ผลของอุณหภูมิ เวลา และความเป็นกรดต่อความเสถียรของ Permethrin ในตัวอย่างเลือด

ศรินทิพย์ จันทร์แก้ว[1] , เบญจมาศ จันทร์ฉวี[2,3], สถาพร พฤฒิพรรลาย[2]

[1]หลักสูตรนิติวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา 90112

[2]ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา 90112

[3]สถานวิจัยผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา 90112

บทคัดย่อ

Permethrin เมื่ออยู่ในร่างกายจะเกิดเมแทบอลิซึมที่ตับโดยปฏิกิริยา Hydrolysis ด้วยเอนไซม์ Carboxylesterase ให้ Phenoxybenzyl alcohol เนื่องจากในเลือดมีเอนไซม์นี้อยู่ด้วยจึงอาจมีผลต่อความถูกต้องของการวิเคราะห์ permethrin ในเลือด งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อความเสถียรของ Permethrin ในตัวอย่างเลือด ศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิและระยะเวลาโดยตั้งตัวอย่างเลือดไว้ที่อุณหภูมิ 25, 4 และ -20ºC เป็นระยะเวลา 0, 0.5, 1, 2 และ 4 ชั่วโมง ตามลำดับ พบว่าค่า Metabolic ratio ของ trans- และ cis-Permethrin มีค่ามากขึ้นเมื่อเวลาผ่านไป และมีค่าต่ำสุดที่อุณหภูมิ -20ºC การศึกษาอิทธิพลของกรด trifluoroacetic acid (100: 1 และ 200: 1) และ $HClO_4$ (50: 1, 100: 1, 200: 1, 225: 1 และ 250: 1) และอิทธิพลของกรด $HClO_4$ (200: 1 และ 225: 1) ร่วมกับการแช่ตัวอย่างเลือดในน้ำแข็งพบว่า การเติมกรด $HClO_4$ อัตราส่วน 200: 1 ร่วมกับการแช่ตัวอย่างเลือดในน้ำแข็งทำให้มีค่า Metabolic Ratio ต่ำที่สุด จึงสรุปว่า การเตรียมตัวอย่างเลือดโดยการเติมกรดและลดอุณหภูมิเป็นสภาวะที่เหมาะสมในการลดการสูญเสีย permethrin ก่อนการวิเคราะห์

คำสำคัญ: ความเสถียร, เลือด, ไฮโดรไลซิส, อุณหภูมิ, เวลา, ความเป็นกรด

* **Corresponding Author :**

รศ.ดร.เบญจมาศ จันทร์ฉวี

ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา 90112โทรศัพท์: 0 7428 8171-2

E-mail: benjamas.j@psu.ac.th

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

Chunkhew S[1], Janchawee B[2,3], Prutipanlai S[2]

[1]Forensic Science Program, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Songkhla 90112, Thailand
[2]Department of Pharmacology, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Songkhla 90112, Thailand
[3]Natural Products Research Center, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Songkhla 90112, Thailand

ABSTRACT

Permethrin is metabolized by hydrolysis via carboxylesterase in liver producing phenoxybenzyl alcohol. Since this enzyme also exists in blood, that may affect the accuracy of permethrin quantification. This study was aimed to determine the stability of permethin in blood sample. To investigate effects of temperature and time, blood samples were left at 25, 4 and -20ºC 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 ºC. Effects of trifluoroacetic acid (100: 1 and 200: 1) and $HClO_4$ (50: 1, 100: 1, 200: 1, 225: 1 and 250: 1), and those of $HClO_4$ (200: 1 and 225: 1) in combination with cooling the sample in ice showed thatadding $HClO_4$ (200: 1) combining with cooling in ice resulted in the lowest metabolic ratio. In conclusion, sample preparing by adding acid and reducing the sample temperature are the optimum conditions to decrease the loss of permethrin before analysis.

