

สารเคมี	เกรด	MW/FW/g/mol	แหล่งที่มา
Acetonitrile (Lot no. H 19B16)	HPLC	41.05	Millinckrodt Baker Inc., NJ, U.S.A
Methanol (Lot no. H 32E03)	HPLC	32.04	Millinckrodt Baker Inc., NJ, U.S.A
Chloroform (Lot no. 09F100513)	GR	119.38	VWR International Ltd, Pool, U.K.
Acetic acid (Lot no. B 44806)	A.C.S. Reagent	60.05	Millinckrodt Baker Inc., NJ, U.S.A
Permethrin (Lot no. SZE7079X)	trans-permethrin 71.7% cis-permethrin 26.4%	391.29	SIGMA-ALDRICH, Inc., P.O., Germany
Phenoxybenzyl alcohol (Lot no. 1396847)	98%	200	ALDRICH, USA
Heparin	60 u/mL	12000-15000	LEO Pharmaceutical, Denmark

ตารางที่ 2.1 สารเคมีที่ใช้ในการศึกษา (ต่อ)

สารเคมี	เกรด	MW/FW/g/mol	แหล่งที่มา
Trifluoroacetic acid (TFA)	AR	114.02	Millinckrodt Baker Inc., NJ, U.S.A.
Perchloric acid (HClO ₄)	AR	100.46	Millinckrodt Baker Inc., NJ, U.S.A.

2.1.2 วัสดุและเครื่องมือ

ตารางที่ 2.2 วัสดุและเครื่องมือที่ใช้ในการศึกษา

	รายการ	แหล่งที่มา
วัสดุ	VertiPak TM C ₁₈ – Tubes (200 mg/3mL)	Vertical chromatography Co., LTD, Thailand
	Sunfire TM C ₁₈ guard column (20×4.6 mm i.d., 5 μm)	Water Corporation, Massachusetts, U.S.A
	Fortis TM C ₁₈ column (150×4.6 mm i.d., 5 μm)	Fortis TM Technologies Ltd., UK
เครื่องมือ	Analytical balances model AB 204-S	METTER TOLEDO, Greifensee, Switzerland
	Automatic pipette 100 μL	Eppendorf, Hamburg, Germany
	Automatic pipette 1000 μL	SOCOREX, Isba S.A., Switzerland
	Thermometer	SOCOREX, Isba S.A., Switzerland

ตารางที่ 2.2 วัสดุและเครื่องมือที่ใช้ในการศึกษา (ต่อ)

	รายการ	แหล่งที่มา
เครื่องมือ	Ultrasonic bath model JAC 2010	Kodo, Hwaseong, South Korea
	Vortex Genie-2	Sciencetific Industries, New York, USA
	Refrigerated centrifuge	SORVALL RC-3B Plus, Greifensee, Switzerland
	High Performance Liquid Chromatography (HPLC)	Agilent 1200 Series, DE, U.S.A.

2.2 รูปแบบการทดลอง

2.2.1 การเตรียมสารละลายเข้มข้น permethrin และ phenoxybenzyl alcohol

เตรียมสารละลายเข้มข้น permethrin และ phenoxybenzyl alcohol ที่ความเข้มข้น 1000 µg/mL โดยชั่งสารมาตรฐาน 10 mg ละลายด้วย acetonitrile แล้วปรับปริมาตรด้วย acetonitrile โดยใช้ขวดวัดปริมาตรขนาด 10 mL

2.2.2 การศึกษาความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (method validation) สำหรับวิเคราะห์ permethrin และ phenoxybenzyl alcohol โดยเทคนิค HPLC

ก่อนวิเคราะห์ permethrin และ phenoxybenzyl alcohol จะทำการทดสอบความใช้ได้ของวิธี ตาม ICH guideline recommendation (Swartz และ Krull, 1997) และ Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation of Food and Drug Administration in U.S. (FDA, 2001) ซึ่งประกอบด้วยค่าพารามิเตอร์ดังนี้ linearity, recovery, intra-day and inter-day precision, accuracy และ lower limit of quantification (LLOQ) ซึ่งจะทำการ validate ในพลาสมาของหนูขาวที่ไม่ได้รับสาร permethrin

1) ค่าความเป็นเส้นตรง (linearity)

ความเป็นเส้นตรงเป็นการตรวจวัดโดยการเตรียมตัวอย่างพลาสมาแล้วเติมสารมาตรฐาน permethrin ลงในตัวอย่าง (blank plasma) ที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน (0.2, 1.25, 2.5, 5, 7.5 และ 10 µg/mL) (ทำซ้ำ 4 ครั้ง) และเติมสาร phenoxybenzyl alcohol ลงในตัวอย่าง (blank plasma) ที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน (0.7, 2, 20, 80, 100 และ 160 µg/mL) (ทำซ้ำ 4 ครั้ง) calibration curve เป็นความสัมพันธ์ระหว่าง response (peak area) (Y) กับ ความเข้มข้น (X) ที่วิเคราะห์ calibration curve เป็นการสร้างกราฟมาตรฐานโดยพล็อต response (peak area) (Y) ของ permethrin และ phenoxybenzyl alcohol) เทียบกับค่าความเข้มข้นของสารมาตรฐาน permethrin และ phenoxybenzyl alcohol (X) คำนวณหาสมการถดถอยเชิงเส้น และหาค่า correlation coefficient (r)

2) ค่าความเที่ยง (precision)

ความแม่นยำของการวิเคราะห์ภายในวันเดียวกัน (intra-day precision) และความแม่นยำของการวิเคราะห์ต่างวัน (inter-day precision) เป็นการตรวจวัดสารมาตรฐาน permethrin ที่ความเข้มข้น 0.2, 1, 4 และ 8 µg/mL (ทำซ้ำ 3 ครั้ง) และ phenoxybenzyl alcohol ที่ความเข้มข้น 0.7, 10, 50 และ 150 µg/mL (ทำซ้ำ 3 ครั้ง) ในพลาสมาทำโดยวิเคราะห์ภายในวันเดียวกันและต่างวันเป็นเวลา 5 วันติดต่อกัน ค่าความแม่นยำได้มาจากการหาค่า relative standard deviation (RSD) จากสมการ

$$\text{Relative standard deviation (\% RSD)} = \frac{\text{Standard deviation (S.D.)}}{\text{Mean peak area}} \times 100$$

การตรวจวัดความแม่นยำของแต่ละความเข้มข้นจะต้องมีค่า coefficient of variation ไม่เกิน 15% ยกเว้น LLOQ จะต้องมีความแปรปรวนไม่เกิน 20%

3) ค่าความแม่นยำ (accuracy)

ค่าความถูกต้องของการวิเคราะห์ทำโดยการเติมสารมาตรฐาน permethrin ในพลาสมาที่ความเข้มข้น 0.2, 1, 4 และ 8 µg/mL (ทำซ้ำ 3 ครั้ง) และเติมสารมาตรฐาน phenoxybenzyl alcohol ในพลาสมาที่ความเข้มข้น 0.7, 10, 50 และ 150 µg/mL (ทำซ้ำ 3 ครั้ง) เปรียบเทียบค่าความเข้มข้นที่วัดได้กับค่าที่มีอยู่จริงในตัวอย่าง หาค่า deviation (DEV) จากสมการ

$$\text{Deviation (\% DEV)} = \frac{(\text{measured concentration} - \text{nominal concentration})}{\text{nominal concentration}} \times 100$$

ค่าความถูกต้องยอมรับได้เมื่อค่า DEV มีค่าไม่เกิน 15% ยกเว้น LLOQ จะต้องไม่เกิน 20%

4) ร้อยละของการคืนกลับ (%recovery)

ค่า recovery ของสาร permethrin จากการสกัดในตัวอย่างพลาสมา เป็นการวิเคราะห์ที่ความเข้มข้น 0.2, 1, 4 และ 8 µg/mL (ทำซ้ำ 3 ครั้ง) และ phenoxybenzyl alcohol ที่ความเข้มข้น 0.7, 10, 50 และ 150 µg/mL (ทำซ้ำ 3 ครั้ง) โดยเปรียบเทียบกับ response ที่ได้จากการสกัด permethrin และ phenoxybenzyl alcohol จากตัวอย่างพลาสมากับ response ที่ได้จากการฉีดสารละลายมาตรฐาน permethrin และ phenoxybenzyl alcohol ที่เตรียมโดยสารละลายมาตรฐาน permethrin และ phenoxybenzyl alcohol กับตัวทำละลาย acetonitrile ค่า % recovery การสกัดหาจากสมการ

$$\text{Recovery (\%)} = \frac{\text{responses after extraction}}{\text{responses after direct injection}} \times 100$$

5) ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถคำนวณปริมาณได้อย่างถูกต้องและแม่นยำ

(Lower limit of quantification, LLOQ)

ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถคำนวณปริมาณได้อย่างถูกต้องและแม่นยำเป็นการตรวจวัดโดยการเติมสารมาตรฐาน permethrin ที่ความเข้มข้น 0.2 µg/mL (ทำซ้ำ 3 ครั้ง) และ phenoxybenzyl alcohol ที่ความเข้มข้น 0.7 µg/mL (ทำซ้ำ 3 ครั้ง) ในตัวอย่างพลาสมา ความเข้มข้นที่เลือกจะต้องมี response (peak area) ของสารที่วิเคราะห์มากกว่าหรือเท่ากับ 5 เท่าของ response (peak area) ใน blank plasma ($S/N \geq 5$)

2.2.3 การศึกษาความเสถียรของ permethrin ในตัวอย่างเลือด

2.2.3.1 การเตรียมสารละลายเข้มข้นและสารละลายมาตรฐาน permethrin

เตรียมสารละลายเข้มข้น permethrin ที่ความเข้มข้น 1000 µg/mL โดยชั่งสารมาตรฐาน 10 mg ละลายด้วย acetonitrile ในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 mL แล้วปรับปริมาตรด้วย acetonitrile หลังจากนั้นเตรียมสารละลายมาตรฐาน permethrin โดยทำการเจือจางสารละลายเข้มข้นด้วย acetonitrile ให้ได้ความเข้มข้น 500 µg/mL

2.2.3.2 การเก็บตัวอย่างเลือดและการเตรียมพลาสมา

ทำการวางยาสลบหนูด้วย ether หลังจากนั้นเก็บตัวอย่างเลือดโดยการเจาะเลือดจาก แอ่งเลือดใต้ตาใส่ในหลอดทดลองที่มีสาร heparin ความเข้มข้น 60 u/mL โดยใช้อัตราส่วนของ heparin 0.1 mL ต่อเลือด 1 mL ผสมให้เข้ากัน หลังจากนั้นนำตัวอย่างเลือดที่ผสมกับ heparin แล้ว (heparinized blood) ไปปั่นทันทีที่ $1600 \times g$ เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ $4^{\circ}C$ เพื่อแยก ส่วนของพลาสมา

2.2.3.3 การเตรียมตัวอย่าง plasma blank

นำตัวอย่างเลือดที่ผสมกับ heparin แล้ว ไปปั่นทันทีที่ $1600 \times g$ เป็นเวลา 15 นาที ที่ อุณหภูมิ $4^{\circ}C$ เพื่อแยกส่วนของพลาสมา หลังจากนั้นเปิดพลาสมา ปริมาตร 200 μL ใส่ลงใน หลอดทดลอง แล้วจึงนำมาสกัด หลังจากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC

2.2.3.4 อิทธิพลของตัวกลาง

เตรียมสารละลาย permethrin ในตัวทำละลายอินทรีย์โดยเปิดสารละลายมาตรฐาน permethrin ความเข้มข้น 500 $\mu g/mL$ ปริมาตร 50 μL ลงในหลอดทดลอง เติม acetonitrile ปริมาตร 450 μL เพื่อให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 50 $\mu g/mL$ เขย่าให้เข้ากันเบาๆ (ทำซ้ำ 3 ครั้ง)

เตรียมสารละลาย permethrin ในตัวอย่างเลือดโดยเปิดสารละลายมาตรฐาน permethrin ความเข้มข้น 500 $\mu g/mL$ ปริมาตร 50 μL ลงในหลอดทดลอง แล้วเติมตัวอย่าง เลือดที่ผสมกับ heparin แล้ว ปริมาตร 450 μL เขย่าให้เข้ากันเบาๆ แล้วนำไปแยกส่วนของ พลาสมา ก่อนทำการสกัด (ทำซ้ำ 3 ครั้ง)

2.2.3.5 อิทธิพลของอุณหภูมิและเวลา

เปิดสารละลายมาตรฐาน permethrin ความเข้มข้น 500 $\mu g/mL$ ปริมาตร 50 μL เติม ลงไปในหลอดทดลอง หลังจากนั้นเติมตัวอย่างเลือดที่ผสมกับ heparin แล้ว ปริมาตร 450 μL เพื่อให้ได้ตัวอย่างเลือดที่มีความเข้มข้นของ permethrin 50 $\mu g/mL$ เขย่าให้เข้ากันเบาๆ นำ ตัวอย่างเลือดไปตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ $25^{\circ}C$ (อุณหภูมิห้อง) $4^{\circ}C$ (ช่องทำความเย็นปกติของ ตู้เย็น) และ $-20^{\circ}C$ (ช่องแช่แข็งของตู้เย็น) ทั้งนี้ได้ตรวจสอบอุณหภูมิโดยใช้เทอร์โมมิเตอร์

ตัวอย่างเลือดถูกตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิต่างกล่าว เป็นเวลา 0, 0.5, 1, 2, และ 4 ชั่วโมง ตามลำดับ ก่อนนำไปปั่นแยกเพื่อเอาส่วนของพลาสมา มาทำการสกัด (ทำซ้ำ 3 ครั้ง)

2.2.3.6 อิทธิพลของความเป็นกรด

ปิเปตตัวอย่างเลือดที่ผสมกับ heparin แล้ว ปริมาตร 450 μL เติมน้ำลงในหลอดทดลอง หลังจากนั้นเติมกรด TFA เข้มข้น 70% ด้วยอัตราส่วนระหว่างตัวอย่างเลือดต่อกรด 100:1 และ 200:1 หรือกรด HClO_4 เข้มข้น 98% ด้วยอัตราส่วนตัวอย่างเลือดต่อกรด 50:1, 100:1, 200:1, 225:1 และ 250:1 หลังจากนั้นเขย่าให้เข้ากันและ เติมน้ำละลายมาตรฐาน permethrin ที่ความเข้มข้น 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ปริมาตร 50 μL เพื่อให้ได้ตัวอย่างเลือดที่มีความเข้มข้นของ permethrin 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ เขย่าให้เข้ากัน นำไปปั่นแยกทันทีเพื่อเอาส่วนของพลาสมาทำการสกัด (ทำซ้ำ 2 ครั้ง)

2.2.3.7 อิทธิพลของความเป็นกรดร่วมกับการรักษาอุณหภูมิ

ปิเปตตัวอย่างเลือดที่ผสมกับ heparin แล้ว ปริมาตร 450 μL เติมน้ำลงในหลอดทดลอง เติมน้ำกรด HClO_4 อัตราส่วน 200:1 และ 225:1 เขย่าให้เข้ากัน หลังจากนั้นเติมน้ำละลายมาตรฐาน permethrin ที่ความเข้มข้น 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ปริมาตร 50 μL เพื่อให้ได้ตัวอย่างเลือดที่มีความเข้มข้นของ permethrin 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ เขย่าให้เข้ากัน แล้วนำไปแช่ไว้ในบีกเกอร์ที่มีน้ำแข็ง ซึ่งวัดอุณหภูมิได้ 3 $^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 30 นาที ก่อนนำไปปั่นแยกทันทีเพื่อเอาส่วนของพลาสมาทำการสกัด (ทำซ้ำ 2 ครั้ง)

2.2.3.8 การตรวจวัดระดับของ permethrin ในสัตว์ทดลอง

- สัตว์ทดลอง

หนูขาวสายพันธุ์ Wistar Rat เพศผู้ที่มีน้ำหนักประมาณ 180-200 กรัม จากสถาน สัตว์ทดลองภาคใต้ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่

- การบริหารยา

สัตว์ทดลองจะต้องงดอาหารเป็นเวลา 10-12 ชั่วโมงก่อนการได้รับสาร permethrin หลังจากนั้นสัตว์ทดลองจะได้รับสาร permethrin ที่ละลายด้วย corn oil โดยการให้ทางปาก (oral) โดยในการทดลองนี้ปริมาณของสาร permethrin ที่สัตว์ทดลองจะได้รับมี 2 ขนาด คือ 215 mg/kg (ทำซ้ำ 2 ครั้ง) และ 344 mg/kg

- การเก็บตัวอย่างเลือดที่ไม่มีการเติมกรดร่วมกับการรักษาอุณหภูมิ

ทำการเก็บตัวอย่างเลือดปริมาตรครั้งละ 600 μL ใส่ในหลอดทดลองที่มี heparin 60 μL (อัตราส่วนของ heparin 0.1 mL ต่อเลือด 1 mL) โดยเจาะเลือดจากแ่งใต้ตา ที่เวลา 0, 2, 3

และ 6 ชั่วโมง หลังจากให้ permethrin แก่หนูในขนาด 215 mg/kg โดยการป้อนทางปาก แล้วนำตัวอย่างเลือดไปปั่นเพื่อแยกพลาสมาทันทีที่ $1600 \times g$ เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ $4^{\circ}C$

- การเก็บตัวอย่างเลือดที่มีการเติมกรดร่วมกับการรักษาอุณหภูมิ

ทำการเก็บตัวอย่างเลือดปริมาตรครั้งละ 600 μL ใส่ในหลอดทดลองที่มี heparin 60 μL (อัตราส่วนของ heparin 0.1 mL ต่อเลือด 1 mL) และกรด $HClO_4$ 3 μL (อัตราส่วนของเลือด 200 μL : กรด $HClO_4$ 1 μL) ซึ่งแช่หลอดทดลองที่ใช้ในเก็บเลือดนี้ไว้ในน้ำแข็งก่อนการเก็บตัวอย่างเลือดที่เวลาต่างๆ โดยเจาะเลือดจากแอ่งใต้ตา ที่เวลา 0, 2, 3 และ 6 ชั่วโมง หลังจากให้ permethrin แก่หนูในขนาด 215 mg/kg โดยการป้อนทางปาก และเก็บที่เวลา 0, 1, 2, 3, 6, 12 และ 24 ชั่วโมง ตามลำดับ หลังจากให้ permethrin แก่หนูในขนาด 344 mg/kg โดยการป้อนทางปาก แล้วนำตัวอย่างเลือดไปปั่นแยกพลาสมาทันทีที่ $1600 \times g$ เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ $4^{\circ}C$

2.2.3.9 วิธีการสกัดตัวอย่างพลาสมา

วิธีการสกัดดัดแปลงมาจากวิธีของ Junting และ Chuichang (1991) โดยนำตัวอย่างพลาสมา 200 μL ใส่ในหลอดทดลองขนาด 5 mL ทำตัวอย่างให้เป็นกรดด้วยการเติม 1 N acetic acid 60 μL เขย่าให้เข้ากันด้วย vortex เป็นเวลา 30 วินาที นำไปสกัดโดยใช้เทคนิค solid phase extraction (SPE) โดยใช้ VertiPakTM C₁₈ - Tubes 200 mg/3mL เริ่มจากการ precondition cartridge ด้วย chloroform, methanol, methanol : deionized water (อัตราส่วน 1:1) และ deionized water อย่างละ 3 mL ตามลำดับ หลังจากนั้น load ตัวอย่างพลาสมาใส่ลงไปใน cartridge ทำการล้างด้วย deionized water 3 mL แล้วชะด้วย chloroform 3 mL ตัวอย่างที่ทำการสกัดได้นำไประเหยจนแห้งด้วยไนโตรเจนที่อุณหภูมิห้อง ละลายส่วนที่เหลือด้วย acetonitrile 200 μL แล้วทำการวิเคราะห์ด้วย HPLC

2.3 เครื่องมือและสภาวะในการวิเคราะห์ด้วย HPLC

เครื่อง High Performance Liquid Chromatograph, HPLC (Agilent 1200 Series, DE, U.S.A.) ต่อกับตัวตรวจวัด diode array และระบบประมวลผล Agilent chemstation software system (CA, U.S.A) สภาวะของ HPLC ดัดแปลงมาจากวิธีของ Abu-Qare และ Abu-Donia (2001) คอลัมน์ที่ใช้เป็นชนิด reverse-phase FortisTM C₁₈ column (150 \times 4.6 mm i.d., 5 μm) ซึ่งต่อกับ SunfireTM C₁₈ guard column (20 \times 4.6 mm i.d., 5 μm) อุณหภูมิของคอลัมน์เท่ากับ $25^{\circ}C$ เฟสเคลื่อนที่ประกอบด้วย deionized water และ acetonitrile และแยกสารโดย gradient program โดยเริ่มต้นที่ 70% acetonitrile ที่เวลา 0-4 นาที แล้วเพิ่มขึ้นเป็น

100% acetonitrile ในนาที่ที่ 5 -20 หลังจากนั้นปรับลดลงเป็น 70% acetonitrile ในนาที่ที่ 21-23 อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่เท่ากับ 1.4 mL/min ปริมาตรของตัวอย่างที่ฉีดเข้าสู่ระบบเท่ากับ 20 μ L และตรวจวัด permethrin และ phenoxybenzyl alcohol ที่ความยาวคลื่น 210 nm