Keywords: Permethrin, Stability, Blood, Pyrethroids, Hydrolysis, Temperature, Ttime, Acid

***Corresponding author:**

Assoc. Prof. Dr. Benjamas Janchawee
Department of Pharmacology, Faculty of Science, Prince of Songkla University
Tel: 074-288171-2
E-mail: benjamas.j@psu.ac.th

บทนำ

Permethrin เป็นสารกำจัดแมลงกลุ่ม Synthetic Pyrethroids ที่พัฒนามาจากสาร Pyrethrum ซึ่งสกัดจากดอกไม้กลุ่มเบญจมาศ (*Chrysanthemum spp.*) Synthetic Pyrethroids มีความเสถียรต่อแสงมากกว่าสาร Pyrethrum แต่มีความเป็นพิษต่อสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมต่ำกว่า 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 มีความเป็นพิษแตกต่างกัน ความเป็นพิษในคนมักเกิดจาก type II มากกว่า type I การศึกษาในสัตว์ทดลองพบว่าสาร pyrethroids type I ทำให้เกิดกลุ่มอาการ tremor Symdrome ได้แก่ Fine Tremor, Hyperreflexia และ Sympathetic Overactivity ส่วน Pyrethroids Type II ทำให้เกิดกลุ่มอาการ Choreoathetosis/salivation syndrome ซึ่งได้แก่ Salivation, Coarse Tremor, Choreoathetosis, Hyperreflexia, Sympathetic Overactivity และ Convulsion[1] สารกลุ่ม Synthetic Pyrethroids เมื่อเข้าสู่ร่างกายจะเกิดเมแทบอลิซึมที่ตับเป็นส่วนใหญ่โดยการเกิดปฏิกิริยา hydrolysis ด้วยเอนไซม์ Carboxylesterase ทำให้ได้ Phenoxybenzyl alcohol ซึ่งไม่มีพิษ ก่อนจะถูกขับออก[2] Carboxylesterase นอกจากจะมีอยู่ที่ตับแล้วยังมีอยู่ที่อวัยวะอื่นๆได้แก่ ไต ลำไส้เล็ก และเลือด[3, 4] ในด้านการแพทย์ พิษวิทยา และนิติวิทยาศาสตร์ ที่ต้องมีการเก็บตัวอย่างเลือดเพื่อตรวจวัดระดับสาร Permethrin จึงควรตระหนักถึงการเกิดปฏิกิริยา Hydrolysis โดยเอนไซม์ดังกล่าวในตัวอย่างเลือดซึ่งจะมีผลต่อความเสถียรของ Permethrin ก่อนที่จะนำมาสกัดและวิเคราะห์หาปริมาณของ Permethrin ได้อย่างถูกต้อง

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาผลของปัจจัยทางกายภาพ ได้แก่ อุณหภูมิ เวลา ความเป็นกรด ต่อระดับของ Permethrin และ Phenoxybenzyl alcohol ในตัวอย่างเลือด

2. ศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมที่จะทำให้ Permethrin ในตัวอย่างเลือดมีความเสถียรสูงสุด

วิธีดำเนินการวิจัย

สารเคมี

Acetonitrile (HPLC grade, Millinckrodt Baker Inc., NJ, U.S.A.), methanol (HPLC grade, Millinckrodt Baker Inc., NJ, U.S.A.), chloroform (VWR International Ltd, Pool, U.K.), acetic acid (Millinckrodt Baker Inc., NJ, U.S.A.), สารมาตรฐาน permethrin ความบริสุทธิ์ 98% (trans-permethrin 71.7%, cis-permethrin 26.4%) (SIGMA-ALDRICH, Inc., P.O., Germany), heparin, trifluoroacetic acid (TFA) (Millinckrodt Baker Inc., NJ, U.S.A.), perchloric acid ($HClO_4$) (Millinckrodt Baker Inc., NJ, U.S.A.)

วัสดุและเครื่องมือ

VertiPak ™ C_{18} (200 mg/3mL) (Vertical chromatography Co., LTD, Thailand), Sunfire ™ C_{18} guard column, 20×4.6 mm i.d., 5 µm (Waters

Corporation, Massachusetts, U.S.A), Fortis ™ C_{18} column, 150×4.6 mm i.d., 5 µm (Fortis ™ Technologies Ltd., UK), analytical balances model AB 204-S (METTLER TOLEDO, Greifensee, Switzerland), automatic pipette 100 µL (Eppendorf, Hamburg, Germany), automatic pipette 1000 µL (SOCOREX, Isba S.A., Switzerland), 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)

รูปแบบการทดลอง

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

การเก็บตัวอย่างเลือดและการเตรียมพลาสมา

ทำการวางยาสลบหนูด้วย Ether หลังจากนั้นเก็บตัวอย่างเลือดโดยการเจาะเลือดจากแอ่งเลือดใต้ตาใส่ในหลอดทดลองที่มีสาร Heparin ความเข้มข้น 60 u/mL โดยใช้อัตราส่วนของ Heparin 0.1 mL ต่อเลือด 1 mL ผสมให้เข้ากัน หลังจากนั้นนำตัวอย่างเลือดที่ผสมกับ heparin แล้ว (Heparinized Blood)ไปปั่นทันทีที่ 1600×g เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4ºC เพื่อแยกส่วนของพลาสมา

การเตรียมตัวอย่าง plasma blank

นำตัวอย่างเลือดที่ผสมกับ Heparin แล้ว ไปปั่นทันทีที่ 1600×g เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4ºC เพื่อแยกส่วนของพลาสมา หลังจากนั้นปิเปตพลาสมาปริมาตร 200 µL ใส่ลงในหลอดทดลอง แล้วจึงนำมาสกัด หลังจากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC

อิทธิพลของตัวกลาง

เตรียมสารละลาย Permethrin ในตัวทำละลายอินทรีย์โดยปิเปตสารละลายมาตรฐาน Permethrin ความเข้มข้น 500 µg/mL ปริมาตร 50 µL ลงในหลอดทดลอง เติม Acetonitrile ปริมาตร 450 µL เพื่อให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 50 µg/mL เขย่าให้เข้ากันเบาๆ (ทำซ้ำ 3 ครั้ง)

เตรียมสารละลาย Permethrin ในตัวอย่างเลือดโดยปิเปตสารละลายมาตรฐาน Permethrin ความเข้มข้น 500 µg/mL ปริมาตร 50 µL ลงในหลอดทดลอง แล้วเติมตัวอย่างเลือดที่ผสมกับ Heparin แล้ว ปริมาตร 450 µL เขย่าให้เข้ากันเบาๆ แล้วนำไปแยกส่วนของพลาสมาก่อนทำการสกัด (ทำซ้ำ 3 ครั้ง)

อิทธิพลของอุณหภูมิและเวลา

ปิเปตสารละลายมาตรฐาน Permethrin ความเข้มข้น 500 µg/mL ปริมาตร 50 µL เติมลงไปในหลอดทดลอง หลังจากนั้นเติมตัวอย่างเลือดที่ผสมกับ heparin แล้ว ปริมาตร 450 µL เพื่อให้ได้ตัวอย่างเลือดที่มีความเข้มข้นของ Permethrin 50 µg/mL เขย่าให้เข้ากันเบาๆ นำตัวอย่างเลือดไปตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ

25 ºC (อุณหภูมิห้อง) 4 ºC (ช่องทำความเย็นปกติของตู้เย็น) และ -20 ºC (ช่องแช่แข็งของตู้เย็น) ทั้งนี้ได้ตรวจสอบอุณหภูมิโดยใช้เทอร์โมมิเตอร์