2.4 วิเคราะห์ผลการทดลอง

บันทึกค่าพื้นที่ใต้กราฟ (peak area) ของ permethrin ทั้ง *trans*- และ *cis*-isomers และ phenoxybenzyl alcohol แล้วนำมาคำนวณหาค่า metabolic ratio (MR) สำหรับ *trans*- และ *cis*-isomers จากสูตรต่อไปนี้

$$MR_{trans-permethrin} = \frac{\text{mean peak area}_{phenoxybenzylalcohol}}{\text{mean peak area}_{trans-permethrin}}$$

$$MR_{cis-permethrin} = \frac{\text{mean peak area}_{phenoxybenzylalcohol}}{\text{mean peak area}_{cis-permethrin}}$$

คำนวณหาค่าร้อยละการคืนกลับ (%recovery) สำหรับ *trans*- และ *cis*-isomers จากสูตรต่อไปนี้

$$\%recovery_{trans-permethrin} = \frac{\text{mean peak area}_{trans-permethrin} \text{ after extraction}}{\text{mean peak area}_{trans-permethrin} \text{ direct injection}} \times 100$$

$$\%recovery_{cis-permethrin} = \frac{\text{mean peak area}_{cis-permethrin} \text{ after extraction}}{\text{mean peak area}_{cis-permethrin} \text{ direct injection}} \times 100$$

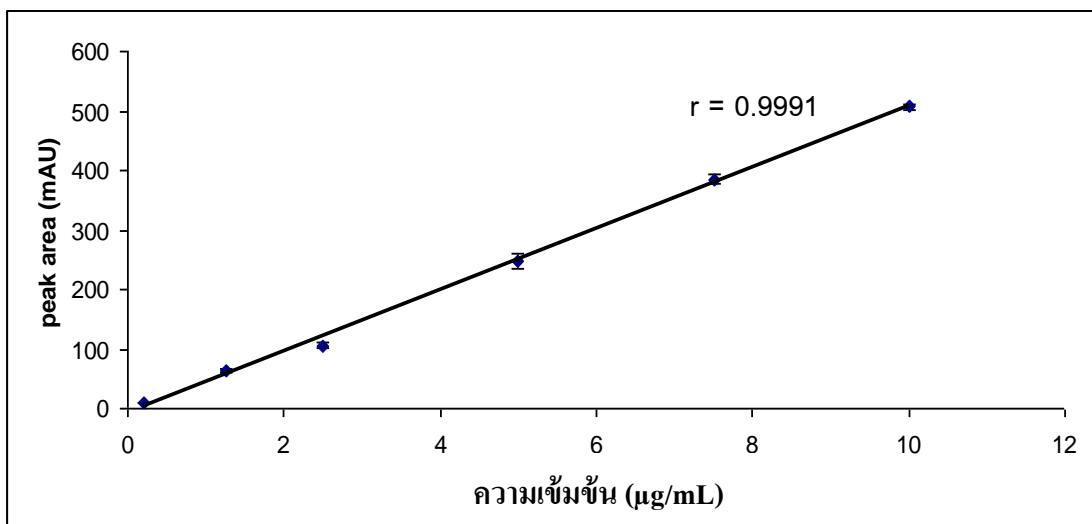
บทที่ 3

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

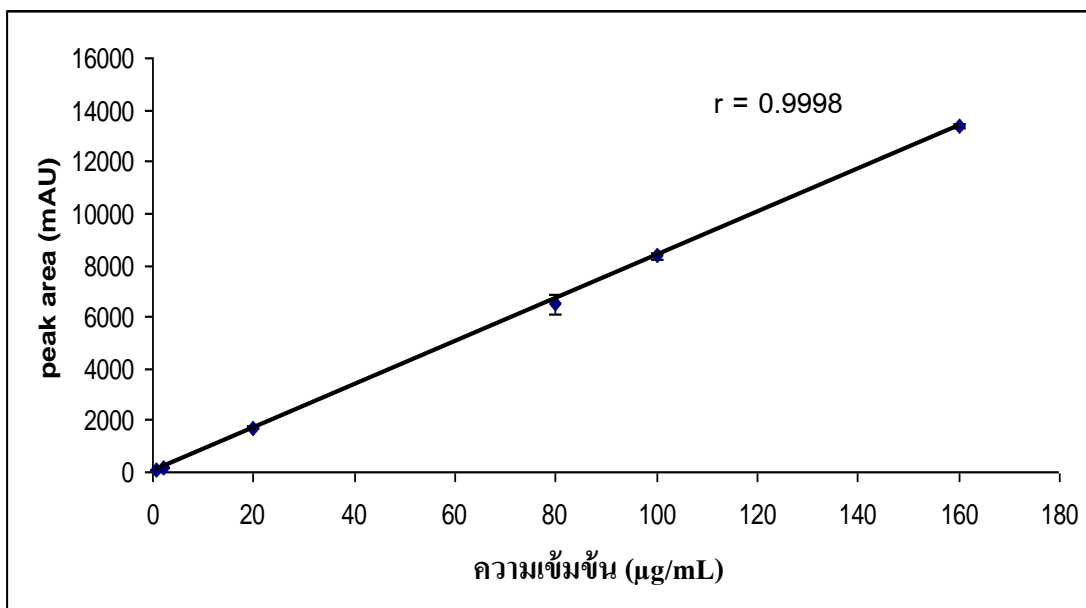
3.1 ความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (method validation) สำหรับวิเคราะห์ *trans*-permethrin และ phenoxybenzyl alcohol ในตัวอย่างพลาสมา

1) ความเป็นเส้นตรง (linearity)

ผลการวิเคราะห์ค่าความเป็นเส้นตรง จากกราฟเทียบมาตรฐานมีความเป็นเส้นตรงอยู่ในช่วงความเข้มข้น 0.2-10 $\mu\text{g/mL}$ (4 ซ้ำ) โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ที่ดี (r) ซึ่งมีค่า $r = 0.9991$ สำหรับ *trans*-permethrin (รูปที่ 3.1) และสมการถดถอย $y = (50.22 \pm 0.06)x - (6.18 \pm 0.04)$ สำหรับ phenoxybenzyl alcohol (รูปที่ 3.2) ความเป็นเส้นตรงอยู่ในช่วงความเข้มข้น 0.7-160 $\mu\text{g/mL}$ (4 ซ้ำ) และมีค่า $r = 0.9998$ สมการถดถอย $y = (83.37 \pm 0.06)x - (9.68 \pm 0.09)$ เมื่อ x คือ ความเข้มข้นของ *trans*-permethrin หรือ phenoxybenzyl alcohol และ y คือ พื้นที่ใต้กราฟ (peak area)



รูปที่ 3.1 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นและค่าเฉลี่ยพื้นที่ใต้กราฟ (mean \pm S.D.) ของ *trans*-permethrin ในพลาสมา



รูปที่ 3.2 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นและค่าเฉลี่ยพื้นที่ใต้กราฟ (mean±S.D.) ของ phenoxybenzyl alcohol ในพลาสมา

2) ความเที่ยง (precision)

การตรวจวัดความเที่ยงทั้งภายในวันเดียวกัน (intra-day) และระหว่างวัน (inter-day) ใช้ตัวอย่างควบคุมคุณภาพ (quality control samples) 4 ความเข้มข้น ซึ่งได้มาจากการเติมสาร permethrin (0.2, 1, 4, 8 µg/mL) และ phenoxybenzyl alcohol (0.7, 10, 50, 150 µg/mL) ลงในตัวอย่างพลาสมา ความเที่ยงภายในวันเดียวกันเป็นการตรวจวัดโดยวิเคราะห์ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ แล้วทำการตรวจวัดในวันเดียวกันโดยใช้สภาวะในการวิเคราะห์เดียวกันด้วย ส่วนความเที่ยงระหว่างวันเป็นการตรวจวัดโดยวิเคราะห์ตัวอย่างเป็นเวลา 3 วันต่อเนื่องกัน ความเที่ยงภายในวันเดียวกันและระหว่างวันมีค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) อยู่ในช่วง 1.90-14.73 % สำหรับ *trans*-permethrin ดังแสดงในตารางที่ 3.1 และ 1.29-11.44 % สำหรับ phenoxybenzyl alcohol ดังแสดงในตารางที่ 3.2 ตามลำดับ ความเที่ยงทั้งภายในวันเดียวกันและระหว่างวัน สำหรับสารทั้งสองชนิดพบว่ามีค่า %RSD ไม่เกิน 15% และ 20% สำหรับค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถคำนวณปริมาณได้อย่างถูกต้องและแม่นยำ (LLOQ) (FDA, 2001; Peter และ Maurer, 2002)

ตารางที่ 3.1 ค่าความเที่ยงภายในวันเดียวกัน (intra-day) และความเที่ยงระหว่างวัน (inter-day) ของวิธีสำหรับตรวจวัด *trans*-permethrin ในพลาสมา

Concentration of permethrin ($\mu\text{g/mL}$)	Intra-day		Inter-day	
	Mean peak area \pm S.D. (n=3)	%RSD	Mean peak area \pm S.D. (n=3)	%RSD
0.2	14.15 \pm 1.44	10.25	11.57 \pm 1.43	12.32
1	58.83 \pm 3.59	6.10	51.61 \pm 7.66	14.73
4	203.61 \pm 20.30	9.97	178.87 \pm 12.47	6.97
8	393.26 \pm 7.49	1.90	365.42 \pm 30.28	8.29

ตารางที่ 3.2 ค่าความเที่ยงภายในวันเดียวกัน (intra-day) และความเที่ยงระหว่างวัน (inter-day) ของวิธีสำหรับตรวจวัด phenoxybenzyl alcohol ในพลาสมา

Concentration of phenoxybenzyl alcohol ($\mu\text{g/mL}$)	Intra-day		Inter-day	
	Mean peak area \pm S.D. (n=3)	%RSD	Mean peak area \pm S.D. (n=3)	%RSD
0.7	73.32 \pm 1.62	2.22	67.55 \pm 5.08	7.41
10	892.59 \pm 51.09	11.44	899.41 \pm 45.22	5.03
50	4316.28 \pm 55.78	1.29	4276.44 \pm 101.51	2.37
150	12355.03 \pm 230.89	1.87	12555.17 \pm 228.43	2.29

3) ความแม่นยำ (accuracy)

ความแม่นยำทั้งภายในวันเดียวกัน (intra-day) และระหว่างวัน (inter-day) ทำการตรวจวัดโดยใช้ตัวอย่างควบคุมคุณภาพ 4 ความเข้มข้น ซึ่งได้มาจากการเติมสาร permethrin (0.2, 1, 4, 8 $\mu\text{g/mL}$) และ phenoxybenzyl alcohol (0.7, 10, 50, 150 $\mu\text{g/mL}$) ลงในตัวอย่างพลาสมา ความแม่นยำภายในวันเดียวกันเป็นการตรวจวัดโดยวิเคราะห์ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ แล้วทำการตรวจวัดในเวลาเดียวกันโดยใช้สภาวะในการวิเคราะห์เดียวกัน ส่วนความแม่นยำระหว่างวันเป็นการตรวจวัดโดยวิเคราะห์ตัวอย่างเป็นเวลา 3 วันต่อเนื่องกัน ความแม่นยำภายในวันเดียวกันและระหว่างวันมีค่าการเบี่ยงเบน (%DEV) อยู่ในช่วง (+) 1 ถึง (+) 9.75 % สำหรับ *trans*-permethrin ดังแสดงในตารางที่ 3.3 และ (-) 0.8 ถึง (+) 10.00 % สำหรับ phenoxybenzyl alcohol ดังแสดงในตารางที่ 3.4 ตามลำดับ ความแม่นยำทั้งภายในวันเดียวกันและระหว่างวัน สำหรับสารทั้งสองชนิดพบว่ามีค่า %DEV ไม่เกิน \pm 15% และ \pm 20% สำหรับความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถคำนวณปริมาณได้อย่างถูกต้องและแม่นยำ (FDA, 2001)

ตารางที่ 3.3 ความแม่นยำภายในวันเดียวกัน (intra-day) และความแม่นยำระหว่างวัน (inter-day) ของวิธีสำหรับตรวจวัด permethrin ในพลาสมา

Concentration of permethrin ($\mu\text{g/mL}$)	Intra-day		Inter-day	
	Mean peak area \pm S.D. (n=3)	%DEV	Mean peak area \pm S.D. (n=3)	%DEV
0.2	9.63 \pm 0.39	5.00	10.03 \pm 1.36	1.00
1	46.71 \pm 4.18	7.00	47.94 \pm 4.05	1.00
4	203.61 \pm 20.30	9.75	178.87 \pm 12.47	3.00
8	393.26 \pm 7.49	1.00	365.42 \pm 30.28	5.38

ตารางที่ 3.4 ความแม่นยำภายในวันเดียวกัน (intra-day) และความแม่นยำระหว่างวัน (inter-day) ของวิธีสำหรับตรวจวัด phenoxybenzyl alcohol ในพลาสมา

Concentration of phenoxybenzyl alcohol ($\mu\text{g/mL}$)	Intra-day		Inter-day	
	Mean peak area \pm S.D. (n=3)	%DEV	Mean peak area \pm S.D. (n=3)	%DEV
0.7	61.07 \pm 2.42	4.28	64.23 \pm 3.61	10.00
10	892.29 \pm 6.53	3.69	882.92 \pm 20.27	2.60
50	4316.28 \pm 55.78	0.12	4276.44 \pm 101.51	-0.80
150	12355.03 \pm 230.89	3.23	12555.17 \pm 228.43	5.13

4) ร้อยละของการคืนกลับ (%recovery)

ค่าการคืนกลับของสารในการวิเคราะห์เป็นการเปรียบเทียบการตอบสนองของการตรวจวัดที่ได้มาจากปริมาณของสารที่เติมลงไปและสกัดจากตัวอย่างพลาสมากับการตอบสนองของการตรวจวัดที่ได้มาจากความเข้มข้นจริงของสารมาตรฐานบริสุทธิ์ที่อยู่ในตัวทำละลายอินทรีย์ ค่าการคืนกลับบ่งบอกถึงประสิทธิภาพของวิธีการสกัดที่ใช้ในการวิเคราะห์ ซึ่งประสิทธิภาพของวิธีการสกัดที่ดีจะต้องอยู่ในช่วง 80% - 120% (FDA, 2001)

ผลของค่าการคืนกลับที่ได้จากการสกัดสารในตัวอย่างพลาสมาสำหรับการตรวจวัดสาร *trans*-permethrin และ phenoxybenzyl alcohol ดังแสดงในตารางที่ 3.5 และ 3.6 ตามลำดับ ค่าเฉลี่ยร้อยละของการคืนกลับอยู่ในช่วง 77.03% - 78.66% สำหรับ *trans*-permethrin และ 82.40 - 86.78% สำหรับ phenoxybenzyl alcohol ซึ่งเป็นวิธีการสกัดที่มีประสิทธิภาพที่ดี

ตารางที่ 3.5 ร้อยละของการคืนกลับ (%recovery) ของการสกัด permethrin ในพลาสมา (n=3)

Concentration of permethrin ($\mu\text{g/mL}$)	Mean peak area		%Recovery *
	Direct injection	After extraction	
0.2	12.51	9.63	77.03 (2.79)
1	64.29	50.04	78.16 (3.34)
4	254.35	203.61	78.66 (5.52)
8	508.53	393.26	77.33 (1.77)

* Mean (SD)

ตารางที่ 3.6 ร้อยละของการคืนกลับ (%recovery) ของการสกัด phenoxybenzyl alcohol ในพลาสมา (n=3)

Concentration of phenoxybenzyl alcohol ($\mu\text{g/mL}$)	Mean peak area		%Recovery *
	Direct injection	After extraction	
0.7	70.39	61.07	86.78 (4.22)
10	1049.15	892.29	85.05 (0.07)
50	5240.41	4316.28	82.40 (2.73)
150	14425.87	12355.03	85.66 (2.25)

* Mean (SD)

5) ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถคำนวณปริมาณได้อย่างถูกต้องและแม่นยำ (Lower limit of quantification, LLOQ)

ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถคำนวณปริมาณได้อย่างถูกต้องและแม่นยำของสารในการวิเคราะห์เป็นการเปรียบเทียบการตอบสนองของการตรวจวัดที่ได้มาจากปริมาณของสารที่เติมลงไปและสกัดจากตัวอย่างพลาสมา (Signal; S) กับการตอบสนองของการตรวจวัดที่ได้มาจากตัวอย่างพลาสมา (blank plasma) ที่เวลาเดียวกันกับสารที่ต้องการวิเคราะห์ (Noise; N) ซึ่งจะต้องมีค่า $S/N \geq 5$ (FDA, 2001)

ผลของค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถคำนวณปริมาณได้อย่างถูกต้องและแม่นยำที่ได้จากการสกัดสารในตัวอย่างพลาสมาสำหรับการตรวจวัดสาร *trans*-permethrin และ phenoxybenzyl alcohol ดังแสดงในตารางที่ 3.7 และ 3.8 ตามลำดับ คือมีค่าเท่ากับ 0.2 $\mu\text{g/mL}$ สำหรับ *trans*-permethrin ($S/N = 6.28$) และ 0.7 $\mu\text{g/mL}$ สำหรับ phenoxybenzyl alcohol ($S/N = 5.56$) ซึ่งค่า LLOQ ที่ได้จากการวิเคราะห์ของวิธีการนี้มีความไว (sensitivity) เพียงพอสำหรับการตรวจวัดสารทั้งสองชนิดในตัวอย่างพลาสมา

ตารางที่ 3.7 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถคำนวณปริมาณได้อย่างถูกต้องและแม่นยำ (Lower limit of quantification, LLOQ) ของ *trans*-permethrin ในพลาสมา (n=3)

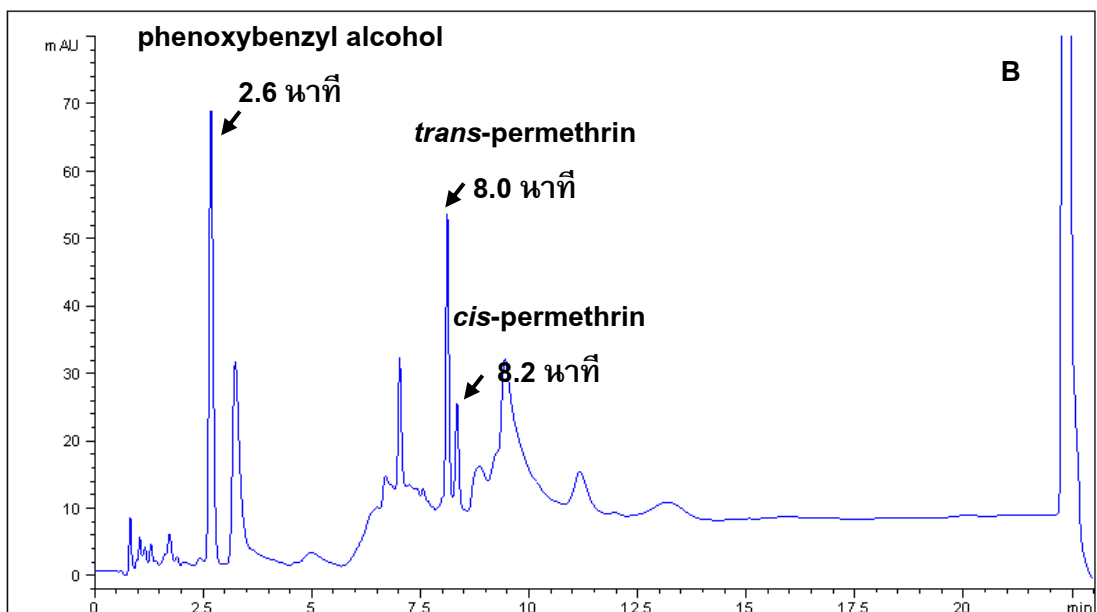
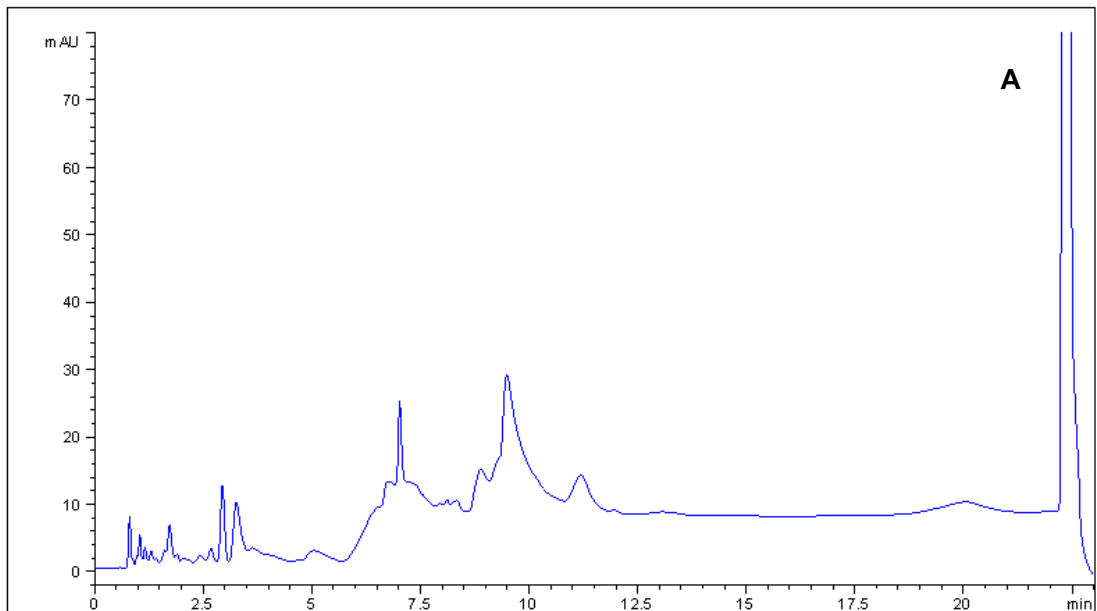
Concentration (µg/mL)	(n)	Peak area (mAU)		
		<i>trans</i> -permethrin	Blank plasma	S/N
0.2	1	7.98	1.1	7.25
	2	9.9	1.7	5.8
	3	10.5	1.8	5.8
mean		9.46	1.53	6.28

ตารางที่ 3.8 แสดงค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถคำนวณปริมาณได้อย่างถูกต้องและแม่นยำ (Lower limit of quantification, LLOQ) ของ phenoxybenzyl alcohol ในพลาสมา (n=3)

Concentration (µg/mL)	(n)	Peak area (mAU)		S/N
		Phenoxybenzyl alcohol	Blank plasma	
0.7	1	77.26	11.99	6.4
	2	76.18	13.06	5.83
	3	75.91	13.65	5.56
mean		76.45	12.9	5.93

3.2 การวิเคราะห์โครมาโทกราฟ

โครมาโทแกรมของการแยกสาร phenoxybenzyl alcohol และ permethrin ที่เติมลงไป ในตัวอย่างพลาสมาดังแสดงในรูปที่ 3.3 พบว่าพีคของ phenoxybenzyl alcohol และพีคของ permethrin ซึ่งประกอบด้วย *trans*-permethrin และ *cis*-permethrin สามารถแยกออกจากพีค อื่นๆที่อยู่ในตัวอย่างพลาสมาได้ดีโดยเฉพาะสาร permethrin ซึ่งประกอบด้วย 2 ไอโซเมอร์ ได้แก่ *trans*- และ *cis*- สามารถแยกออกจากกันได้ดีกว่าในรายงานของ Junting และ Chuichang (1991) และรูปร่างของพีคของสารแต่ละชนิดมีลักษณะที่สมมาตร เวลาที่พีคของสาร phenoxybenzyl alcohol และพีคของ permethrin ซึ่งประกอบด้วย *trans*-permethrin และ *cis*-permethrin ปรากฏคือ 2.6, 8.0 และ 8.2 นาที ตามลำดับ ซึ่งในการวิเคราะห์แต่ละตัวอย่างใช้ เวลา 23 นาที ซึ่งใช้เวลาในการวิเคราะห์น้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับในรายงานของ Ramesh และ Ravi (2004)



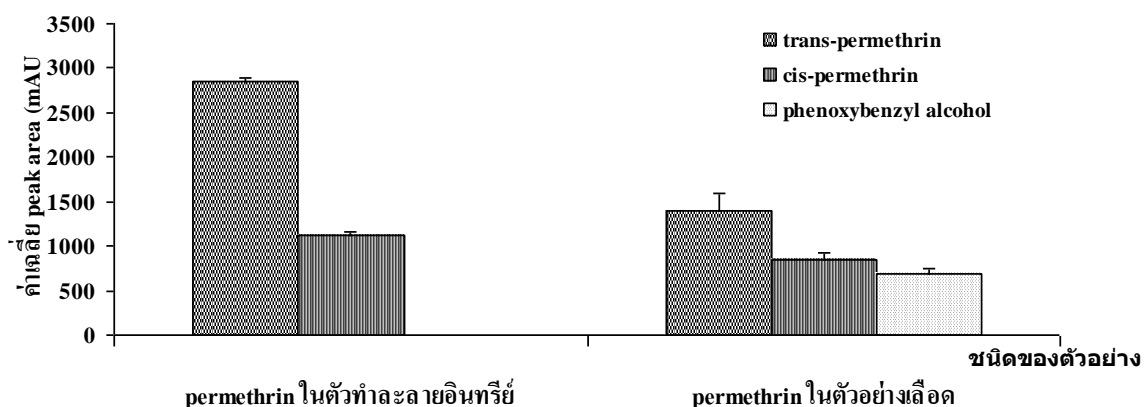
รูปที่ 3.3 โครมาโทแกรมของ phenoxybenzyl alcohol และ permethrin ซึ่งประกอบด้วย *trans*-permethrin และ *cis*-permethrin ในตัวอย่างพลาสมา; (A) blank plasma , (B) blank plasma ที่มีการเติมสารมาตรฐาน phenoxybenzyl alcohol และ permethrin (5 µg/mL)

3.3 การศึกษาความเสถียรของ permethrin ในตัวอย่างเลือด

3.3.1 อิทธิพลของตัวกลาง

ผลของตัวกลางที่ permethrin ละลายอยู่ นั่นคือในตัวทำละลายอินทรีย์ และในเลือด แสดงดังรูปที่ 3.4 ค่าเฉลี่ยพื้นที่ใต้กราฟของ *trans*-permethrin และ *cis*-permethrin ที่อยู่ในตัวอย่างเลือดมีค่าต่ำกว่าค่าเฉลี่ยพื้นที่ใต้กราฟของ permethrin ที่อยู่ในตัวทำละลายอินทรีย์ โดยค่าเฉลี่ยพื้นที่ใต้กราฟของ permethrin ในตัวอย่างเลือดมีค่าต่ำกว่าในตัวทำละลายอินทรีย์ 50.77% สำหรับ *trans*-isomer และ 24.28% สำหรับ *cis*-isomer อัตราส่วนพื้นที่ใต้กราฟ ของ *trans*-permethrin : *cis*-permethrin ที่อยู่ในตัวทำละลายอินทรีย์ มีค่าเท่ากับ 2.54 ในขณะที่อัตราส่วนพื้นที่ใต้กราฟของ *trans*-permethrin : *cis*-permethrin ในตัวอย่างเลือดมีค่าเท่ากับ 1.65 ซึ่งเป็นผลมาจากการลดลงอย่างมากของ *trans*-isomer ในตัวอย่างเลือด นอกจากนี้ยังตรวจพบ phenoxybenzyl alcohol ในตัวอย่างเลือดแต่ไม่พบในตัวอย่างที่เป็นสารละลาย permethrin ในตัวทำละลายอินทรีย์

phenoxybenzyl alcohol เป็นเมแทบอไลต์ที่เกิดจากปฏิกิริยา hydrolysis ของ permethrin โดยเฉพาะ *trans*-isomer (Nakamura *et al.*, 2007; Ueyama *et al.*, 2010) โดยเอนไซม์ carboxylesterase ซึ่งมีอยู่ในเลือด จึงเป็นไปได้ว่า ในระหว่างการเตรียมพลาสมาซึ่งต้องใช้เวลอย่างน้อย 15 นาที ในการปั่นเหวี่ยง permethrin ซึ่งอยู่ในเลือดได้ถูกเปลี่ยนให้เป็น phenoxybenzyl alcohol การที่ peak area ของ *trans*-permethrin ลดลงมากกว่า *cis*-isomer และการที่อัตราส่วนพื้นที่ใต้กราฟของ *trans*-permethrin : *cis*-permethrin ลดลง รวมทั้งการตรวจพบ phenoxybenzyl alcohol เฉพาะในตัวอย่างเลือด แสดงให้เห็นว่าในตัวอย่างเลือดมีการเปลี่ยนแปลงของ *trans*-permethrin ให้เป็น phenoxybenzyl alcohol นั่นคือมีการเกิด hydrolysis ของ permethrin



รูปที่ 3.4 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าเฉลี่ยพื้นที่ใต้กราฟ (\pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน) ของ *trans* permethrin, *cis*-permethrin และ phenoxybenzyl alcohol ที่อยู่ในตัวทำละลายอินทรีย์ (acetonitrile) และ ในตัวอย่างเลือด (n=3)

3.3.2 อิทธิพลของอุณหภูมิและเวลา

ผลของอุณหภูมิและเวลาที่มีต่อการเกิด hydrolysis ของ *trans*-permethrin และ *cis*-permethrin ไปเป็น phenoxybenzyl alcohol แสดงด้วยค่า MR ซึ่งคำนวณจากอัตราส่วนของค่าเฉลี่ยพื้นที่ใต้กราฟของเมแทบอลไลต์ต่อค่าเฉลี่ยพื้นที่ใต้กราฟของสารตั้งต้น (รูปที่ 3.5) ผลการทดลองพบว่าที่อุณหภูมิห้องนั้นคือ 25°C การตั้งตัวอย่างเลือดที่มีสาร permethrin อยู่ด้วยเป็นเวลาต่างๆ ตั้งแต่ 0, 0.5, 1, 2 และ 4 ชั่วโมง ทำให้ค่า MR สำหรับ *trans*-permethrin มีค่าเพิ่มขึ้นอย่างมาก และที่อุณหภูมิ 25°C นี้ค่า MR มีค่าสูงสุดตั้งแต่ 1 ชั่วโมงเป็นต้นไป MR สำหรับ *cis*-permethrin มีค่าเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย (รูปที่ 3.5A)

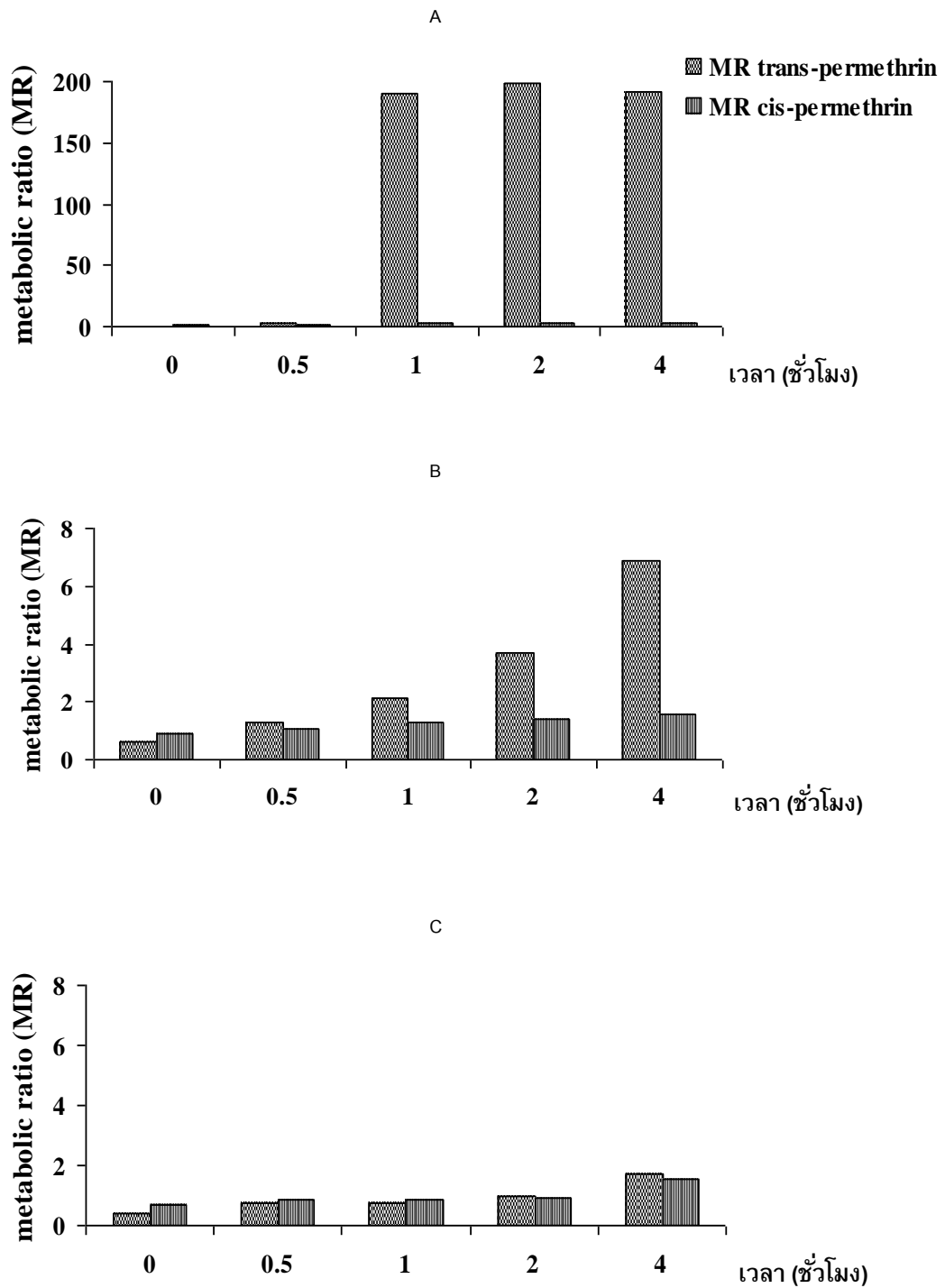
ในทำนองเดียวกัน เมื่อตั้งตัวอย่างเลือดที่มี permethrin ความเข้มข้นที่เท่ากันอยู่ด้วยที่อุณหภูมิ 4°C ค่า MR สำหรับ *trans*-permethrin มีค่าเพิ่มขึ้นตามเวลาที่ผ่านไป แต่มีค่าเพิ่มขึ้นน้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับที่อุณหภูมิห้อง (25°C) (รูปที่ 3.5B) เมื่อตั้งตัวอย่างเลือดที่อุณหภูมิ -20°C ค่า MR สำหรับ *trans*-permethrin มีค่าเพิ่มขึ้นตามเวลาเช่นกันโดยเพิ่มขึ้นน้อยที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับที่อุณหภูมิ 25°C และ 4°C (รูปที่ 3.5C) ค่า MR มีค่าสูงสุดที่เวลา 4 ชั่วโมง และค่า MR สำหรับ *trans*-permethrin ที่อุณหภูมิ 25°C มีค่าเป็น 29 และ 117 เท่า ของค่า MR ที่อุณหภูมิ 4°C และ -20°C ตามลำดับ

โดยปกติการทำกรทดลองมักทำที่อุณหภูมิห้องซึ่งมีอุณหภูมิประมาณ 25°C อาจสูงกว่าหรือต่ำกว่านี้เล็กน้อย แม้ว่าตัวอย่างเลือดจะถูกเก็บออกมาจากสัตว์ทดลองและนำไปปั่นแยกพลาสมาทันที ก็ยังมีการสูญเสียของ permethrin ไปบางส่วนซึ่งเป็นไปได้ว่าเกิดจากปฏิกิริยา hydrolysis โดยเอนไซม์ในเลือด ดังที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้น จากการทดลองนี้พบว่าค่า MR มีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาเพิ่มขึ้น ซึ่งหมายถึง การมีระดับของ phenoxybenzyl alcohol เพิ่มขึ้น นั่นก็คือมีการเกิด hydrolysis ของ permethrin และการที่ MR สำหรับ *trans*-permethrin สูงกว่า MR สำหรับ *cis*-permethrin ก็เป็นการแสดงให้เห็นว่า phenoxybenzyl alcohol เกิดจาก *trans*-isomer มากกว่า *cis*-isomer ดังนั้นผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า เมื่อตัวอย่างเลือดถูกตั้งทิ้งไว้ ยืนนานขึ้นก็ยิ่งทำให้เกิดการสูญเสีย permethrin ไปมากขึ้น ตั้งแต่เวลา 1 ชั่วโมงเป็นต้นไปการสูญเสีย permethrin เกิดขึ้นสูงสุด

อย่างไรก็ตามการตั้งตัวอย่างเลือดไว้ที่อุณหภูมิต่ำลง ในที่นี้คือ ที่ 4°C และ -20°C พบว่ายังคงมีการสูญเสีย permethrin เกิดขึ้นแต่น้อยลง และเมื่อตั้งไว้นานขึ้นการสูญเสียเกิดมากขึ้น ผลการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่าอุณหภูมิที่ลดลงไม่สามารถหยุดปฏิกิริยา hydrolysis ได้ เพียงแต่ช่วยชะลอการเกิดปฏิกิริยาให้ช้าลง ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Avramides (2005) ได้ศึกษาสถานะของการเก็บรักษาสารกำจัดแมลงต่างๆซึ่งรวมทั้ง permethrin ด้วยที่อุณหภูมิต่างกันคือ ที่อุณหภูมิห้อง (20°C), 4°C และ -20°C ตามลำดับ พบว่า permethrin เมื่อเก็บ

รักษาที่อุณหภูมิห้องใช้ระยะเวลาในการเก็บไว้ได้สั้นที่สุด การสูญเสีย permethrin ในการทดลองนี้ไม่น่าจะเป็นผลมาจากการถูกทำลายด้วยแสงสว่างเนื่องจากระหว่างทำการทดลองผู้ทดลองได้ป้องกันแสงสว่างด้วยการหุ้มหลอดทดลองทุกหลอดที่ใส่ตัวอย่างที่มี permethrin ด้วยอะลูมิเนียมฟอยล์

สำหรับการทดลองนี้จึงเลือกศึกษาอุณหภูมิต่ำในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ เนื่องจากการเพิ่มอุณหภูมิจะทำให้อัตราเร็วของปฏิกิริยาเอนไซม์เพิ่มขึ้น แต่ถ้าอุณหภูมิสูงมากเกินไปก็จะทำให้เอนไซม์ซึ่งเป็นโปรตีนนั้นเสียสภาพธรรมชาติไปเนื่องจากเอนไซม์เป็นโปรตีนที่มีโครงสร้างสามมิติที่สลับซับซ้อน โครงสร้างสามมิติของเอนไซม์จะคงรูปอยู่ได้ก็ต้องอาศัยแรงอย่างอ่อนของพันธะโคเวเลนต์ต่างๆ จำนวนมาก พันธะเหล่านี้ง่ายแก่การถูกทำลาย (พัชรา, 2541) และในการเพิ่มอุณหภูมียังทำให้สาร permethrin ไม่เสถียร

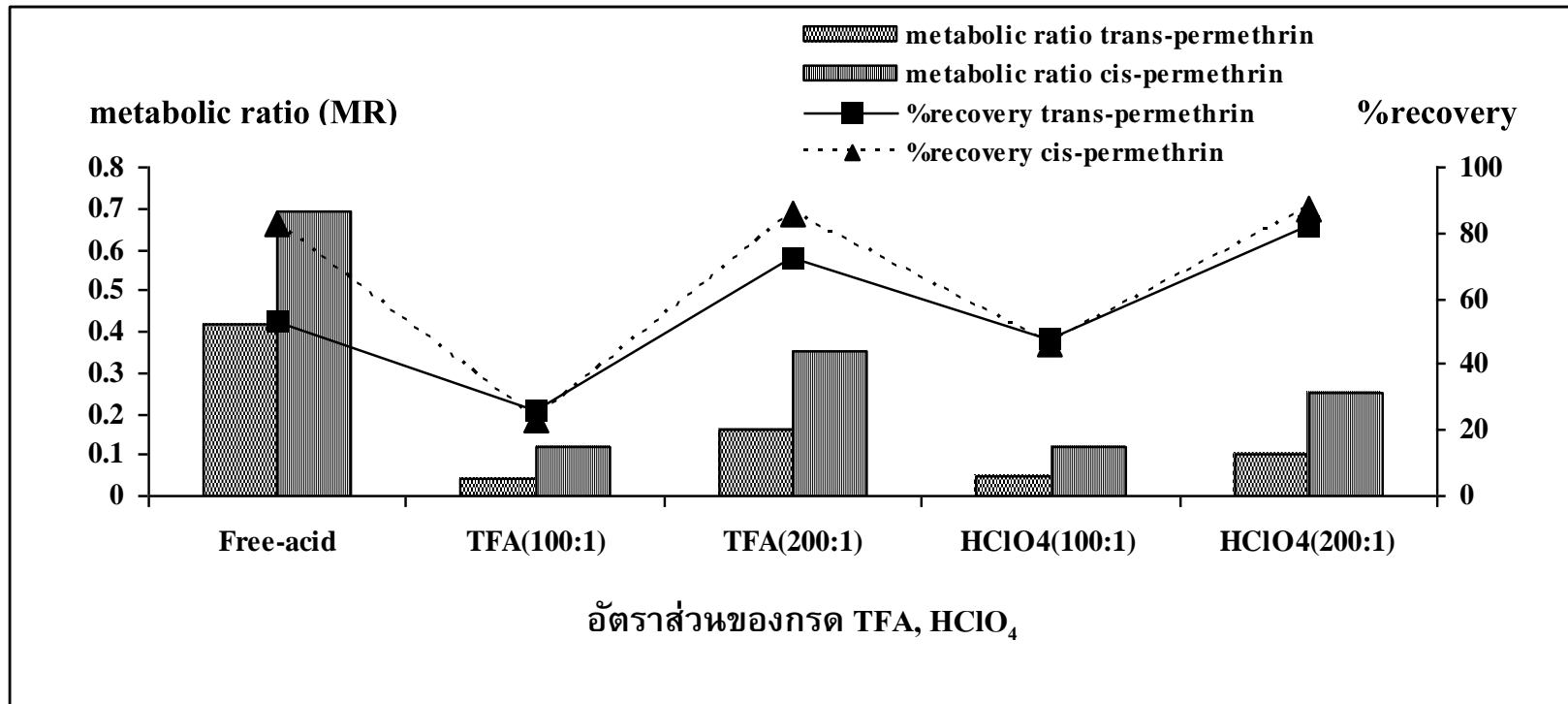


รูปที่ 3.5 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง metabolic ratio (MR) สำหรับ *trans*-permethrin ($MR_{trans\text{-permethrin}}$) และ *cis*-permethrin ($MR_{cis\text{-permethrin}}$) กับเวลาต่างๆ ที่อุณหภูมิ 25°C (A), 4°C (B) และ -20 °C (C); (3n)