ตัวอย่างเลือดถูกตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิดังกล่าวเป็นเวลา 0, 0.5, 1, 2, และ 4 ชั่วโมง ตามลำดับ ก่อนนำไปปั่นแยกเพื่อเอาส่วนของพลาสมามาทำการสกัด (ทำซ้ำ 3 ครั้ง)

อิทธิพลของความเป็นกรด

ปิเปตตัวอย่างเลือดที่ผสมกับ Heparin แล้วปริมาตร 450 µL เติมลงไปในหลอดทดลอง 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 เติมสารละลายมาตรฐาน Permethrin ที่ความเข้มข้น 500 µg/mL ปริมาตร 50 µL เพื่อให้ได้ตัวอย่างเลือดที่มีความเข้มข้นของ Permethrin 50 µg/mL เขย่าให้เข้ากัน นำไปปั่นแยกทันทีเพื่อเอาส่วนของพลาสมามาทำการสกัด (ทำซ้ำ 2 ครั้ง)

อิทธิพลของความเป็นกรดร่วมกับการรักษาอุณหภูมิ

ปิเปตตัวอย่างเลือดที่ผสมกับ Heparin แล้วปริมาตร 450 µL เติมลงไปในหลอดทดลอง เติมกรด $HClO_4$ อัตราส่วน 200: 1 และ 225: 1 เขย่าให้เข้ากัน หลังจากนั้นเติมสารละลายมาตรฐาน Permethrin ที่ความเข้มข้น 500 µg/mL ปริมาตร 50 µL เพื่อให้ได้ตัวอย่างเลือดที่มีความเข้มข้นของ Permethrin 50 µg/mL เขย่าให้เข้ากัน แล้วนำไปแช่ไว้ในบีกเกอร์ที่มีน้ำแข็งซึ่งวัดอุณหภูมิได้ 3 ºC เป็นเวลา 30 นาที ก่อนนำไปปั่นแยกทันทีเพื่อเอาส่วนของพลาสมามาทำการสกัด (ทำซ้ำ2 ครั้ง)

วิธีการสกัดตัวอย่างพลาสมา

วิธีการสกัดดัดแปลงมาจากวิธีของ Junting และ Chuichang [5] โดยนำตัวอย่างพลาสมา 200 µL ใส่ในหลอดทดลองขนาด 5 mL ทำตัวอย่างให้เป็นกรดด้วยการเติม 1 N Acetic Acid 60 µL เขย่าให้เข้ากันด้วย vortex เป็นเวลา 30 วินาที นำไปสกัดโดยใช้เทคนิค solid phase extraction (SPE) โดยใช้ VertiPak™ C_{18} - 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 ตัวอย่างที่ทำการสกัดได้นำไประเหยจนแห้งด้วยไอไนโตรเจนที่อุณหภูมิห้อง ละลายส่วนที่เหลือด้วย Acetonitrile 200 µL แล้วทำการวิเคราะห์ด้วย HPLC

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 ดัดแปลงมาจากวิธี

ของ Abu-Qare และคณะ[6] คอลัมน์ที่ใช้เป็นชนิด Reverse-Phase Fortis ™ C_{18} column (150×4.6 mm i.d., 5 μm) ซึ่งต่อกับ Sunfire ™ C_{18} guard column (20×4.6 mm i.d., 5 μm) อุณหภูมิของคอลัมน์เท่ากับ 25 ºC เฟสเคลื่อนที่ประกอบด้วย Deionized Water และ Acetonitrile และแยกสารโดย Gradient Program โดยเริ่มต้นที่ 70% Acetonitrile ที่เวลา 0-4 นาที แล้วเพิ่มขึ้นเป็น 100% Acetonitrile ในนาทีที่ 5 -20 หลังจากนั้นปรับลดลงเป็น 70% Acetonitrile ในนาทีที่ 21-23 อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่เท่ากับ 1.4 mL/min ปริมาตรของตัวอย่างที่ฉีดเข้าสู่ระบบเท่ากับ 20 µL และตรวจวัด Permethrin และ Phenoxybenzyl Alcohol ที่ความยาวคลื่น 210 nm

วิเคราะห์ผลการทดลอง

บันทึกค่าพื้นที่ใต้กราฟ (Peak area) ของ Permethrin ทั้ง trans- และ cis-isomers และ Phenoxybenzyl alcohol แล้วนำมาคำนวณหาค่า Metabolic Ratio (MR) สำหรับ trans- และ cis-isomers จากสูตรต่อไปนี้

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

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

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

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

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

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

อิทธิพลของตัวกลาง

ผลของตัวกลางที่ Permethrin ละลายอยู่ นั่นคือในตัวทำละลายอินทรีย์ และในเลือดแสดงดังรูปที่ 1 ค่าเฉลี่ยพื้นที่ใต้กราฟของ trans- และ cis-Permethrin ที่อยู่ในตัวอย่างเลือดมีค่าต่ำกว่าค่าเฉลี่ยพื้นที่ใต้กราฟของ Permethrin ที่อยู่ในตัวทำละลายอินทรีย์ โดยค่าเฉลี่ยพื้นที่ใต้กราฟของ Permethrin ในตัวอย่างเลือดมีค่าต่ำกว่าในตัวทำละลายอินทรีย์ 50.77% สำหรับ trans-isomer และ 24.28% สำหรับ cis-isomer อัตราส่วนพื้นที่ใต้กราฟ ของ trans-: cis-Permethrin ที่อยู่ในตัวทำละลายอินทรีย์ มีค่าเท่ากับ 2.54 ในขณะที่ อัตราส่วนพื้นที่ใต้กราฟของ trans-: cis- Permethrin ในตัวอย่างเลือดมีค่าเท่ากับ 1.65 ซึ่งเป็นผลมาจากการลดลงอย่างมากของ trans-isomer ในตัวอย่างเลือด นอกจากนี้ยังตรวจพบ Phenoxybenzyl Alcohol ในตัวอย่างเลือดแต่ไม่พบในตัวอย่างที่เป็นสารละลาย Permethrin ในตัวทำละลายอินทรีย์ Phenoxybenzyl Alcohol เป็นเมแทบอไลท์ที่เกิดจากปฏิกิริยา Hydrolysis ของ Permethrin โดยเฉพาะ trans-isomer [2] โดยเอนไซม์ carboxylesteraseซึ่งมีอยู่ในเลือด จึงเป็นไปได้ว่า ในระหว่างการเตรียมพลาสมาซึ่งต้องใช้เวลาอย่างน้อย 15 นาที ในการปั่นเหวี่ยง Permethrin ซึ่งอยู่ในเลือดได้ถูกเปลี่ยนให้เป็น Phenoxybenzyl Alcohol การที่ Peak Area ของ trans-Permethrin ลดลงมากกว่า cis-isomer และการที่อัตราส่วนพื้นที่ใต้กราฟของ trans-:

cis- ลดลง รวมทั้งการตรวจพบ Phenoxybenzyl alcohol เฉพาะในตัวอย่างเลือด แสดงให้เห็นว่า ในตัวอย่างเลือดมีการเปลี่ยนแปลงของ trans-Permethrin ให้เป็น Phenoxybenzyl Alcohol นั่นคือมีการเกิด Hydrolysis ของ Permethrin

อิทธิพลของอุณหภูมิและเวลา

ผลของอุณหภูมิและเวลาที่มีต่อการเกิด hydrolysis ของ trans- และ cis-permethrin ไปเป็น phenoxybenzyl alcohol แสดงด้วยค่า MR (รูปที่ 2) ผลการทดลองพบว่าที่อุณหภูมิห้องนั่นคือ 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 2A)