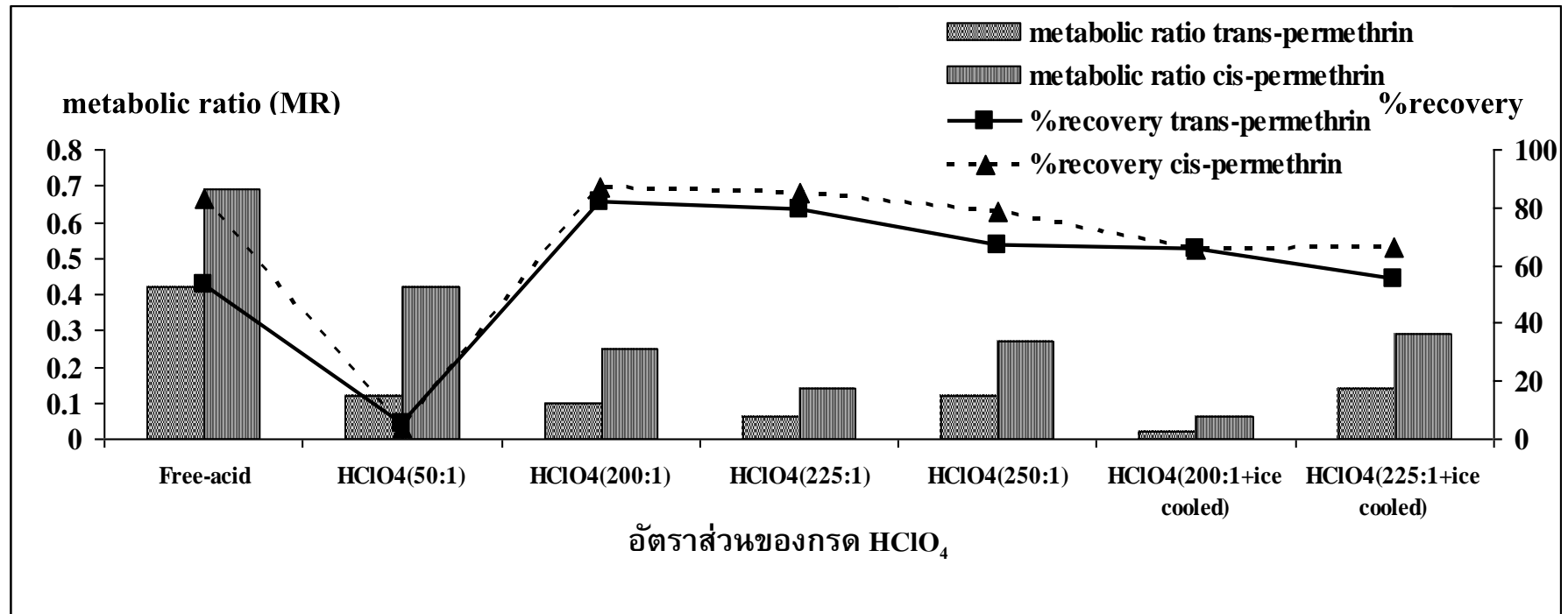
3.3.3 อิทธิพลของความเป็นกรด

ผลของการเติมกรด TFA และ HClO_4 ในอัตราส่วน 100:1 และ 200:1 ลงในตัวอย่างเลือดที่มีต่อ ค่า MR และค่าเปอร์เซ็นต์ร้อยละการคืนกลับของการสกัดแสดงดังรูปที่ 3.6 ค่า MR สำหรับทั้ง *trans*-permethrin และ *cis*-permethrin มีค่าลดลง หลังการเติมกรด TFA และ HClO_4 ลงในตัวอย่างเลือดเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างเลือดที่ไม่ได้เติมกรดทั้งสอง เมื่อเปรียบเทียบการเติมกรด TFA หรือ HClO_4 ในอัตราส่วน 100:1 พบว่าทำให้ค่า MR สำหรับ *trans*-permethrin และ *cis*-permethrin ต่ำกว่าการเติมกรดทั้งสองในอัตราส่วน 200:1 แต่ค่าเปอร์เซ็นต์ร้อยละการคืนกลับมีค่าต่ำกว่านั้นคือการเติมกรดในอัตราส่วน 200:1 ทำให้การสูญเสียสารไปในระหว่างการสกัดน้อยกว่าการเติมกรดในอัตราส่วน 100:1 การเติมกรด TFA 200:1 ทำให้ค่า MR มีค่าสูงกว่าเมื่อเติมกรด HClO_4 200:1 ดังนั้นชนิดของกรดที่น่าจะพิจารณาสำหรับการเติมลงในตัวอย่างเลือดน่าจะเป็น HClO_4 เพราะสามารถทำให้ค่า MR มีค่าน้อยและยังให้ประสิทธิภาพการสกัดที่ดี

เมื่อทดลองปรับอัตราส่วนของกรด HClO_4 ตั้งแต่ 50:1 ถึง 250:1 พบว่าด้วยอัตราส่วน 200:1 และ 225:1 ทำให้ค่า MR ของ permethrin มีค่าต่ำกว่าเมื่อเทียบกับอัตราส่วน 50:1 และ 250:1 (รูปที่ 3.7) จากผลการทดลองชี้ให้เห็นว่า การทำให้ตัวอย่างเลือดเป็นกรดช่วยชะลอการสูญเสีย permethrin ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของกรดและอัตราส่วนที่เติมลงไปซึ่งมีผลต่อความเป็นกรดในตัวอย่างเลือด อย่างไรก็ตามปัจจัยทั้งสองมีผลต่อประสิทธิภาพการสกัดด้วย เนื่องจากเอนไซม์ส่วนมากจะเร่งปฏิกิริยาได้ที่ pH ในช่วง 4-10 ถ้า pH ต่ำกว่า 4 และสูงกว่า 10 จะทำให้เอนไซม์ถูกยับยั้งเพราะเอนไซม์เสียสภาพธรรมชาติไปเนื่องจากโครงสร้างตติยภูมิของโปรตีนถูกทำลาย (พัชรา, 2541) ซึ่งจากการทดลองนี้ได้เลือกใช้ pH ในช่วงของกรดเนื่องจากสาร permethrin มีความเสถียรในสภาวะที่เป็นกรดมากกว่าในสภาวะที่เป็นเบส (Laskowski, 2002; Holmstead *et al.*, 1978) แต่ pH ที่จะเลือกใช้ก็ต้องคำนึงถึงความเหมาะสมในการสกัดด้วย เนื่องจากในการทดลองนี้ได้ใช้เทคนิคการสกัดแบบ solid phase extraction ซึ่งเลือกใช้ VertipakTM C₁₈ โดยมีความเหมาะสมสำหรับการสกัดตัวอย่างที่มี pH อยู่ในช่วง 2-9 ดังนั้นตัวอย่างเลือดจะต้องมี pH ที่อยู่ในช่วงระหว่าง 2-4 เพื่อที่จะทำให้ permethrin มีความเสถียรมากที่สุดรวมทั้งสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ carboxylesterase ได้ด้วย



รูปที่ 3.6 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างการทำตัวอย่างให้เป็นกรดด้วย TFA, HClO₄ ที่อัตราส่วน 100:1 และ 200:1 กับ metabolic ratio (MR) และค่าร้อยละของการกลับคืน (%recovery) ของ *trans*-permethrin และ *cis*-permethrin (2n)



รูปที่ 3.7 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างการทำตัวอย่างให้เป็นกรดด้วย HClO₄ ที่อัตราส่วน 50:1, 200:1, 225:1, 250:1, และ 200:1 และ 225:1 ร่วมกับการแช่ตัวอย่างในน้ำแข็ง (ice cooled) กับ metabolic ratio (MR) และ ค่าร้อยละของการกลับคืน (%recovery) ของ *trans*-permethrin และ *cis*-permethrin (2n)

3.3.4 อิทธิพลของความเป็นกรดร่วมกับการลดอุณหภูมิ

เมื่อเติมกรด HClO_4 ลงในตัวอย่างเลือดด้วยอัตราส่วน 200:1 และ 225:1 ร่วมกับการลดอุณหภูมิโดยการแช่ตัวอย่างเลือดในน้ำแข็ง พบว่าการเติมกรดด้วยอัตราส่วน 200:1 ร่วมกับการแช่ตัวอย่างเลือดในน้ำแข็งทำให้ค่า MR มีค่าต่ำที่สุด (< 0.1) (รูปที่ 3.7) ซึ่งต่ำกว่าการเติมกรดที่อัตราส่วนเดียวกัน หรือการลดอุณหภูมิเพียงอย่างเดียว ดังนั้นการทำสภาวะนี้จึงเป็นสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการชะลอการสลายตัวของ permethrin ในตัวอย่างเลือด

3.3.5 การประยุกต์วิธีการเตรียมตัวอย่างเลือดเพื่อใช้วัด permethrin และ phenoxybenzyl alcohol ในหนูขาว

จากการให้ permethrin แก่หนูในขนาด 215 mg/kg โดยการป้อนทางปาก และเก็บตัวอย่างเลือดที่เวลาต่างๆ ตั้งแต่ 0, 2, 3 และ 6 ชั่วโมง ตามลำดับ โดยที่ไม่ได้ทำการเตรียมตัวอย่างเลือดด้วยการเติมกรดร่วมกับการลดอุณหภูมิพบว่าไม่สามารถตรวจพบระดับของ *trans*-permethrin ในทุกตัวอย่างในแต่ละเวลาที่เก็บเลือด แต่ตรวจพบระดับของเมแทบอไลต์คือ phenoxybenzyl alcohol ในทุกตัวอย่าง (ตารางที่ 3.9) ระดับของ phenoxybenzyl alcohol มีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อเวลาผ่านไปนานขึ้นและพบมากที่สุดที่เวลา 6 ชั่วโมง ซึ่งมีความเข้มข้นเท่ากับ 88.41, 99.28 $\mu\text{g/mL}$ อาจเป็นไปได้ว่าเกิดปฏิกิริยา hydrolysis ของ permethrin โดยเอนไซม์ carboxylesterase ในตัวหนูเปลี่ยนไปเป็น phenoxybenzyl alcohol จนหมดหรืออาจจะเกิดปฏิกิริยา hydrolysis ของ permethrin โดยเอนไซม์ carboxyl esterase ในเลือดภายหลังจากการเก็บเลือดออกมาจากนอกตัวหนู ซึ่งเป็นขั้นตอนของการเตรียมตัวอย่างเลือดก่อนการวิเคราะห์ เป็นสาเหตุให้ไม่สามารถตรวจพบระดับของ *trans*-permethrin

หลังจากนั้นเมื่อทำการทดลองเช่นเดียวกับที่กล่าวแล้วมาข้างต้นโดยได้เพิ่มในส่วนของขั้นตอนการเติมกรด HClO_4 ลงในตัวอย่างเลือดด้วยอัตราส่วน 200:1 ร่วมกับการลดอุณหภูมิโดยการแช่ตัวอย่างเลือดในน้ำแข็ง หลังจากเก็บเลือดออกมาจากนอกตัวหนู พบว่าระดับของ *trans*-permethrin ในตัวอย่างเลือดที่เวลาเดียวกันสามารถตรวจพบ (ตารางที่ 3.9) นั่นก็แสดงให้เห็นว่าวิธีการทดลองนี้ในขั้นตอนของการเตรียมตัวอย่างเลือดก่อนการสกัดที่มีการทำตัวอย่างให้เป็นกรดร่วมกับการควบคุมอุณหภูมิของตัวอย่างให้ต่ำลง ซึ่งทำให้การสลายตัวของ permethrin ลดลง สามารถนำมาประยุกต์ใช้กับการเก็บตัวอย่างเลือดในสัตว์ทดลองหลังจากที่ได้รับสาร permethrin ได้

ซึ่งในทางนิติวิทยาศาสตร์นั้นมิจุดมุ่งหมายของการเก็บสิ่งส่งตรวจเพื่อต้องการให้ได้ผลการตรวจวิเคราะห์แสดงถึงสารที่ได้รับเข้าในร่างกาย และมีผลกระทบจนเป็นเหตุแห่งการตายที่แท้จริง หากสามารถแปรผลการวิเคราะห์บ่งบอกระดับยาหรือสารพิษในร่างกายก่อนเสียชีวิต อาจหมายถึงสาเหตุการตายในคดีได้ การเก็บสิ่งส่งตรวจเพื่อการวิเคราะห์จึงเป็นขั้นตอนที่

สำคัญมาก เพื่อให้ได้ผลการวิเคราะห์ที่ถูกต้อง ขอบเขตของกระบวนการเก็บตัวอย่างสิ่งส่งตรวจ จะต้องพิจารณาเป็นกรณีไป ต้องเลือกเก็บตัวอย่าง กำหนดปริมาณของสิ่งส่งตรวจ วิธีเก็บรักษาเพื่อการส่งตรวจ ในการรวบรวมของเหลวและตัวอย่างเนื้อเยื่อ ควรจะดำเนินการให้เร็วที่สุดเท่าที่จะเป็นไปได้ (ธีรินทร์, 2011)

ตารางที่ 3.9 ค่าความเข้มข้นของ *trans*-permethrin และ phenoxybenzyl alcohol ในตัวอย่างเลือดที่ไม่เติมกรดร่วมกับการรักษาอุณหภูมิและในตัวอย่างเลือดที่มีการเติมกรดร่วมกับการรักษาอุณหภูมิ หลังจากป้อน permethrin แก่หนูในขนาด 215 mg/kg (n=2)

เวลา เก็บเลือด (ชม.)	หนู ตัวที่	ตัวอย่างเลือดที่ไม่เติมกรด ร่วมกับการรักษาอุณหภูมิ		ตัวอย่างเลือดที่เติมกรด ร่วมกับการรักษาอุณหภูมิ	
		<i>trans</i> -permethrin (μ g/mL)	phenoxybenzyl alcohol (μ g/mL)	<i>trans</i> -permethrin (μ g/mL)	phenoxybenzyl alcohol (μ g/mL)
0	n1	-	-	-	-
	n2	-	-	-	-
2	n1	-	12.05	0.4	11.39
	n2	-	14.48	0.21	8.65
3	n1	-	17.83	0.67	25.31
	n2	-	22.18	0.97	15.02
6	n1	-	88.41	0.36	31.34
	n2	-	99.28	0.39	35.35

3.3.6 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ permethrin ในพลาสมา กับ เวลาในหนูขาว

จากผลการทดลองโดยเพิ่มปริมาณการให้ permethrin แก่หนูในขนาด 344 mg/kg โดยการป้อนทางปาก และเก็บตัวอย่างเลือดที่เวลาต่างๆ ตั้งแต่ 0, 1, 2, 3, 6, 12 และ 24 ชั่วโมง ตามลำดับ ซึ่งในขั้นตอนของการเก็บตัวอย่างเลือดนั้นได้มีการเติมกรด HClO_4 ลงในตัวอย่างเลือดที่อัตราส่วน 200:1 ร่วมกับการลดอุณหภูมิโดยการแช่ตัวอย่างเลือดในน้ำแข็งผลการทดลองพบว่าระดับของ *trans*-permethrin เพิ่มขึ้น (ตารางที่ 3.10) เมื่อเปรียบเทียบที่เวลาเดียวกันกับการให้ permethrin แก่หนูในขนาด 215 mg/kg โดยการป้อนทางปาก ดังนั้นจะเห็นได้ว่าการตรวจพบปริมาณสาร permethrin ที่มีระดับเพิ่มขึ้นนั้นมีความสอดคล้องกันกับปริมาณสาร permethrin ที่หนูได้รับ

จากรูปที่ 3.8 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเวลากับความเข้มข้นของ *trans*-permethrin ในตัวอย่างเลือดที่มีการเก็บตัวอย่างเลือดโดยการเติมกรดรวมกับการรักษาอุณหภูมิ หลังจากให้ permethrin แก่หนูในขนาด 344 mg/kg โดยการป้อนทางปาก พบว่าเมื่อเวลาผ่านไประดับของ permethrin ในเลือดเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ และมีค่าสูงสุดที่เวลา 3 ชั่วโมง หลังจากได้รับสาร ซึ่งสอดคล้องกับในรายงานการวิจัยของ Anadon และคณะ (1991) ที่ได้มีการศึกษาเภสัชจลนศาสตร์ของ permethrin ในหนูขาว พบว่าเวลาที่ความเข้มข้นของระดับ permethrin ในเลือดมีค่าสูงสุด (T_{\max}) เท่ากับ 3.52 ชั่วโมง หลังจากได้รับ permethrin ทางปากในขนาด 460 mg/kg หลังจากนั้นปริมาณของ permethrin ก็จะลดลงเรื่อยๆ จนมีค่าต่ำสุดที่เวลา 24 ชั่วโมง นั้นก็แสดงให้เห็นว่า permethrin ได้ถูกเมแทบอลิซึมโดยเอนไซม์ carboxylesterase ที่อยู่ในตัวหนูเปลี่ยนไปเป็นเมแทบอลิท์ (phenoxybenzyl alcohol) ก่อนที่จะขับออกจากร่างกาย

ดังนั้นข้อมูลที่ได้จากการทดลองนี้ทำให้ทราบระดับของ permethrin ในเลือดที่เวลาต่างๆ ซึ่งข้อมูลทางเภสัชจลนศาสตร์นี้มีความจำเป็นและมีประโยชน์อย่างมากในการนำไปประยุกต์ใช้ในทางการแพทย์โดยที่ในด้านทางการแพทย์จะเน้นเกี่ยวกับการวินิจฉัยและการรักษาอาการของความเป็นพิษในผู้ที่ได้รับสารกำจัดแมลง permethrin ส่วนด้านกฎหมายจะเน้นเรื่องความสัมพันธ์ระหว่างเหตุและผลของการได้รับสารพิษนั้นไม่ว่าจะโดยตั้งใจหรือโดยบังเอิญ ทั้งนี้จะต้องอาศัยกระบวนการตรวจวิเคราะห์ทางพิษวิทยาอย่างละเอียดเพื่อมุ่งให้ได้ความจริงเกี่ยวกับการตรวจพบสารพิษที่สงสัยและปริมาณของสารพิษที่ตรวจพบ โดยจะทำการตรวจวิเคราะห์จากตัวอย่างที่เป็นวัตถุพยานทางชีวภาพ เช่น เลือด ปัสสาวะ ของเหลวในกระเพาะอาหาร เนื้อเยื่อต่าง ๆ และจากวัตถุพยานอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้อง

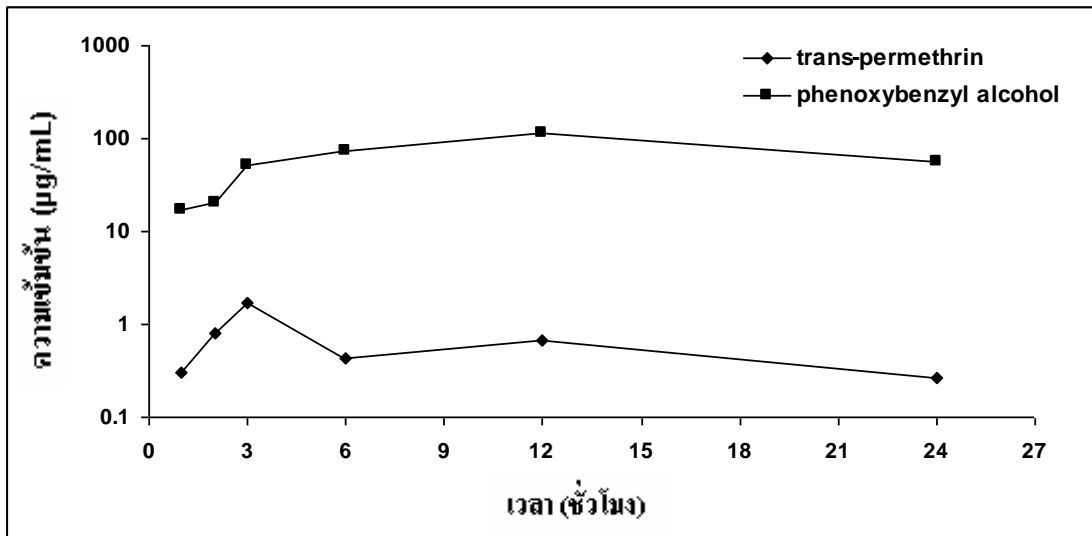
สำหรับในทางนิติวิทยาศาสตร์การตายของมนุษย์อาจมาจากสาเหตุตามธรรมชาติหรือฆาตกรรมซึ่งแยกออกเป็นการตายด้วยอาวุธ ด้วยสารเคมี เป็นต้น เมื่อมีเหตุที่น่าสงสัยเกี่ยวข้องกับความตายของบุคคลซึ่งอาจเชื่อมโยงกับสารพิษ จะต้องมีการเก็บของเหลวหรือชิ้นส่วน

อวัยวะที่อาจปนเปื้อนสารพิษไปให้นักพิษวิทยาค้นหา สารเคมีที่ไม่ควรมีอยู่ในร่างกายหรือมีเกินกว่ามาตรฐาน จนเป็นเหตุให้เกิดอันตรายถึงชีวิต เช่น สารดีดีที สารหนู และอื่น ๆ การใช้ยาบางชนิดเกินขนาดมาตรฐานอาจฆ่าคนได้ไม่ว่าด้วยเจตนาหรือไม่ก็ตาม ถ้ามีการใช้ผิดคน ผิดโอกาส ระดับการใช้และสภาพแวดล้อมของคนตาย นักพิษวิทยาจะบอกได้ว่า สารพิษดังกล่าวเข้าไปอยู่ในร่างกายโดยเจตนาหรือไม่ จากการวิเคราะห์สารเคมี ระดับของสารนั้น เป็นต้น ความตายของบางคนถ้าดูภายนอก ไม่อาจบ่งบอกได้ว่าสาเหตุการตายคืออะไร หากตรวจสารพิษในร่างกายอาจพบสาเหตุได้จากเคมีในร่างกายเท่านั้น ดังนั้น การเก็บของเหลว เนื้อเยื่อจากศพเพื่อตรวจสารพิษอย่างมีมาตรฐาน จะช่วยคลี่คลายคดีได้มากขึ้น

พิษวิทยามีบทบาทสำคัญในการสืบสวนสอบสวนทางคดีทั้งในคนที่ยังมีชีวิตอยู่และในคนที่เสียชีวิตแล้ว โดยเฉพาะกรณีเกี่ยวกับการตายผิดธรรมชาติเนื่องจากการตรวจวิเคราะห์ทางด้านพิษวิทยาทำให้ทราบสาเหตุการตายหรือปัจจัยส่งเสริมที่เป็นเหตุแห่งการตายนั้นเป็นผลมาจากยาต่าง ๆ หรือสารชนิดอื่นหรือไม่ หรือว่าไม่มีส่วนเกี่ยวข้องกันเลย กระบวนการทางด้านพิษวิทยาจึงประกอบด้วย 3 ขั้นตอนหลัก คือ 1) ขั้นตอนการเก็บตัวอย่างเพื่อส่งตรวจทางห้องปฏิบัติการอย่างถูกวิธีและในปริมาณที่เหมาะสมรวมทั้งการติดสลากกระป๋องละเอียดที่เกี่ยวข้องอย่างถูกต้องและชัดเจน 2) ขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการด้วยเทคนิคที่เหมาะสมและมีประสิทธิภาพซึ่งห้องปฏิบัติการพิษวิทยาสามารถตรวจวิเคราะห์วัตถุพยานชีวภาพต่าง ๆ ทั้งที่เป็นของเหลวที่เป็นส่วนประกอบของร่างกาย ได้แก่ เลือด ปัสสาวะ น้ำลูกตา น้ำดี น้ำไขสันหลัง น้ำอสุจิ และเนื้อเยื่อต่าง ๆ เช่น ตับ ไต สมอง ม้าม ฯลฯ เพื่อตรวจหาสารพิษต่าง ๆ ได้อย่างถูกต้องแม่นยำ 3) ขั้นตอนการแปลผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการเมื่อผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการสามารถระบุได้ว่าตรวจพบยาหรือสารพิษต่าง ๆ หรือไม่แล้ว นักนิติพิษวิทยาจะพิจารณาและให้ความเห็นว่า ยาหรือสารพิษที่ตรวจพบนั้นมีปริมาณมากพอที่จะเป็นสาเหตุหรือปัจจัยส่งเสริมการตายหรือไม่ เนื่องจากผลของยาและสารพิษอาจออกฤทธิ์ต่างกันในแต่ละบุคคล และยังมีขึ้นอยู่กับปัจจัยอื่น ๆ ด้วย เช่น สุขภาพร่างกายโดยทั่วไป อายุ และเพศของบุคคลนั้น การทำปฏิกิริยาระหว่างสารหลายชนิดที่พบร่วมกัน ปริมาณที่ร่างกายได้รับ วิธีการที่ร่างกายได้รับ โดยอาจได้รับเข้าสู่ร่างกายทางปาก ทางการหายใจ ทางการฉีดเข้าหลอดเลือด หรือทางผิวหนังและยังขึ้นอยู่กับอัตราเร็วของการได้รับสารเหล่านั้นด้วยการแปลผลจึงค่อนข้างยากและซับซ้อนอยู่บ้าง ซึ่งต้องอาศัยความรู้ ความเชี่ยวชาญ และประสบการณ์ทางด้านพิษวิทยาอย่างมากด้วย (สุภาวรรณ, 2552)

ตารางที่ 3.10 ค่าความเข้มข้นของ *trans*-permethrin และ phenoxybenzyl alcohol ในตัวอย่างเลือดที่ไม่เติมกรดร่วมกับ채น้ำแข็งและในตัวอย่างเลือดที่มีการเติมกรดร่วมกับการ채น้ำแข็ง หลังจากให้ permethrin แก่หนูในขนาด 344 mg/kg โดยการป้อนทางปาก

เวลา เก็บเลือด (ชม.)	ตัวอย่างเลือดที่ไม่เติมกรด ร่วมกับการรักษาอุณหภูมิ		ตัวอย่างเลือดที่เติมกรด ร่วมกับการรักษาอุณหภูมิ	
	<i>trans</i> -permethrin (μ g/mL)	phenoxybenzyl alcohol (μ g/mL)	<i>trans</i> -permethrin (μ g/mL)	phenoxybenzyl alcohol (μ g/mL)
0	-	-	-	-
1	-	21.49	0.3	17.02
2	-	38.12	0.66	20.74
3	-	79.08	0.79	50.57
6	-	87.11	0.43	53.37
12	-	130.17	0.7	112.85
24	-	71.36	< LLOQ	56.48



รูปที่ 3.8 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเวลากับความเข้มข้นของ *trans*-permethrin และ phenoxybenzyl alcohol ในตัวอย่างเลือดที่เดิมกรวดรวมกับการแช่น้ำแข็ง หลังจากให้ permethrin แก่หนูในขนาด 344 mg/kg โดยการป้อนทางปาก

บทที่ 4

บทสรุปและข้อเสนอแนะ

4.1 บทสรุป

ในงานวิจัยนี้ได้ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อความเสถียรของ permethrin ในตัวอย่างเลือด ศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิและระยะเวลาโดยตั้งตัวอย่างเลือดไว้ที่อุณหภูมิ 25, 4 และ -20 °C เป็นระยะเวลา 0, 0.5, 1, 2 และ 4 ชั่วโมง ตามลำดับ พบว่าค่า metabolic ratio ของ trans- และ cis-permethrin มีค่ามากขึ้นเมื่อเวลาผ่านไป และมีค่าต่ำสุดที่อุณหภูมิ -20 °C การศึกษาอิทธิพลของกรด TFA (100:1 และ 200:1) และ HClO₄ (50:1, 100:1, 200:1, 225:1 และ 250:1) และอิทธิพลของกรด HClO₄ (200:1 และ 225:1) ร่วมกับการแช่ตัวอย่างเลือดในน้ำแข็งพบว่าการเติมกรด HClO₄ อัตราส่วน 200:1 ร่วมกับการแช่ตัวอย่างเลือดในน้ำแข็งทำให้มีค่า metabolic ratio ต่ำที่สุด

จากการทดลองพบว่าที่อุณหภูมิที่คงที่การสูญเสีย permethrin ที่อยู่ในตัวอย่างเลือดเพิ่มขึ้นเมื่อตั้งตัวอย่างไว้เป็นระยะเวลานานขึ้น การสูญเสียลดลงเมื่ออุณหภูมิลดลง และทำตัวอย่างให้เป็นกรด การสูญเสีย permethrin ต่ำที่สุดเมื่อทำตัวอย่างให้เป็นกรดร่วมกับการควบคุมอุณหภูมิของตัวอย่างให้ต่ำลง ดังนั้นในขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างเลือดก่อนการสกัดและวิเคราะห์ permethrin ควรควบคุมสภาวะให้เหมาะสมที่สุดเพื่อให้ permethrin ในตัวอย่างเลือดมีความเสถียรมากที่สุด

นอกจากนี้วิธีการเตรียมตัวอย่างนี้สามารถนำมาประยุกต์ใช้จริงในสัตว์ทดลองได้โดยมีการให้ permethrin แก่หนูในขนาด 215 mg/kg และ 344 mg/kg โดยการป้อนทางปาก และเก็บตัวอย่างเลือดซึ่งมีขั้นตอนของการเตรียมตัวอย่างเลือดก่อนการสกัด หลังจากนั้นนำไปวิเคราะห์พบว่าสามารถตรวจพบระดับของ trans-permethrin ในตัวอย่างเลือด ซึ่งเป็นประโยชน์อย่างมากในทางนิติวิทยาศาสตร์โดยมีจุดมุ่งหมายของการเก็บสิ่งส่งตรวจเพื่อต้องการให้ได้ผลการตรวจวิเคราะห์แสดงถึงสารที่ได้รับเข้าในร่างกาย และมีผลกระทบจนเป็นเหตุแห่งการตายที่แท้จริง ถ้าหากสามารถแปรผลการวิเคราะห์บ่งบอกระดับยาหรือสารพิษในร่างกายก่อนเสียชีวิต อาจหมายถึงสาเหตุการตายในคดีได้ การเก็บสิ่งส่งตรวจเพื่อการวิเคราะห์จึงเป็นขั้นตอนที่สำคัญมาก เพื่อให้ได้ผลการวิเคราะห์ที่ถูกต้อง

สำหรับการวิเคราะห์ permethrin ในตัวอย่างเลือดใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงซึ่งเป็นเทคนิคที่ง่าย มีความไวสูง ความเที่ยงและความถูกต้องของการวิเคราะห์สามารถยอมรับได้ ต้นทุนในการวิเคราะห์ไม่สูงมากนักและช่วยให้งานที่วิเคราะห์เป็นประจำเร็วขึ้น เทคนิคนี้น่าจะเป็นประโยชน์ต่องานวิเคราะห์ของห้องปฏิบัติการและหน่วยงานที่เกี่ยวข้อง

4.2 ข้อเสนอแนะ

4.2.1 ในขั้นตอนของการเตรียมตัวอย่างก่อนการสกัดโดยการหยุดปฏิกิริยา hydrolysis ในตัวอย่างเลือดนั้นควรมีการทดลองหาตัวยับยั้งที่สามารถหยุดปฏิกิริยาได้ทั้งหมด เพื่อที่จะทำให้สามารถตรวจพบระดับของ permethrin ได้อย่างถูกต้องมากยิ่งขึ้น

4.2.2 สาร permethrin สามารถสลายตัวได้อย่างรวดเร็วเมื่ออยู่ในตัวอย่างเลือด ทำให้ในการตรวจวิเคราะห์นั้นบางครั้งมีการตรวจพบในระดับที่ต่ำมากหรืออาจจะไม่สามารถตรวจพบได้เลย ดังนั้นเทคนิคในการวิเคราะห์ควรมีความไวที่สูงโดยอาจจะเลือกใช้การวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Mass Spectrometry หรือหาวิธีการสกัดที่สามารถทำให้ได้ร้อยละการคืนกลับมากที่สุด และทำให้ตัวอย่าง clean มากที่สุดเพื่อกำจัดพีครบกวนสารที่เราสนใจ

บรรณานุกรม

- ธีรินทร์ สินไชย. 2011. การเก็บตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ทางพิษวิทยา. [ออนไลน์] เข้าถึงได้จาก: http://www.ifm.go.th/2010/index.php?option=com_content&view=article&id=39:toxicology-articles&catid=27:new-to-joomla&Itemid=67 (วันที่สืบค้น 2 มกราคม 2554)
- พัชรา วีระกะลัส. 2541. เอนไซม์. ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- มนตรี จุฬาวัฒนทล, ชัยณัฐสร สวัสดิวัฒน์, ยงยุทธ ยุทธวงศ์, ภิญโญ พานิชพันธ์, ประหยัด โกมารทัต, พิณทิพ รื่นวงษา, ธีรยศ วิทิตสุวรรณกุล, บุรชัย สอนยานนท์, สุมาลี ตั้งประดับกุล และ มธุรส พงษ์ลิขิตมงคล. 2542. ชีวเคมี.
- สุภาณี พิมพ์สมาน. 2540. สารฆ่าแมลง. พิมพ์ครั้งที่ 2 . ภาควิชากีฏวิทยา คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- สุภาวรรณ เศรษฐบรรจง. 2552. พิษวิทยากับการชันสูตรพลิกศพ. ภาควิชานิติเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล: กรุงเทพฯ.
- อรัญญ์ งามผ่องใส. 2547. สารเคมีควบคุมศัตรูพืช. ภาควิชาการจัดการศัตรูพืช คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- Abu-Qare, A. W. and Abou-Donia, M. B. 2000. Simultaneous determination of pyridostigmine bromide, N,N-diethyl-m-toluamide, permethrin, and their metabolites in rat plasma and urine by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B* **749**: 171-178.
- Abu-Qare, A. W. and Abou-Donia, M. B. 2001. Simultaneous determination of malathion, permethrin, DEET (N,N-diethyl-m-toluamide), and their metabolites in rat plasma and urine using high-performance liquid chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **26**: 291-299.

- Afridi, I. A. K., Parveen, Z. and Masud, S. Z. 2001. Stability of organophosphate and pyrethroid pesticides on wheat in storage. *Journal of Stored Products Research* **37**: 199-204.
- Anadon, A., Martinez-Larranaga, M. R., Diaz, M. J. and Bringas, P. 1991. Toxicokinetics of permethrin in the rat. *Toxicology And Applied Pharmacology* **110**: 1–8.
- Angerer, J. and Ritter, A. 1997. Determination of metabolites of pyrethroids in human urine using solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography B* **695**: 217-226.
- Arrebola, J. F., Martinez-Vidal, L. J., Gutierrez, F. A. and Akhtar, H. M. 1999. Monitoring of pyrethroid metabolites in human urine using solid-phase extraction followed by gas chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* **401**: 45-54.
- Avramides, E. J. 2005. Long-term stability of pure standards and stock standard solutions for the determination of pesticide residues using gas chromatography. *Journal of Chromatography A* **1080**: 166-176.
- Blaylock, B. L., Abdel-Nasser, M., Mccarty, S. M., Knesel, J. A., Tolson, K. M., Ferguson, P. W. and Mehendale, H. M. 1995. Suppression of cellular immune responses in BALB/c mice following oral exposure to permethrin. *Environmental Contamination Toxicology* **54**: 768-774.
- Caroline, C. 1998. Insecticide factsheet (permethrin). *Journal of Pesticide* **18**: 14-20.
- Choi, J., Rose, R. L. and Hodgson, E. 2002. In vitro human metabolism of permethrin: the role of human alcohol and aldehyde dehydrogenases. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **73**: 117-128.

- Crow, J. A., Borazjani, A., Potter, P. M. and Ross, M. K. 2007. Hydrolysis of pyrethroids by human and rat tissues: Examination of intestinal, liver and serum carboxylesterases. *Toxicology and Applied Pharmacology* **221**: 1-12.
- Djeridane, A., Brunel, J. M., Vidal, N., Yousfi, M., Ajandouz, E. H. and Stocker, P. 2008. Inhibition of porcine liver carboxylesterase by a new flavone glucoside isolated from *Deverra scoparia*. *Chemo-Biological Interactions* **172**: 22-26.
- Eil, C. and Nisula, B. C. 1990. The binding properties of pyrethroids to human skin fibroblast androgen receptors and to sex hormone binding globulin. *Journal of Steroid Biochem* **35**: 409-414.
- El-Touky, M. A., Ebied, S. A., Hassan, A. A. and El-Sewedy, S. M. 1989. In vivo studies on the effect of some insecticides on the hepatic activities of L-tryptophan 2,3-dioxygenase and pyridoxal phosphokinase of male mice. *Journal of Environmental Science Health B* **3**: 265-276.
- FDA 2001. Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation of Food and Drug Administration in U.S. 1-22.
- Garcia, E., Garcia, A. and Barbas, C. 2001. Validated HPLC method for quantifying permethrin in pharmaceutical formulations. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **24**: 999-1004.
- Hengel, M. J., Mower, C. R. and Shibamoto, T. 1997. New method for analysis of pyrethroid insecticides: Esfenvalerate, cis-Permethrin, and trans-permethrin, in Surface Waters Using Solid-Phase extraction and Gas Chromatography. *Environmental Contamination and Toxicology* **59**: 171-178.

- Hicks, L. D., Hyatt, J. L., Moak, T., Edwards, C. C., Tsurkan, L., Wierdl, M., Ferreira, A. M., Wadkins, R. M. and Potter, P. M. 2007. Analysis of the inhibition of mammalian carboxylesterases by novel fluorobenzoins and fluorobenzils. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* **15**: 3801-3817.
- Holmstead, R. L., Casida, J. E., Ruzo, L. O. and Fullmer, D. G. 1978. Pyrethroid Photodecomposition: Permethrin. *Journal Agriculture Food Chemistry* **26**: 590-595.
- Hosokawa, M. 2008. Structure and Catalytic Properties of Carboxylesterase Isozymes Involved in Metabolic Activation of Prodrugs. *Molecules* **13**: 412-431.
- Huang, Z., Li, Y., Chen, B. and Tao, S. 2007. Simultaneous determination of 102 pesticide residues in Chinese teas by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography B* **853**: 154-162.
- Junting, L. and Chuichang, F. 1991. Solid phase extraction method for rapid isolation and clean-up of some synthetic pyrethroid insecticides from human urine and plasma. *Forensic Science International* **51**: 89-93.
- Kocourek, V., Hajslova, J., Holadova, K. and Poustka, J. 1998. Stability of pesticides in plant extracts used as calibrants in the gas chromatographic analysis of residues. *Journal of Chromatography A* **800**: 297-304.
- Laskowski, D. A. 2002. Physical and chemical properties of pyrethroids. *Environmental Contamination and Toxicology* **174**: 49-170.
- Lee, S., Gan, J. and Kabashima, J. 2002. Recovery of synthetic pyrethroids in water samples during storage and extraction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**: 7194-7198.

- Leng, G. and Gries, W. 2005. Simultaneous determination of pyrethroid and pyrethrin metabolites in human urine by gas chromatography-high resolution mass spectrometry. *Journal of Chromatography B* **814**: 285-294.
- Nakamura, Y., Sugihara, K., Sone, T., Isobe, M., Ohta, S. and Kitamura, S. 2007. The *in vivo* metabolism of a pyrethroid insecticide, permethrin, its hydrolysis products in rats. *Toxicology* **235**: 176-184.
- Ogata-kawata, H., Matsuda, M., Onda, N., Ueyama, J., Kamijima, M., Shibata, E., Ogawa, M. and Endo, Y. 2007. Direct analysis of permethrin human blood by SPE-GC/MS. *Chromatography* **28**(3): 119-124.
- Peters, F. T. and Maurer, H. H. 2002. Bioanalytical method validation and its implications for forensic and clinical toxicology-A review. *Accreditation and Quality Assurance* **7**: 441-449.
- Ramadan, A. A., Bakry, N. M., Marei, A. M., Eldefrawi, A. T. and Eldefrawi, M. E. 1998. Actions of pyrethroids on the peripheral benzodiazepine receptor. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **32**: 106-113.
- Ray, D. E. and Forshaw, P. J. 2000. Pyrethroid Insecticides: Poisoning Syndromes, Synergies, and Therapy. *Clinical Toxicology* **38**: 95-101.
- Ray, D. E. 2001. Pyrethroid Insecticides: Mechanisms of Toxicity, Systemic Poisoning Syndromes, Paresthesia, and Therapy. *MRC Applied Neuroscience Group* 1289-1303.
- Ramesh, A. and Ravi, E. P. 2004. Electron ionization gas chromatography-mass spectrometric determination of residues of thirteen pyrethroid insecticides in whole blood. *Journal of Chromatography B* **802**: 371-376.