ในทำนองเดียวกัน เมื่อตั้งตัวอย่างเลือดที่มี permethrin ความเข้มข้นที่เท่ากันอยู่ด้วยที่อุณหภูมิ 4°C ค่า MR สำหรับ trans-permethrin มีค่าเพิ่มขึ้นตามเวลาที่ผ่านไป แต่มีค่าเพิ่มขึ้นน้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับที่อุณหภูมิห้อง(25°C) (รูปที่ 2B) เมื่อตั้งตัวอย่างเลือดที่อุณหภูมิ -20°C ค่า MR สำหรับ trans-permethrin มีค่าเพิ่มขึ้นตามเวลาเช่นกันโดยเพิ่มขึ้นน้อยที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับที่อุณหภูมิ 25°C และ 4°C (รูปที่ 2C) 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

โดยปกติการทำการทดลอง มักทำที่อุณหภูมิห้องซึ่งมีอุณหภูมิประมาณ 25°C อาจสูงกว่าหรือต่ำกว่านี้เล็กน้อย แม้ว่าตัวอย่างเลือดจะถูกเก็บออกมาจากสัตว์ทดลองและนำไปปั่นแยกพลาสมาทันที ก็ยังมีการสูญเสียของ permethrin ไปบางส่วน ซึ่งเป็นไปได้ว่าเกิดจากปฏิกิริยา hydrolysis โดยเอนไซม์ในเลือด ดังที่ได้ กล่าวมาแล้วข้างต้น 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 เมื่อตัวอย่างเลือดถูกตั้งทิ้งไว้ยิ่งนานขึ้นก็ยิ่งทำให้เกิดการสูญเสีย permethrin ไปมากขึ้น ตั้งแต่เวลา 1 ชั่วโมงเป็นต้นไปการสูญเสีย permethrin เกิดขึ้นสูงสุด

อย่างไรก็ตามการตั้งตัวอย่างเลือดไว้ที่อุณหภูมิที่ต่ำลง ในที่นี้คือ ที่ 4°C และ -20°C พบว่ายังคงมีการสูญเสีย permethrin เกิดขึ้นแต่น้อยลง และเมื่อตั้งไว้นานขึ้นการสูญเสียเกิดมากขึ้น ผลการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่าอุณหภูมิที่ลดลงไม่สามารถหยุดปฏิกิริยา hydrolysis ได้เพียงแต่ช่วยชะลอการเกิดปฏิกิริยาให้ช้าลง ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Avramides [7] ได้ศึกษาสภาวะของการเก็บรักษาสารกำจัดแมลงต่างๆซึ่งรวมทั้ง permethrin ด้วยที่อุณหภูมิต่างกันคือ ที่อุณหภูมิของช่องแช่แข็ง อุณหภูมิห้อง

4°C และ -20°C ตามลำดับ พบว่า permethrin เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องใช้ระยะเวลาในการเก็บไว้ได้สั้นที่สุด การสูญเสีย permethrin ในการทดลองนี้ไม่น่าจะเป็นผลมาจากการถูกทำลายด้วยแสงสว่าง เนื่องจากระหว่างทำการทดลอง ผู้ทดลองได้ป้องกันแสงสว่างด้วยการหุ้มหลอดทดลองทุกหลอดที่ใส่ตัวอย่างที่มี permethrin ด้วยอะลูมิเนียมฟอล์ย