- Ross, M. K., Borazjani, A., Edwards, C. C. and Potter, P. M. 2006. Hydrolytic metabolism of pyrethroids by human and other mammalian carboxylesterase. *Biochemical Pharmacology* 657-669.
- Satoh, T. and Hosokawa, M. 2006. Structure, function and regulation of carboxylesterases. *Chemico-Biological Interactions* **162**: 195-211.
- Sharom, M. S. and Solomon K. R. 1981a. Adsorption-desorption, degradation, and distribution of permethrin in aqueous systems. *Journal Agriculture Food Chemistry* **29**: 1122-1125.
- Sharom, M. S. and Solomon K. R. 1981b. Adsorption and desorption of permethrin and other pesticides on glass and plastic materials used in bioassay procedures. *Journal Fish Aquatic Science* **29**: 1122-1125.
- Soderlund, D. M., Clark, J. M., Sheets, L. P., Mullin, L. S., Piccirillo, V. J., Sargent, D., Stevens, J. T. and Weiner, M. L. 2002. Mechanisms of pyrethroid neurotoxicity : implications for cumulative risk assessment. *Toxicology* **171**: 3-59.
- Sogorb, M. A. and Vilanova, E. 2002. Enzymes involved in the detoxification of organophosphorus, carbamate and pyrethroid insecticides through hydrolysis. *Toxicology Letters* **128**: 215-228.
- Stok, J. E., Huang, H., Jones, P. D., Wheelock, C. E., Morisseau, C. and Hammock, B. D. 2004. Identification, Expression, and Purification of a Pyrethroid-hydrolyzing Carboxylesterase from Mouse Liver Microsomes. *Journal of Biological Chemistry* **278**: 29863-29869.
- Tateno, C., Ito, S., Tanaka, M. and Yoshitake, A. 1993. Effects of pyrethroid insecticides on gap junctional intercellular communications in Balb/c3T3 cells by dye transfer assay. *Cell Biology and Toxicology* **9**: 215-222.

- Ueyama, J., Hirose, N., Mochizuki, A., Kimata, A., Kamijima, M., Kondo, T., Takagi, Kenji., Wakusawa, S. and Hasegawa, T. 2010. Toxicokinetics of pyrethroid metabolites in male and female rats. *Environmental Toxicology and Pharmacology* **30**: 88-91.
- Wang, I. H., Moorman, R. and Burleson, J. 2003. Isocratic reversed-phase liquid chromatographic method for the simultaneous determination of (S)-metoprene, MGK264, piperonyl butoxide, sumithrin and permethrin in pesticide formulation. *Journal of Chromatography A* **983**: 145-152.
- Wang, D., Weston, D. P. and Lydy, M. J. 2009. Method development for the analysis of organophosphate and pyrethroid insecticides at low parts per trillion levels in water. *Talanta* **78**: 1345-1351.
- Wheelock, C. E., Shan, G. and Ottea, J. 2005. Overview of Carboxylesterases and Their Role in the Metabolism of Insecticides. *Journal of Pesticide Science* **30** (2): 75-83.
- Wolansky, M. J. and Harrill, J. A. 2008. Neurobehavioral toxicology of pyrethroids in adult animals: A critical review. *Neurotoxicology and Teratology* **30**: 55-78.
- Yoshida, T. 2009. Simultaneous determination of 18 pyrethroids in indoor air by gas chromatography/mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **1216**: 5069-5076.
- Zhang, J. G. and Fariss, M. W. 2002. Thenoyltrifluoroacetone, a potent inhibitor of carboxylesterase activity. *Biochemical Pharmacology* **63**: 751-754.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

การตรวจสอบความถูกต้องของวิธี (Method validation) สำหรับวิเคราะห์ trans-permethrin และ phenoxybenzyl alcohol ในพลาสมา
 ตารางที่ 1 ช่วงและความเป็นเส้นตรง (linearity) ของวิธี สำหรับวิเคราะห์ permethrin ในพลาสมา

Concentration of trans-permethrin (μ g/mL)	N	t_r (min)	Peak area of trans-permethrin (mAU)			
			Individual	Mean	S.D.	%RSD
0.2	1	8.079	7.84	9.34	1.29	14.02
	2	8.083	10.13			
	3	8.085	8.7			
	4	8.088	10.67			
1.25	1	8.077	48.02	59.86	8.19	13.68
	2	8.082	62.66			
	3	8.085	61.85			
	4	8.089	66.89			
2.5	1	8.076	98.59	109.82	9.14	8.32
	2	8.084	108.29			
	3	8.086	120.71			
	4	8.089	111.69			

ตารางที่ 1 ช่วงและความเป็นเส้นตรง (Linearity) ของวิธี สำหรับวิเคราะห์ trans-permethrin ในพลาสมา (ต่อ)

Concentration of trans-permethrin (μ g/mL)	N	t_R (min)	Peak area of trans-permethrin (mAU)			
			Individual	Mean	S.D.	%RSD
5	1	8.077	239.35	235.59	26.62	11.29
	2	8.084	197.56			
	3	8.087	246.45			
	4	8.088	258.99			
7.5	1	8.082	373.01	391.78	16.61	4.25
	2	8.082	393.69			
	3	8.087	387.38			
	4	8.088	413.05			
10	1	8.082	503.87	513.54	9.67	1.88
	2	8.082	509.04			
	3	8.086	514.86			
	4	8.090	526.39			

ตารางที่ 2 ช่วงและความเป็นเส้นตรง (linearity) ของวิธี สำหรับวิเคราะห์ phenoxybenzyl alcohol ในพลาสมา

Concentration of phenoxybenzyl alcohol (μ g/mL)	N	t_R (min)	Peak area (mAU)			
			Individual	Mean	S.D.	%RSD
0.7	1	2.656	41.96	62.94	7.63	12.12
	2	2.662	67.37			
	3	2.663	63.53			
	4	2.663	68.86			
2	1	2.655	157.45	175.67	12.82	7.29
	2	2.662	176.37			
	3	2.659	182.46			
	4	2.662	186.38			
20	1	2.654	1674.82	1744.15	74.99	4.29
	2	2.662	1696.16			
	3	2.663	1764.83			
	4	2.663	1840.78			
80	1	2.655	6973.06	6697.77	758.51	11.32
	2	2.663	5598.11			
	3	2.664	6885.04			
	4	2.662	7334.86			

ตารางที่ 2 ช่วงและความเป็นเส้นตรง (linearity) ของวิธี สำหรับวิเคราะห์ phenoxybenzyl alcohol ในพลาสมา (ต่อ)

Concentration of phenoxybenzyl alcohol (μ g/mL)	N	t_R (min)	Peak area (mAU)			
			Individual	Mean	S.D.	%RSD
100	1	2.660	8171.17	8454.94	247.67	2.93
	2	2.661	8329.72			
	3	2.661	8613.7			
	4	2.662	8705.16			
160	1	2.662	13430.6	13468.7	150.81	1.12
	2	2.662	13360.5			
	3	2.663	13392.9			
	4	2.663	13690.8			

ตารางที่ 3 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถคำนวณปริมาณได้อย่างถูกต้องและแม่นยำ (lower limit of quantification, LLOQ) ของ phenoxybenzyl alcohol ในพลาสมา

Concentration (μ g/mL)	N	Peak area (mAU)		S/N
		Phenoxybenzyl alcohol	Blank plasma	
0.7	1	77.26	11.99	6.4
	2	76.18	13.06	5.83
	3	75.91	13.65	5.56
Mean		76.45	12.9	5.93

ตารางที่ 4 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถคำนวณปริมาณได้อย่างถูกต้องและแม่นยำ (lower limit of quantification, LLOQ) ของ trans-permethrin และ cis-permethrin ในพลาสมา

Concentration(ug/mL)	N	Peak area (mAU)					
		Tran-permethrin	Blank plasma	S/N	Cis-permethrin	Blank plasma	S/N
0.2	1	7.98	1.1	7.25	3.61	0.81	4.46
	2	9.9	1.7	5.8	2.3	2.1	1.1
	3	10.5	1.8	5.8	2.4	2.3	1.04
Mean		9.46	1.53	6.28	2.77	1.74	2.2

ตารางที่ 5 ค่าความเที่ยงภายในวันเดียวกัน (Intra-day) ของวิธีสำหรับการวิเคราะห์ trans-permethrin ในพลาสมา

Concentration of trans-permethrin (μ g/mL)	N	t_R (min)	Peak area (mAU)			
			Individual	Mean	S.D.	%RSD
0.2	1	8.030	9.28	9.63	0.39	4.05
	2	8.034	9.57			
	3	8.031	10.05			
1	1	8.032	48.14	46.71	4.18	8.94
	2	8.033	52.00			
	3	8.034	49.98			
4	1	8.075	189.25	203.61	20.30	9.97
	2	8.076	217.96			
	3	8.075	193.11			
8	1	8.077	401.91	393.26	7.49	1.90
	2	8.075	389.11			
	3	8.076	388.75			

ตารางที่ 6 ค่าความเที่ยงภายในวันเดียวกัน (Intra-day) ของวิธีสำหรับการวิเคราะห์ phenoxybenzyl alcohol ในพลาสมา

Concentration of phenoxybenzyl alcohol (μ g/mL)	N	t_R (min)	Peak area (mAU)			
			Individual	Mean	S.D.	%RSD
0.7	1	2.634	62.20	61.07	2.42	3.96
	2	2.633	58.29			
	3	2.636	62.71			
10	1	2.638	899.46	892.29	6.53	0.73
	2	2.637	886.70			
	3	2.638	890.70			
50	1	2.658	4376.84	4316.28	55.78	1.29
	2	2.657	4266.99			
	3	2.657	4305.02			
150	1	2.660	12173.5	12355.03	230.89	1.87
	2	2.658	12276.7			
	3	2.660	12614.9			

ตารางที่ 7 ค่าความแม่นยำภายในวันเดียวกัน (Intra-day) ของวิธีสำหรับการวิเคราะห์ trans-permethrin ในพลาสมา

Concentration of trans-permethrin (μ g/mL)	N	t_R (min)	Peak area (mAU)			Measured concentration (μ g/mL)	%DEV
			Individual	Mean	S.D.		
0.2	1	8.030	9.28	9.63	0.39	0.21	5.00
	2	8.034	9.57				
	3	8.031	10.05				
1	1	8.032	48.14	46.71	4.18	1.07	7.00
	2	8.033	52.00				
	3	8.034	49.98				
4	1	8.075	189.25	203.61	20.30	4.39	9.75
	2	8.076	217.96				
	3	8.075	193.11				
8	1	8.077	401.91	393.26	7.49	8.08	1.00
	2	8.075	389.11				
	3	8.076	388.75				

ตารางที่ 8 ค่าความแม่นยำภายในวันเดียวกัน (Intra-day) ของวิธีสำหรับการวิเคราะห์ phenoxybenzyl alcohol ในพลาสมา

Concentration of phenoxybenzyl alcohol (μ g/mL)	N	t_R (min)	Peak area (mAU)			Measured concentration (μ g/mL)	%DEV
			Individual	Mean	S.D.		
0.7	1	2.634	62.20	61.07	2.42	0.73	4.28
	2	2.633	58.29				
	3	2.636	62.71				
10	1	2.638	899.46	892.29	6.53	10.37	3.69
	2	2.637	886.70				
	3	2.638	890.70				
50	1	2.658	4376.84	4316.28	55.78	50.06	0.12
	2	2.657	4266.99				
	3	2.657	4305.02				
150	1	2.660	12173.5	12355.03	230.89	154.85	3.23
	2	2.658	12276.7				
	3	2.660	12614.9				

ตารางที่ 9 ค่าความเที่ยงระหว่างวัน (Inter-day) ของวิธีสำหรับการวิเคราะห์ trans-permethrin ในพลาสมา

Concentration of trans-permethrin (μ g/mL)	Day	N	t_r (min)	Peak area (mAU)			
				Individual	Mean	S.D.	%RSD
0.2	1	1	8.030	9.28	10.03	1.36	13.56
	2	2	8.062	11.60			
	3	3	8.061	9.2			
1	1	1	8.032	48.14	47.95	4.05	8.45
	2	2	8.065	51.90			
	3	3	8.058	43.8			
4	1	1	8.075	193.11	178.87	12.47	6.97
	2	2	8.064	169.9			
	3	3	8.060	173.6			
8	1	1	8.076	388.75	365.42	30.28	8.29
	2	2	8.067	376.31			
	3	3	8.061	331.20			

ตารางที่ 10 ค่าความเที่ยงระหว่างวัน (Inter-day) ของวิธีสำหรับการวิเคราะห์ phenoxybenzyl alcohol ในพลาสมา

Concentration of phenoxybenzyl alcohol (μ g/mL)	Day	N	t_r (min)	Peak area (mAU)			
				Individual	Mean	S.D.	%RSD
0.7	1	1	2.634	62.20	64.23	3.61	5.62
	2	2	2.647	68.4			
	3	3	2.643	62.10			
10	1	1	2.638	899.46	882.92	20.27	2.29
	2	2	2.648	860.30			
	3	3	2.643	889.00			
50	1	1	2.657	4305.02	4276.44	101.51	2.37
	2	2	2.649	4360.6			
	3	3	2.643	4163.70			
150	1	1	2.660	12614.9	12555.17	228.43	2.29
	2	2	2.650	12302.80			
	3	3	2.642	12747.80			

ตารางที่ 11 ค่าความแม่นยำระหว่างวัน (Inter-day) ของวิธีสำหรับการวิเคราะห์ trans-permethrin ในพลาสมา

Concentration of trans-permethrin (μ g/mL)	Day	N	t_R (min)	Peak area (mAU)			Measured concentration (μ g/mL)	%DEV
				Individual	Mean	S.D.		
0.2	1	1	8.030	9.28	10.03	1.36	0.22	1.00
	2	2	8.062	11.60				
	3	3	8.061	9.2				
1	1	1	8.032	48.14	47.94	4.05	1.10	1.00
	2	2	8.065	51.90				
	3	3	8.058	43.8				
4	1	1	8.075	193.11	178.87	12.47	4.12	3.00
	2	2	8.064	169.9				
	3	3	8.060	173.6				
8	1	1	8.076	388.75	365.42	30.28	8.43	5.38
	2	2	8.067	376.31				
	3	3	8.061	331.20				

ตารางที่ 12 ค่าความแม่นยำระหว่างวัน (Inter-day) ของวิธีสำหรับการวิเคราะห์ phenoxybenzyl alcohol ในพลาสมา

Concentration of phenoxybenzyl alcohol (μ g/mL)	Day	N	t_R (min)	Peak area (mAU)			Measured concentration (μ g/mL)	%DEV
				Individual	Mean	S.D.		
0.7	1	1	2.634	62.20	64.23	3.61	0.77	10.00
	2	2	2.647	68.40				
	3	3	2.643	62.10				
10	1	1	2.638	899.46	882.92	20.27	10.26	2.60
	2	2	2.648	860.30				
	3	3	2.643	889.00				
50	1	1	2.657	4305.02	4276.44	101.51	49.59	-0.80
	2	2	2.649	4360.60				
	3	3	2.643	4163.70				
150	1	1	2.660	12614.90	12555.17	228.43	157.17	5.13
	2	2	2.650	12302.80				
	3	3	2.642	12747.80				

ตารางที่ 13 ร้อยละของการคืนกลับ (%recovery) ของวิธี สำหรับวิเคราะห์ trans-permethrin ในพลาสมา

Concentration of trans-permethrin (μ g/mL)	N	Direct injection		After extraction		Recovery		
		t_r (min)	Peak area (mAU)	t_r (min)	Peak area (mAU)	Individual	Mean	S.D.
0.2	1	8.029	12.03	8.030	9.28	77.14	77.03	2.79
	2	8.029	12.90	8.034	9.57	74.19		
	3	8.028	12.60	8.031	10.05	79.76		
1	1	8.030	64.07	8.032	48.14	75.14	78.16	3.34
	2	8.029	67.66	8.033	52.00	77.61		
	3	8.030	61.14	8.034	49.98	81.75		
4	1	8.077	248.69	8.075	189.25	76.10	78.66	5.52
	2	8.086	256.46	8.076	217.96	84.99		
	3	8.085	257.89	8.075	193.11	74.88		
8	1	8.085	506.29	8.077	401.91	79.38	77.33	1.77
	2	8.085	510.03	8.075	389.11	76.29		
	3	8.084	509.28	8.076	388.75	76.33		

ตารางที่ 14 ร้อยละของการคืนกลับ (%recovery) ของวิธี สำหรับวิเคราะห์ phenoxybenzyl alcohol ในพลาสมา

Concentration of phenoxybenzyl alcohol (μ g/mL)	N	Direct injection		After extraction		Recovery		
		t_r (min)	Peak area (mAU)	t_r (min)	Peak area (mAU)	Individual	Mean	S.D.
0.7	1	2.624	69.92	2.634	62.20	88.96	86.78	4.22
	2	2.631	71.16	2.633	58.29	81.91		
	3	2.633	70.10	2.636	62.71	89.46		
10	1	2.633	1057.58	2.638	899.46	85.05	85.05	0.07
	2	2.635	1043.46	2.637	886.70	84.98		
	3	2.634	1046.41	2.638	890.70	85.12		
50	1	2.653	5127.97	2.658	4376.84	85.35	82.4	2.73
	2	2.660	5336.76	2.657	4266.99	79.95		
	3	2.663	5256.51	2.657	4305.02	81.90		
150	1	2.660	14588.5	2.660	12173.5	83.45	85.66	2.25
	2	2.660	14344.11	2.658	12276.7	85.59		
	3	2.662	14345	2.660	12614.9	87.94		

ภาคผนวก ข

การศึกษาความเสถียรของ permethrin ในตัวอย่างเลือด

ตารางที่ 15 พื้นที่ใต้กราฟ ของ trans-permethrin, cis- permethrin และ phenoxybenzyl alcohol ที่อยู่ในตัวทำละลายอินทรีย์ (acetonitrile) กับ ในตัวอย่างเลือด

Sample	N	Peak area (mAU)			สัดส่วน trans:cis-permethrin
		Trans-permethrin	Cis-permethrin	Phenoxybenzyl alcohol	
permethrin ในตัวทำละลาย (base line)	1	2887.07	1111.96	-	2.54
	2	2828.34	1088.44	-	
	3	2811.79	1159.77	-	
	mean	2842.40	1120.06	-	
	SD	39.56	36.35	-	
permethrin ในตัวอย่างเลือด (control)	1	1190.50	808.99	747.59	1.65
	2	1456.64	803.87	653.35	
	3	1550.18	931.41	645.94	
	Mean	1399.11	848.09	682.29	
	SD	186.61	72.20	56.66	

ตารางที่ 16 พื้นที่ใต้กราฟและค่า metabolic ratio (MR) สำหรับ trans-permethrin ($MR_{\text{trans-permethrin}}$) และ cis-permethrin ($MR_{\text{cis-permethrin}}$) กับเวลาต่างๆ ที่ อุณหภูมิ 25 °C, 4 °C และ -20 °C

Sample	N	Peak area (mAU)			Metabolic ratio (MR)	
		Phenoxybenzyl alcohol	Trans-permethrin	Cis-permethrin	Trans-permethrin	Cis-permethrin
Standard permethrin 50 ug/mL อุณหภูมิ 25 °C (0 ชั่วโมง)	1	564.30	1174.42	722.68	0.45	0.81
	2	625.03	1524.20	856.09		
	3	770.71	1671.29	832.84		
	Mean	653.35	1456.64	803.87		
	SD	106.08	255.23	71.27		
Standard permethrin 50 ug/mL อุณหภูมิ 25 °C (0.5 ชั่วโมง)	1	618.70	221.84	553.07	3.21	1.52
	2	1134.49	349.02	712.65		
	3	1109.54	320.26	622.96		
	Mean	954.24	297.04	629.56		
	SD	290.86	66.69	79.99		
Standard permethrin 50 ug/mL อุณหภูมิ 25 °C (1 ชั่วโมง)	1	1372.40	6.41	507.10	190.39	2.15
	2	1559.89	7.98	525.13		
	3	1448.65	8.62	663.82		
	Mean	1460.31	7.67	565.35		
	SD	94.29	1.14	85.75		

ตารางที่ 16 พื้นที่ใต้กราฟและค่า metabolic ratio (MR) สำหรับ trans-permethrin ($MR_{\text{trans-permethrin}}$) และ cis-permethrin ($MR_{\text{cis-permethrin}}$) กับเวลาต่างๆ ที่ อุณหภูมิ 25 °C, 4 °C และ -20 °C (ต่อ)

Sample	N	Peak area (mAU)			Metabolic ratio (MR)	
		Phenoxybenzyl alcohol	Trans-permethrin	Cis-permethrin	Trans-permethrin	Cis-permethrin
Standard permethrin 50 ug/mL อุณหภูมิ 25 °C (2 ชั่วโมง)	1	1213.97	5.63	502.96	199.01	2.60
	2	1446.36	9.39	548.12		
	3	1579.79	6.37	577.72		
	Mean	1413.37	7.13	542.93		
	SD	185.13	1.99	37.65		
Standard permethrin 50 ug/mL อุณหภูมิ 25 °C (4 ชั่วโมง)	1	1687.02	6.73	495.19	191.64	3.37
	2	1292.91	6.72	418.48		
	3	1464.11	9.80	282.78		
	Mean	1481.35	7.73	398.82		
	SD	197.62	1.78	107.56		
Standard permethrin 50 ug/mL อุณหภูมิ 4 °C (0 ชั่วโมง)	1	674.21	877.58	712.62	0.63	0.92
	2	802.79	1039.56	885.67		
	3	765.76	1654.37	828.68		
	Mean	747.59	1190.50	808.99		
	SD	66.19	409.80	88.19		

ตารางที่ 16 พื้นที่ใต้กราฟและค่า metabolic ratio (MR) สำหรับ trans-permethrin ($MR_{\text{trans-permethrin}}$) และ cis-permethrin ($MR_{\text{cis-permethrin}}$) กับเวลาต่างๆ ที่ อุณหภูมิ 25 °C, 4 °C และ -20 °C (ต่อ)

Sample	N	Peak area (mAU)			Metabolic ratio (MR)	
		Phenoxybenzyl alcohol	Trans-permethrin	Cis-permethrin	Trans-permethrin	Cis-permethrin
Standard permethrin 50 ug/mL อุณหภูมิ 4 °C (0.5 ชั่วโมง)	1	728.67	714.66	853.54	1.29	1.08
	2	886.56	707.57	828.07		
	3	1056.63	645.09	782.16		
	Mean	890.62	689.11	821.26		
	SD	164.02	38.28	36.17		
Standard permethrin 50 ug/mL อุณหภูมิ 4 °C (1 ชั่วโมง)	1	923.52	524.69	836.97	2.11	1.30
	2	1092.14	521.77	868.98		
	3	1275	511.95	821.88		
	Mean	1096.89	519.47	842.61		
	SD	175.79	6.67	24.05		
Standard permethrin 50 ug/mL อุณหภูมิ 4 °C (2 ชั่วโมง)	1	877.20	324.41	817.53	3.69	1.42
	2	1158.35	254.37	722.05		
	3	1312	327.32	821.82		
	Mean	1115.85	302.03	787.13		
	SD	220.49	41.30	56.65		

ตารางที่ 16 พื้นที่ใต้กราฟและค่า metabolic ratio (MR) สำหรับ trans-permethrin ($MR_{\text{trans-permethrin}}$) และ cis-permethrin ($MR_{\text{cis-permethrin}}$) กับเวลาต่างๆ ที่ อุณหภูมิ 25 °C, 4 °C และ -20 °C (ต่อ)

Sample	N	Peak area (mAU)			Metabolic ratio (MR)	
		Phenoxybenzyl alcohol	Trans-permethrin	Cis-permethrin	Trans-permethrin	Cis-permethrin
Standard permethrin 50 ug/mL อุณหภูมิ 4 °C (4 ชั่วโมง)	1	1042.78	214.22	839.55	6.88	1.54
	2	1373.94	185.61	869.52		
	3	1357.24	148.99	743.82		
	Mean	1257.99	182.94	817.63		
	SD	186.56	32.69	65.65		
Standard permethrin 50 ug/mL อุณหภูมิ -20 °C (0 ชั่วโมง)	1	632.16	1879.68	1063.49	0.41	0.69
	2	659.70	1401.63	877.9		
	3	645.95	1369.23	852.85		
	Mean	645.94	1550.18	931.4133		
	SD	13.77	285.81	131.23		
Standard permethrin 50 ug/mL อุณหภูมิ -20 °C (0.5 ชั่วโมง)	1	777.25	1208.99	1208.99	0.74	0.87
	2	899.28	1022.14	944.44		
	3	832.52	1181.63	960.93		
	Mean	836.35	1137.587	1137.59		
	SD	61.11	100.91	28.86		

ตารางที่ 16 พื้นที่ใต้กราฟและค่า metabolic ratio (MR) สำหรับ trans-permethrin ($MR_{\text{trans-permethrin}}$) และ cis-permethrin ($MR_{\text{cis-permethrin}}$) กับเวลาต่างๆ ที่อุณหภูมิ 25 °C, 4 °C และ -20 °C (ต่อ)

Sample	N	Peak area (mAU)			Metabolic ratio (MR)	
		Phenoxybenzyl alcohol	Trans-permethrin	Cis-permethrin	Trans-permethrin	Cis-permethrin
Standard permethrin 50 ug/mL อุณหภูมิ -20 °C (1 ชั่วโมง)	1	943.58	1146.65	1036.84	0.77	0.86
	2	999.32	1337.43	1337.43		
	3	986.91	1300.00	1177.29		
	Mean	976.60	1261.36	1141.79		
	SD	26.26	101.89	123.33		
Standard permethrin 50 ug/mL อุณหภูมิ -20 °C (2 ชั่วโมง)	1	1069.21	995.28	1028.21	0.99	0.94
	2	890.25	970.00	1057.95		
	3	956.98	969.69	1008.30		
	Mean	972.15	978.32	1031.49		
	SD	90.44	14.69	21.03		
Standard permethrin 50 ug/mL อุณหภูมิ -20 °C (4 ชั่วโมง)	1	1008.08	574.89	649.47	1.69	1.53
	2	932.34	567.11	639.29		
	3	979.06	590.00	618.40		
	Mean	973.16	577.33	635.72		
	SD	38.21	11.64	7.19		

ตารางที่ 17 พื้นที่ใต้กราฟและ metabolic ratio (MR) ของ trans-permethrin และ cis-permethrin ในตัวอย่างที่ทำให้เป็นกรดด้วย TFA ที่อัตราส่วน 100:1, 200:1 กรด HClO₄ ที่อัตราส่วน 50:1, 100:1, 200:1, 225:1, 250:1, และกรด HClO₄ ที่อัตราส่วน 200:1 และ 225:1 ร่วมกับการแช่ตัวอย่างในน้ำแข็ง (ice cooled)

Sample	N	Peak area (mAU)			Metabolic ratio (MR)	
		Trans-permethrin	Cis-permethrin	Phenoxybenzyl alcohol	Trans-permethrin	Cis-permethrin
Control	1	1456.64	803.87	653.35	0.43	0.76
	2	1550.18	931.41	645.94		
	mean	1503.41	867.64	649.65		
	SD	66.14	90.18	5.24		
TFA 100:1	1	724.67	247.66	32.53	0.04	0.12
	2	767.18	268.87	28.05		
	mean	745.925	258.27	30.29		
	SD	30.06	14.99	3.17		
TFA 200:1	1	2013.83	959.64	432.28	0.16	0.35
	2	2161.42	942.37	234.47		
	mean	2087.63	951.01	333.38		
	SD	104.36	12.21	139.87		

ตารางที่ 17 พื้นที่ใต้กราฟและ metabolic ratio (MR) ของ trans-permethrin และ cis-permethrin ในตัวอย่างที่ทำให้เป็นกรดด้วย TFA ที่อัตราส่วน 100:1, 200:1 กรด HClO₄ ที่อัตราส่วน 50:1, 100:1, 200:1, 225:1, 250:1, และกรด HClO₄ ที่อัตราส่วน 200:1 และ 225:1 ร่วมกับการแช่ตัวอย่างในน้ำแข็ง (ice cooled) (ต่อ)

Sample	N	Peak area (mAU)			Metabolic ratio (MR)	
		Trans-permethrin	Cis-permethrin	Phenoxybenzyl alcohol	Trans-permethrin	Cis-permethrin
HClO ₄ 50:1	1	100.44	27.26	17.96	0.12	0.42
	2	201.63	60.25	18.47		
	mean	151.04	43.755	18.22		
	SD	71.55	23.33	0.36		
HClO ₄ 100:1	1	1440.15	538.85	66.32	0.05	0.12
	2	1302	490.12	58.00		
	mean	1371.08	514.49	62.16		
	SD	97.69	34.46	5.88		
HClO ₄ 200:1	1	2467.62	935.99	250.07	0.1	0.25
	2	2265.2	1005.39	229.62		
	mean	2366.41	970.69	239.85		
	SD	143.13	49.07	14.46		

ตารางที่ 17 พื้นที่ใต้กราฟและ metabolic ratio (MR) ของ trans-permethrin และ cis-permethrin ในตัวอย่างที่ทำให้เป็นกรดด้วย TFA ที่อัตราส่วน 100:1, 200:1 กรด HClO₄ ที่อัตราส่วน 50:1, 100:1, 200:1, 225:1, 250:1, และกรด HClO₄ ที่อัตราส่วน 200:1 และ 225:1 ร่วมกับการแช่ตัวอย่างในน้ำแข็ง (ice cooled) (ต่อ)

Sample	N	Peak area (mAU)			Metabolic ratio (MR)	
		Trans-permethrin	Cis-permethrin	Phenoxybenzyl alcohol	Trans-permethrin	Cis-permethrin
HClO ₄ 225:1	1	2292.17	942.50	132.13	0.06	0.14
	2	2197.59	876.11	126.98		
	mean	2244.88	909.31	129.56		
	SD	66.88	46.94	3.64		
HClO ₄ 250:1	1	1922.5	872.03	236.76	0.12	0.27
	2	1872.46	716.17	208.12		
	mean	1897.48	794.10	222.44		
	SD	35.38	110.21	20.25		
HClO ₄ 200:1+ice cooled	1	1899.70	727.90	45.00	0.02	0.06
	2	1762.51	682.19	38.15		
	mean	1831.11	705.05	41.58		
	SD	97.01	32.32	4.84		

ตารางที่ 17 พื้นที่ใต้กราฟและ metabolic ratio (MR) ของ trans-permethrin และ cis-permethrin ในตัวอย่างที่ทำให้เป็นกรดด้วย TFA ที่อัตราส่วน 100:1, 200:1 กรด HClO₄ ที่อัตราส่วน 50:1, 100:1, 200:1, 225:1, 250:1, และกรด HClO₄ ที่อัตราส่วน 200:1 และ 225:1 ร่วมกับการแช่ตัวอย่างในน้ำแข็ง (ice cooled) (ต่อ)

Sample	N	Peak area (mAU)			Metabolic ratio (MR)	
		Trans-permethrin	Cis-permethrin	Phenoxybenzyl alcohol	Trans-permethrin	Cis-permethrin
HClO ₄ 225:1+ice cooled	1	1594.2	738.30	216.80	0.14	0.29
	2	1403.11	614.98	197.35		
	mean	1498.655	676.64	207.08		
	SD	135.1210348	87.20	13.75		

ตารางที่ 18 พื้นที่ใต้กราฟและค่าการคืนกลับ (%recovery) ของ trans-permethrin และ cis-permethrin ในตัวอย่างที่ทำให้เป็นกรดด้วย TFA ที่อัตราส่วน 100:1, 200:1 กรด HClO₄ ที่อัตราส่วน 50:1, 100:1, 200:1, 225:1, 250:1, และกรด HClO₄ ที่อัตราส่วน 200:1 และ 225:1 ร่วมกับการแช่ตัวอย่างในน้ำแข็ง (ice cooled)

Sample	N	Peak area (mAU)			%recovery	
		Trans-permethrin	Cis-permethrin	Phenoxybenzyl alcohol	Trans-permethrin	Cis-permethrin
Control	1	1456.64	803.87	653.35	53	83
	2	1550.18	931.41	645.94		
	mean	1503.41	867.64	649.65		
	SD	66.14	90.18	5.24		

ตารางที่ 18 พื้นที่ใต้กราฟและค่าการคืนกลับ (%recovery) ของ trans-permethrin และ cis-permethrin ในตัวอย่างที่ทำให้เป็นกรดด้วย TFA ที่อัตราส่วน 100:1, 200:1 กรด HClO₄ ที่อัตราส่วน 50:1, 100:1, 200:1, 225:1, 250:1, และกรด HClO₄ ที่อัตราส่วน 200:1 และ 225:1 ร่วมกับการแช่ตัวอย่างในน้ำแข็ง (ice cooled) (ต่อ)

Sample	N	Peak area (mAU)			%recovery	
		Trans-permethrin	Cis-permethrin	Phenoxybenzyl alcohol	Trans-permethrin	Cis-permethrin
TFA 100:1	1	724.67	247.66	32.53	25.84	23.23
	2	767.18	268.87	28.05		
	mean	745.925	258.27	30.29		
	SD	30.06	14.99	3.17		
TFA 200:1	1	2013.83	959.64	432.28	72.31	85.52
	2	2161.42	942.37	234.47		
	mean	2087.63	951.01	333.38		
	SD	104.36	12.21	139.87		
HClO ₄ 50:1	1	100.44	27.26	17.96	5.21	3.91
	2	201.63	60.25	18.47		
	mean	151.04	43.755	18.22		
	SD	71.55	23.33	0.36		

ตารางที่ 18 พื้นที่ใต้กราฟและค่าการคืนกลับ (%recovery) ของ trans-permethrin และ cis-permethrin ในตัวอย่างที่ทำให้เป็นกรดด้วย TFA ที่อัตราส่วน 100:1, 200:1 กรด HClO₄ ที่อัตราส่วน 50:1, 100:1, 200:1, 225:1, 250:1, และกรด HClO₄ ที่อัตราส่วน 200:1 และ 225:1 ร่วมกับการแช่ตัวอย่างในน้ำแข็ง (ice cooled) (ต่อ)

Sample	N	Peak area (mAU)			%recovery	
		Trans-permethrin	Cis-permethrin	Phenoxybenzyl alcohol	Trans-permethrin	Cis-permethrin
HClO ₄ 100:1	1	1440.15	538.85	66.32	47.49	46.27
	2	1302	490.12	58.00		
	mean	1371.08	514.49	62.16		
	SD	97.69	34.46	5.88		
HClO ₄ 200:1	1	2467.62	935.99	250.07	81.97	87.3
	2	2265.2	1005.39	229.62		
	mean	2366.41	970.69	239.85		
	SD	143.13	49.07	14.46		
HClO ₄ 225:1	1	2292.17	942.50	132.13	79.39	84.76
	2	2197.59	876.11	126.98		
	mean	2244.88	909.31	129.56		
	SD	66.88	46.94	3.64		

ตารางที่ 18 พื้นที่ใต้กราฟและค่าการคืนกลับ (%recovery) ของ trans-permethrin และ cis-permethrin ในตัวอย่างที่ทำให้เป็นกรดด้วย TFA ที่อัตราส่วน 100:1, 200:1 กรด HClO₄ ที่อัตราส่วน 50:1, 100:1, 200:1, 225:1, 250:1, และกรด HClO₄ ที่อัตราส่วน 200:1 และ 225:1 ร่วมกับการแช่ตัวอย่างในน้ำแข็ง (ice cooled) (ต่อ)

Sample	N	Peak area (mAU)			%recovery	
		Trans-permethrin	Cis-permethrin	Phenoxybenzyl alcohol	Trans-permethrin	Cis-permethrin
HClO ₄ 250:1	1	1922.5	872.03	236.76	66.59	78.42
	2	1872.46	716.17	208.12		
	mean	1897.48	794.10	222.44		
	SD	35.38	110.21	20.25		
HClO ₄ 200:1+ice cooled	1	1899.70	727.90	45.00	65.80	65.46
	2	1762.51	682.19	38.15		
	mean	1831.11	705.05	41.58		
	SD	97.01	32.32	4.84		
HClO ₄ 225:1+ice cooled	1	1594.2	738.30	216.80	55.22	66.40
	2	1403.11	614.98	197.35		
	mean	1498.655	676.64	207.08		
	SD	135.1210348	87.20	13.75		

ภาคผนวก ค

วิธีการสกัด permethrin และ phenoxybenzyl alcohol ในตัวอย่างเลือดและตัวอย่างปัสสาวะ

ตารางที่ 19 เปอร์เซ็นต์การคืนกลับ (%recovery) ของวิธีการสกัดแบบ solid-phase extraction

วิธี การสกัด	การเตรียมตัวอย่าง	การเตรียม cartridges			%recovery		
		precondition	Wash	elute	phenoxybenzyl alcohol	trans- permethrin	cis- permethrin
1	สารละลายมาตรฐาน 100 µL เติมน้ำรีม 100 µL และกรดอะซิติก 1 N ปริมาตร 60 µL ผสมให้เข้ากัน หมุนเหวี่ยง 1000 g เป็นเวลา 5 นาที เก็บส่วนใสชั้นบน	acetonitrile 3 mL	H ₂ O 3 mL	acetonitrile 3 mL	61.59	34.06	27.05
2	สารละลายมาตรฐาน 20 µL เติมน้ำรีม 180 µL และกรดอะซิติก 1 N ปริมาตร 60 µL เขย่าให้เข้ากันเป็นเวลา 30 วินาที	chloroform 1 mL methanol 1 mL methanol:H ₂ O (1:1) 1 mL H ₂ O 1 mL (อย่างละ 2 ครั้ง)	H ₂ O 1 mL (2 ครั้ง)	chloroform 1 mL methylene chloride 1 mL (อย่างละ 2 ครั้ง)	125.67	80.13	-
3	สารละลายมาตรฐาน 20 µL เติมน้ำรีม 180 µL และกรดอะซิติก 1 N ปริมาตร 60 µL เขย่าให้เข้ากันเป็นเวลา 30 วินาที	chloroform 1 mL methanol 1 mL methanol:H ₂ O (1:1) 1 mL H ₂ O 1 mL (อย่างละ 2 ครั้ง)	H ₂ O 1 mL (2 ครั้ง)	chloroform 1 mL methyl t-butyl ether 1 mL (อย่างละ 2 ครั้ง)	92.24	57.85	-

ตารางที่ 19 เปอร์เซ็นการคืนกลับ (%recovery) ของวิธีการสกัดแบบ solid-phase extraction (ต่อ)

วิธี การสกัด	การเตรียมตัวอย่าง	การเตรียม cartridges			%recovery		
		precondition	wash	elute	phenoxybenzyl alcohol	trans- permethrin	cis- permethrin
4	สารละลายมาตรฐาน 20 µL เติมซีรัม 180 µL และกรดอะซิติก 1 N ปริมาตร 60 µL ผสมให้เข้ากันเป็นเวลา 30 วินาที	chloroform 1 mL methanol 1 mL methanol:H ₂ O (1:1) 1 mL H ₂ O 1 mL 2 (อย่างละ 2 ครั้ง)	H ₂ O 1 mL (2 ครั้ง)	isopropanol 1 mL (2 ครั้ง)	919.19	66.44	-
5	สารละลายมาตรฐาน 20 µL เติมซีรัม 180 µL และกรดอะซิติก 1 N ปริมาตร 60 µL	chloroform 1 mL methanol 1 mL methanol:H ₂ O (1:1) 1 mL H ₂ O 1 mL	H ₂ O 1 mL	chloroform 2 mL	114	50.22	30
6	สารละลายมาตรฐาน 100 µL เติมซีรัม 100 µL และกรดอะซิติก 1 N ปริมาตร 60 µL ผสมให้เข้ากันหมุนเหวี่ยงที่ 1000 g เป็นเวลา 5 นาที เก็บ ส่วนใสชั้นบน	acetonitrile 3 mL H ₂ O 3 mL	H ₂ O 3 mL	acetonitrile 2 mL methanol 2 mL	64	34	27
7	สารละลายมาตรฐาน 20 µL เติมซีรัม 180 µL และกรดอะซิติก 1 N ปริมาตร 60 µL	chloroform 1 mL methanol 1 mL methanol:H ₂ O (1:1) 1 mL H ₂ O 1 mL 2 (อย่างละ 2 ครั้ง)	H ₂ O 1 mL (2 ครั้ง)	chloroform 1 mL methylene chloride 1 mL (อย่างละ 2 ครั้ง)	125	80	-

ตารางที่ 19 เปอร์เซ็นการคืนกลับ (%recovery) ของวิธีการสกัดแบบ solid-phase extraction (ต่อ)

วิธี การสกัด	การเตรียมตัวอย่าง	การเตรียม cartridges			%recovery		
		precondition	wash	elute	phenoxybenzyl alcohol	trans- permethrin	cis- permethrin
8	สารละลายมาตรฐาน 20 µL เติมซีรัม 180 µL และกรดอะซิติก 1 N ปริมาตร 60 µL	chloroform 1 mL methanol 1 mL methanol:H ₂ O (1:1) 1 mL H ₂ O 1 mL (อย่างละ 2 ครั้ง)	H ₂ O 1 mL (2 ครั้ง)	chloroform 1 mL methyl t-butyl - ether 1 mL (อย่างละ 2 ครั้ง)	92	57	-
9	สารละลายมาตรฐาน 20 µL เติมซีรัม 180 µL และกรดอะซิติก 1 N ปริมาตร 60 µL	isopropanol 1 mL methanol 1 mL methanol:H ₂ O (1:1) 1 mL H ₂ O 1 mL (อย่างละ 2 ครั้ง)	H ₂ O 1 mL (2 ครั้ง)	isopropanol 1 mL (2 ครั้ง)	919	66	-
10	สารละลายมาตรฐาน 20 µL เติมซีรัม 180 µL และกรดอะซิติก 1 N ปริมาตร 60 µL เข้ากันเป็นเวลา 30 วินาที	chloroform 2 mL methanol 2 mL methanol:H ₂ O (1:1) 2 mL H ₂ O 2 mL	H ₂ O 2 mL	chloroform 2 mL	70.88	102.67	246.57
11	สารละลายมาตรฐาน 20 µL เติมซีรัม 180 µL และกรดอะซิติก 1 N ปริมาตร 60 µL ผสมให้เข้ากันเป็นเวลา 30 วินาที	chloroform 3 mL methanol 3 mL methanol:H ₂ O (1:1) 3 mL H ₂ O 3 mL	H ₂ O 3 mL	chloroform 3 mL	80.84	105.36	226.51

ตารางที่ 19 เปอร์เซ็นต์การคืนกลับ (%recovery) ของวิธีการสกัดแบบ solid-phase extraction (ต่อ)