อิทธิพลของความเป็นกรด

ผลของการเติมกรด TFA และ $HClO_4$ ในอัตราส่วน 100: 1 และ 200: 1 ลงในตัวอย่างเลือดที่มีต่อ ค่า MR และค่าเปอร์เซ็นร้อยละการคืนกลับของการสกัดแสดงดังรูปที่ 3 ค่า MR สำหรับทั้งทั้ง trans- และ cis-permethrin มีค่าลดลง หลังการเติมกรด TFA และ $HClO_4$ ลงในตัวอย่างเลือดเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างเลือดที่ไม่ได้เติมกรดทั้งสอง เปรียบเทียบการเติมกรด TFA หรือ $HClO_4$ ในอัตราส่วน 100: 1 ทำให้ค่า MR สำหรับ trans- และ cis-permethrin ต่ำกว่าการเติมกรดในอัตราส่วน 200: 1 แต่ค่าเปอร์เซ็นร้อยละการคืนกลับมีค่าต่ำกว่า การเติมกรด TFA 200: 1 ทำให้ค่า MR มีค่าสูงกว่าเมื่อเติมกรด $HClO_4$ 200: 1 ดังนั้นชนิดของกรดที่น่าจะพิจารณาสำหรับการเติมลงในตัวอย่างเลือดน่าจะเป็น $HClO_4$ เพราะสามารถทำให้ค่า MR มีค่าน้อยและยังให้ประสิทธิภาพการสกัดที่ดี

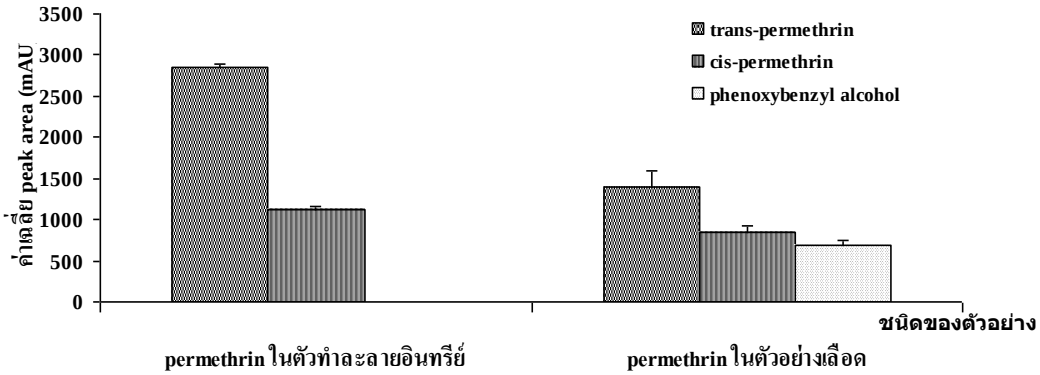
เมื่อทดลองปรับอัตราส่วนของกรด $HClO_4$ ตั้งแต่ 50: 1 ถึง 250: 1 พบว่าด้วยอัตราส่วน 200: 1 และ 225: 1 ทำให้ค่า MR ของ permethrin มีค่าต่ำกว่าเมื่อเทียบกับอัตราส่วน 50: 1 และ 250: 1 (รูปที่ 4) จากผลการทดลองชี้ให้เห็นว่า การทำให้ตัวอย่างเลือดเป็นกรดช่วยชะลอการสูญเสีย permethrin ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของกรดและอัตราส่วนที่เติมลงไปซึ่งมีผลต่อความเป็นกรดในตัวอย่างเลือด อย่างไรก็ตามปัจจัยทั้งสองมีผลต่อประสิทธิภาพการสกัดด้วย ในการหาสภาวะที่เหมาะสมจึงต้องคำนึงถึงเรื่องนี้ด้วย