วิธี การสกัด	การเตรียมตัวอย่าง	การเตรียม cartridges			%recovery		
		precondition	wash	elute	phenoxybenzyl alcohol	trans- permethrin	cis- permethrin
12	สารละลายมาตรฐาน 20 μ L เติมซีรัม 180 μ L และกรดอะซิติก 1 N ปริมาตร 60 μ L ผสมให้เข้ากันเป็นเวลา 30 วินาที	chloroform 1 mL methanol 1 mL methanol: H ₂ O (1:1) 1 mL H ₂ O 1 mL	H ₂ O 1 mL	chloroform 1 mL	89.09	73.61	-
13	สารละลายมาตรฐาน 100 μ L เติมซีรัม 100 μ L และกรดอะซิติก 1 N ปริมาตร 60 μ L ผสมให้เข้ากัน หมุนเหวี่ยง 1000 g เป็นเวลา 5 นาที เก็บส่วนใสชั้นบน	chloroform 1 mL methanol 1 mL methanol: H ₂ O (1:1) 1 mL H ₂ O 1 mL	H ₂ O 1 mL	chloroform 1 mL	37	39.9	-
14	สารละลายมาตรฐาน 20 μ L เติมซีรัม 180 μ L และกรดอะซิติก 1 N ปริมาตร 60 μ L ผสมให้เข้ากัน	chloroform 1 mL methanol 1 mL methanol:H ₂ O (1:1) 1 mL H ₂ O 1 mL	H ₂ O 1 mL	chloroform 2 mL	94.29	62.07	52.46
15	สารละลายมาตรฐาน 20 μ L เติมซีรัม 180 μ L และกรดอะซิติก 1 N ปริมาตร 60 μ L ผสมให้เข้ากัน	chloroform 1 mL methanol 1 mL methanol:H ₂ O (1:1) 1 mL H ₂ O 1 mL	H ₂ O 1 mL 10% methanol +2% CH ₃ COOH 1 mL	chloroform 2 mL	70.55	62.73	53.86

ตารางที่ 19 เปอร์เซ็นต์การคืนกลับ (%recovery) ของวิธีการสกัดแบบ solid-phase extraction (ต่อ)

วิธี การสกัด	การเตรียมตัวอย่าง	การเตรียม cartridges			%recovery		
		precondition	wash	elute	phenoxybenzyl alcohol	trans- permethrin	cis- permethrin
16	สารละลายมาตรฐาน 20 µL เติมซีรัม 180 µL และกรดอะซิติก 1 N ปริมาตร 60 µL ผสมให้เข้ากัน	chloroform 1 mL methanol 1 mL methanol:H ₂ O (1:1) 1 mL H ₂ O 1 mL	H ₂ O 1 mL 10% methanol +2% NH ₄ OH	chloroform 2 mL	65.25	51.68	45.05
17	สารละลายมาตรฐาน 20 µL เติมซีรัม 180 µL และกรดอะซิติก 1 N ปริมาตร 60 µL ผสมให้เข้ากันเป็นเวลา 30 วินาที	chloroform 1 mL methanol 1 mL methanol:H ₂ O (1:1) 1 mL H ₂ O 1 mL	H ₂ O 1 mL	chloroform 2 mL	90.53	54.56	-
18	สารละลายมาตรฐาน 20 µL เติมซีรัม 180 µL เติม hexane : acetone (9.5 : 0.5) 1 mL vortex เป็นเวลา 10 นาที centrifuge ที่ 4000 rpm เป็นเวลา 5 นาที	chloroform 1 mL methanol 1 mL methanol:H ₂ O (1:1) 1 mL H ₂ O 1 mL	H ₂ O 1 mL	chloroform 2 mL	90.53	54.56	-
19	ซีรัมที่เติมสารละลายมาตรฐาน ลงไปปริมาตร 200 µL และกรดอะซิติก 1 N ปริมาตร 10 µL ผสมให้เข้ากันเป็นเวลา 30 วินาที หมุนเหวี่ยง 6000 rpm เป็นเวลา 15 นาที เก็บส่วนใสชั้นบน	acetonitrile 1 mL H ₂ O 1 mL	H ₂ O 1 mL	60% MeOH 1 mL	172.13		-

ตารางที่ 19 ค่าเปอร์เซ็นต์การคืนกลับ (%recovery) ของวิธีการสกัดแบบ solid-phase extraction (ต่อ)

วิธี การสกัด	การเตรียมตัวอย่าง	การเตรียม cartridges			%recovery		
		precondition	wash	elute	phenoxybenzyl alcohol	trans- permethrin	cis- permethrin
20	ซีรัมที่เติมสารละลายมาตรฐาน ลงไปปริมาตร 200 μ L และกรดอะซิติก 1 N ปริมาตร 10 μ L ผสมให้เข้ากันเป็นเวลา 30 วินาที หมุนเหวี่ยง 6000 rpm เป็นเวลา 15 นาที เก็บส่วนใสชั้นบน	acetonitrile 1 mL H ₂ O 1 mL	H ₂ O 1 mL	50%MeOH 1 mL	26.23		-
21	ซีรัมที่เติมสารละลายมาตรฐาน ลงไปปริมาตร 200 μ L และกรดอะซิติก 1 N (pH= 5) ผสมให้เข้ากันเป็นเวลา 30 วินาที หมุนเหวี่ยง 6000 rpm เป็นเวลา 15 นาที เก็บส่วนใสชั้นบน	acetonitrile 1 mL H ₂ O 1 mL	H ₂ O 1 mL	90%MeOH 1 mL (3 ครั้ง)	89.96	39.61	-
22	ซีรัมที่เติมสารละลายมาตรฐาน ลงไปปริมาตร 200 μ L และกรดอะซิติก 1 N (pH= 3) ผสมให้เข้ากันเป็นเวลา 30 วินาที หมุนเหวี่ยง 6000 rpm เป็นเวลา 15 นาที เก็บส่วนใสชั้นบน	acetonitrile 1 mL H ₂ O 1 mL	H ₂ O 1 mL	90%MeOH 1 mL (3 ครั้ง)	100.44	48.54	-

ตารางที่ 19 เปอร์เซ็นต์การคืนกลับ (%recovery) ของวิธีการสกัดแบบ solid-phase extraction (ต่อ)

วิธี การสกัด	การเตรียมตัวอย่าง	การเตรียม cartridges			%recovery		
		precondition	wash	elute	phenoxybenzyl alcohol	trans- permethrin	cis- permethrin
23	ซีรัมที่เติมสารละลายมาตรฐาน ลงไปปริมาตร 200 μ L และกรดอะซิติก 1 N (pH=5) ผสมให้เข้ากันเป็นเวลา 30 วินาที หมุนเหวี่ยง 6000 rpm เป็นเวลา 15 นาที เก็บส่วนใสชั้นบน	acetonitrile 1 mL H ₂ O 1 mL	H ₂ O 1 mL	90%MeOH 1 mL acetonitrile 1 mL (อย่างละ 2 ครั้ง)	97.27	33.69	-
24	ซีรัมที่เติมสารละลายมาตรฐาน ลงไปปริมาตร 200 μ L และกรดอะซิติก 1 N (pH=3) ผสมให้เข้ากัน เป็นเวลา 30 วินาที หมุนเหวี่ยง 6000 rpm เป็นเวลา 15 นาที เก็บส่วนใสชั้นบน	acetonitrile 1 mL H ₂ O 1 mL	H ₂ O 1 mL	90%MeOH 1 mL acetonitrile 1 mL (อย่างละ 2 ครั้ง)	97.02	41.55	-
25	ซีรัมที่เติมสารละลายมาตรฐาน ลงไปปริมาตร 200 μ L และกรดอะซิติก 1 N (pH=3) ผสมให้เข้ากันเป็นเวลา 30 วินาที หมุนเหวี่ยง 6000 rpm เป็นเวลา 15 นาที เก็บส่วนใสชั้นบน	acetonitrile 3 mL H ₂ O 3 mL	H ₂ O 3 mL	90%MeOH 1 mL acetonitrile 1 mL (อย่างละ 2 ครั้ง)	88.65	32.64	-

ตารางที่ 19 เปอร์เซ็นต์การคืนกลับ (%recovery) ของวิธีการสกัดแบบ solid-phase extraction (ต่อ)

วิธี การสกัด	การเตรียมตัวอย่าง	การเตรียม cartridges			%recovery		
		precondition	wash	elute	Phenoxybenzyl alcohol	trans- permethrin	cis- permethrin
26	ซีรัมที่เติมสารละลายมาตรฐาน ลงไปปริมาตร 200 μ L และกรดอะซิติก 1 N (pH=5) ผสมให้เข้ากันเป็นเวลา 30 วินาที หมุนเหวี่ยง 6000 rpm เป็นเวลา 15 นาที เก็บส่วนใสชั้นบน	acetonitrile 3 mL H ₂ O 3 mL	H ₂ O 3 mL	90%MeOH 1 mL acetonitrile 1 mL (อย่างละ 2 ครั้ง)	97.05	29.23	-
27	ซีรัมที่เติมสารละลายมาตรฐาน ลงไปปริมาตร 200 μ L และกรดอะซิติก 1 N ปริมาตร 20 μ L ผสมให้เข้ากันเป็นเวลา 30 วินาที หมุนเหวี่ยง 6000 rpm เป็นเวลา 15 นาที เก็บส่วนใสชั้นบน	acetonitrile 1 mL H ₂ O 1 mL	H ₂ O 1 mL	acetone 1 mL (3 ครั้ง)	88.42	41.02	-
28	ซีรัมที่เติมสารละลายมาตรฐาน ลงไปปริมาตร 200 μ L และกรดอะซิติก 1 N ปริมาตร 20 μ L ผสมให้เข้ากันเป็นเวลา 30 วินาที หมุนเหวี่ยง 6000 rpm เป็นเวลา 15 นาที เก็บส่วนใสชั้นบน	acetonitrile 1 mL H ₂ O 1 mL	H ₂ O 1 mL	acetone:isopropanol (8:2) 1 mL (3 ครั้ง)	77.73	30.75	-

ตารางที่ 19 เปอร์เซ็นต์การคืนกลับ (%recovery) ของวิธีการสกัดแบบ solid-phase extraction (ต่อ)

วิธี การสกัด	การเตรียมตัวอย่าง	การเตรียม cartridges			%recovery		
		precondition	wash	elute	Phenoxybenzyl alcohol	trans- permethrin	cis- permethrin
29	ซีรัมที่เติมสารละลายมาตรฐาน ลงไปปริมาตร 200 µL และกรดอะซิติค 1 N ปริมาตร 20 µL ผสมให้เข้ากันเป็นเวลา 30 วินาที หมุนเหวี่ยง 6000 rpm เป็นเวลา 15 นาที เก็บส่วนใสชั้นบน	acetonitrile 1 mL H ₂ O 1 mL	H ₂ O 1 mL	acetone 1 mL (2 ครั้ง) acetone:hexane (8:2) 1 mL	84.35	27.43	-
30	ซีรัมที่เติมสารละลายมาตรฐาน ลงไปปริมาตร 200 µL และกรดอะซิติค 1 N ปริมาตร 20 µL ผสมให้เข้ากันเป็นเวลา 30 วินาที หมุนเหวี่ยง 6000 rpm เป็นเวลา 15 นาที เก็บส่วนใสชั้นบน	acetonitrile 1 mL H ₂ O 1 mL	H ₂ O 1 mL	acetone 1 mL acetone:hexane (8:2) 1 mL (2 ครั้ง)	80.56	26.16	-
31	ซีรัมที่เติมสารละลายมาตรฐาน ลงไปปริมาตร 200 µL และกรดอะซิติค 1 N ปริมาตร 20 µL ผสมให้เข้ากันเป็นเวลา 30 วินาที หมุนเหวี่ยง 6000 rpm เป็นเวลา 15 นาที เก็บส่วนใสชั้นบน	acetonitrile 1 mL H ₂ O 1 mL	H ₂ O 1 mL	acetone:methylene- chloride(8:2) 1 mL (3 ครั้ง)	86.02	28.32	-

ตารางที่ 19 เปอร์เซ็นต์การคืนกลับ (%recovery) ของวิธีการสกัดแบบ solid-phase extraction (ต่อ)

วิธี การสกัด	การเตรียมตัวอย่าง	การเตรียม cartridges			%recovery		
		precondition	wash	elute	Phenoxybenzyl alcohol	trans- permethrin	cis- permethrin
32	ซีรัมที่เติมสารละลายมาตรฐาน ลงไปปริมาตร 200 µL และกรดอะซิติค 1 N ปริมาตร 20 µL ผสมให้เข้ากันเป็นเวลา 30 วินาที หมุนเหวี่ยง 6000 rpm เป็นเวลา 15 นาที เก็บส่วนใสชั้นบน	acetonitrile 1 mL H ₂ O 1 mL	H ₂ O 1 mL	acetone 1 mL acetone:methylene- chloride(8:2) 1 mL (2 ครั้ง)	92.65	29.74	-
33	ซีรัมที่เติมสารละลายมาตรฐาน ลงไปปริมาตร 200 µL และกรดอะซิติค 1 N (pH=3) ผสมให้เข้ากันเป็นเวลา 30 วินาที หมุนเหวี่ยง 6000 rpm เป็นเวลา 15 นาที	acetonitrile 1 mL H ₂ O 1 mL	H ₂ O 1 mL	methanol 1 mL (3 ครั้ง)	51.5	44.6	-
34	ซีรัมที่เติมสารละลายมาตรฐาน ลงไปปริมาตร 200 µL และกรดอะซิติค 1 N (pH=3) ผสมให้เข้ากันเป็นเวลา 30 วินาที หมุนเหวี่ยง 6000 rpm เป็นเวลา 15 นาที	acetonitrile 1 mL H ₂ O 1 mL	H ₂ O 1 mL	95%methanol 1 mL (3ครั้ง)	68.9	27.6	-

ตารางที่ 19 เปอร์เซ็นต์การคืนกลับ (%recovery) ของวิธีการสกัดแบบ solid-phase extraction (ต่อ)

วิธี การสกัด	การเตรียมตัวอย่าง	การเตรียม cartridges			%recovery		
		precondition	wash	elute	phenoxybenzyl alcohol	trans- permethrin	cis- permethrin
35	ซีรัมที่เติมสารละลายมาตรฐาน ลงไปปริมาตร 200 μ L และกรดอะซิติก 1 N (pH=3) ผสมให้เข้ากันเป็นเวลา 30 วินาที หมุนเหวี่ยง 6000 rpm เป็นเวลา 15 นาที	acetonitrile 1 mL H ₂ O 1 mL	H ₂ O 1 mL	acetonitrile 1 mL (4 ครั้ง)	86.7	28.6	-
36	ซีรัม(dilute ด้วยน้ำ 1 mL) เติม สารละลายมาตรฐานลงไปปริมาตร 200 μ L และกรดอะซิติก 1 N (pH=3) ผสมให้เข้ากันเป็นเวลา 30 วินาที หมุนเหวี่ยง 6000 rpm เป็นเวลา 15 นาที	acetonitrile 1 mL H ₂ O 1 mL	H ₂ O 1 mL (dry 5 นาที)	95%methanol 1 mL (4 ครั้ง)	43.6	57.2	-
37	ซีรัมที่เติมสารละลายมาตรฐาน ลงไปปริมาตร 200 μ L และกรดอะซิติก 1 N (pH=3) ผสมให้เข้ากันเป็นเวลา 30 วินาที หมุนเหวี่ยง 6000 rpm เป็นเวลา 15 นาที เก็บส่วนใสชั้นบน	acetonitrile 1 mL H ₂ O 1 mL	H ₂ O 1 mL (dry 5 นาที) 20%methanol 1 mL (dry 5 นาที)	95%methanol 1 mL (4 ครั้ง)	51.4	28.8	-

ตารางที่ 19 เปอร์เซ็นต์การคืนกลับ (%recovery) ของวิธีการสกัดแบบ solid-phase extraction (ต่อ)

วิธี การสกัด	การเตรียมตัวอย่าง	การเตรียม cartridges			%recovery		
		precondition	wash	elute	phenoxybenzyl alcohol	trans- permethrin	cis- permethrin
38	สารละลายมาตรฐาน 20 µL เติมซีรัม 180 µL และกรดอะซิติค 1 N ปริมาตร 20 µL ผสมให้เข้ากันเป็นเวลา 30 วินาที	chloroform 1 mL methanol 1 mL methanol:H ₂ O (1:1) 1 mL H ₂ O 1 mL	H ₂ O 1 mL	chloroform 2 mL	76.22	36.39	-
39	สารละลายมาตรฐาน 20 µL เติมซีรัม 180 µL และกรดอะซิติค 1 N ปริมาตร 40 µL ผสมให้เข้ากันเป็นเวลา 30 วินาที	chloroform 1 mL methanol 1 mL methanol:H ₂ O (1:1) 1 mL H ₂ O 1 mL	H ₂ O 1 mL	chloroform 2 mL	82.81	38.5	-
40	สารละลายมาตรฐาน 20 µL เติมซีรัม 180 µL และกรดอะซิติค 1 N ปริมาตร 60 µL ผสมให้ เข้ากันเป็นเวลา 30 วินาที	chloroform 3 mL methanol 3 mL methanol:H ₂ O (1:1) 3 mL H ₂ O 3 mL	H ₂ O 3 mL	chloroform 3 mL	89.94	71.8	84.2

ตารางที่ 20 เปอร์เซ็นต์การคืนกลับ (%recovery) ของวิธีการสกัดแบบ liquid-liquid extraction

วิธี การสกัด	ขั้นตอนการสกัด	ตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด	%recovery		
			phenoxybenzyl alcohol	trans- permethrin	cis- permethrin
1	ซีรัมที่เติมสารละลายมาตรฐานลงไปปริมาตร 200 μ L เติม hexane : acetone (9:1) 1 mL vortex เป็นเวลา 10 นาที centrifuge ที่ 3000 rpm เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 C° เก็บส่วนใสชั้นบนใสในหลอดทดลองขนาด 5 mL นำส่วนที่เหลือมาสกัดซ้ำด้วยขั้นตอนเดิม	hexane : acetone (9:1)	158.05	99.84	124.5
2	ซีรัมที่เติมสารละลายมาตรฐานลงไปปริมาตร 200 μ L เติม hexane : acetone (8:2) 1 mL centrifuge ที่ 3000 rpm เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 C° เก็บส่วนใสชั้นบนใสในหลอดทดลองขนาด 5 mL นำส่วนที่เหลือมาสกัดซ้ำด้วยขั้นตอนเดิม	hexane : acetone (8:2)	139.46	101.33	120.28
3	ซีรัมที่เติมสารละลายมาตรฐานลงไปปริมาตร 200 μ L เติม hexane : acetone (7:3) 1 mL centrifuge ที่ 3000 rpm เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 C° เก็บส่วนใสชั้นบนใสในหลอดทดลองขนาด 5 mL นำส่วนที่เหลือมาสกัดซ้ำด้วยขั้นตอนเดิม	hexane : acetone (7:3)	61.47	87.72	106.1

ตารางที่ 20 เปอร์เซ็นต์การคืนกลับ (%recovery) ของวิธีการสกัดแบบ liquid-liquid extraction (ต่อ)

วิธี การสกัด	ขั้นตอนการสกัด	ตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด	%recovery		
			phenoxybenzyl alcohol	trans- permethrin	cis- permethrin
4	ซีรัมที่เติมสารละลายมาตรฐานลงไปปริมาตร 200 μ L เติม methanol 5 mL vortex เป็นเวลา 1 นาที centrifuge ที่ 2000 g เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 C° เก็บส่วนใสชั้นบนใสในหลอดทดลองขนาด 5 mL	methanol	95.34	46.26	77.38
5	ซีรัมที่เติมสารละลายมาตรฐานลงไปปริมาตร 200 μ L เติม acetonitrile 5 mL vortex เป็นเวลา 1 นาที centrifuge ที่ 2000 g เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 C° เก็บส่วนใสชั้นบนใสในหลอดทดลองขนาด 5 mL	acetonitrile	93.99	51.87	66.51
6	ซีรัมที่เติมสารละลายมาตรฐานลงไปปริมาตร 200 μ L เติม methanol 1 mL vortex เป็นเวลา 1 นาที centrifuge ที่ 2000 g เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 C° เก็บส่วนใสชั้นบนใสในหลอดทดลองขนาด 5 mL นำส่วนที่เหลือมาสกัดซ้ำด้วย hexane:acetone (9:1) 1 mL vortex เป็นเวลา 10 นาที centrifuge ที่ 2000 g เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 C° เก็บส่วนใสชั้นบน ใสในหลอดทดลองเดียวกันกับขั้นตอนแรก	methanol hexane:acetone (9:1)	4.51	8.44	39.62

ตารางที่ 20 เปอร์เซ็นต์การคืนกลับ (%recovery) ของวิธีการสกัดแบบ liquid-liquid extraction (ต่อ)

วิธี การสกัด	ขั้นตอนการสกัด	ตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด	%recovery		
			phenoxybenzyl alcohol	trans- permethrin	cis- permethrin
7	ซีรัมที่เติมสารละลายมาตรฐานลงไปปริมาตร 200 μ L เติม acetonitrile 1 mL vortex เป็นเวลา 1 นาที centrifuge ที่ 2000 g เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 C ^o เก็บส่วนใสชั้นบนใสในหลอดทดลองขนาด 5 mL นำส่วนที่เหลือมาสกัดซ้ำด้วย hexane:acetone (9:1) 1 mL vortex เป็นเวลา 10 นาที centrifuge ที่ 2000 g เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 C ^o เก็บส่วนใสชั้นบน ใสในหลอดทดลองเดียวกันกับขั้นตอนแรก	acetonitrile hexane:acetone (9:1)	2.51	7.18	42.37