อิทธิพลของความเป็นกรดร่วมกับการลดอุณหภูมิ

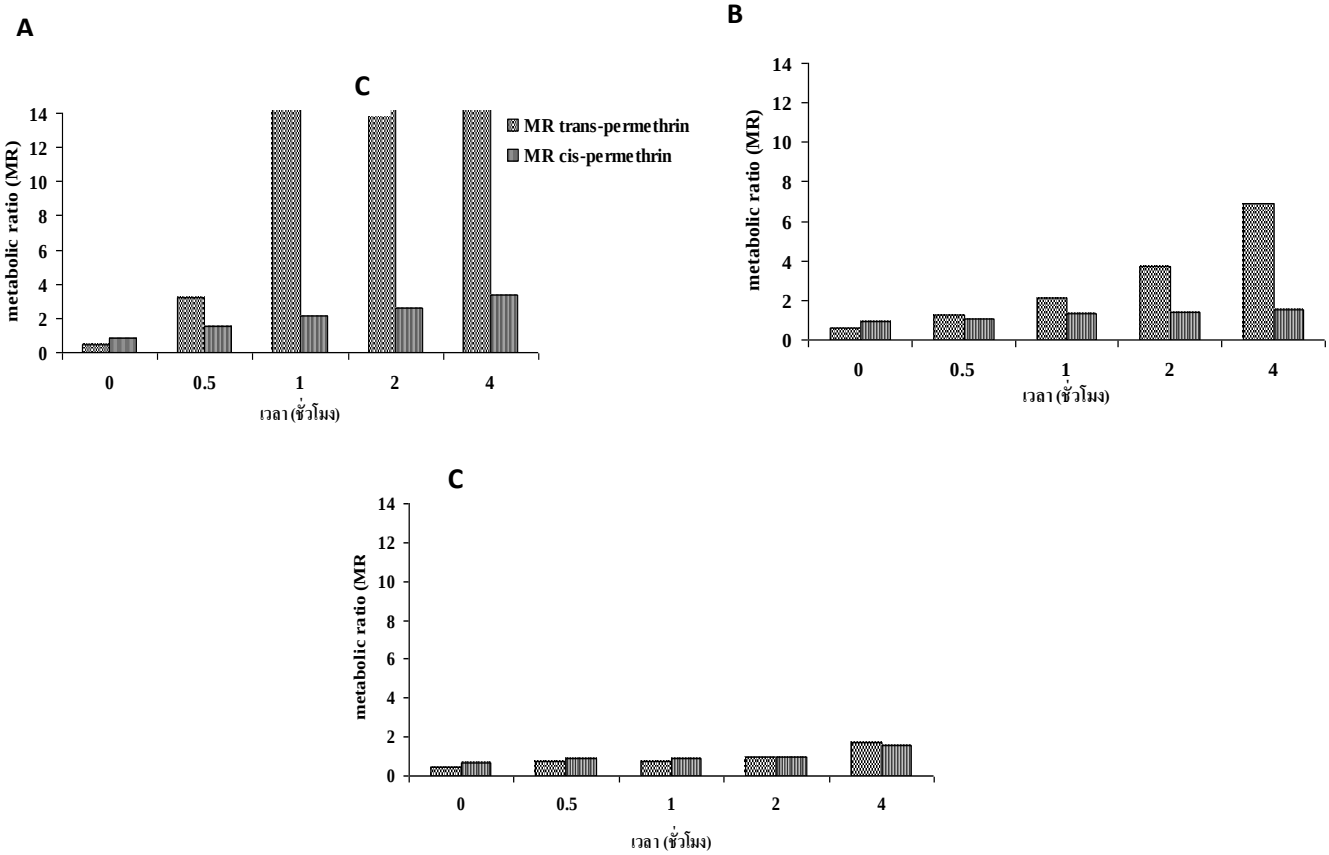
เมื่อเติมกรด $HClO_4$ ลงในตัวอย่างเลือดด้วยอัตราส่วน 200: 1 และ 225: 1 ร่วมกับการลดอุณหภูมิโดยการแช่ตัวอย่างเลือดในน้ำแข็ง พบว่าการเติมกรดด้วยอัตราส่วน 200: 1 ร่วมกับการแช่ตัวอย่างเลือดในน้ำแข็งทำให้ค่า MR มีค่าต่ำที่สุด (< 0.1) (รูปที่ 4) ซึ่งต่ำกว่าการเติมกรดที่อัตราส่วนเดียวกัน หรือการลดอุณหภูมิเพียงอย่างเดียว ดังนั้นการทำสภาวะนี้จึงเป็นสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการชะลอการสูญเสีย permethrin ในตัวอย่างเลือด

สรุปผลการทดลอง

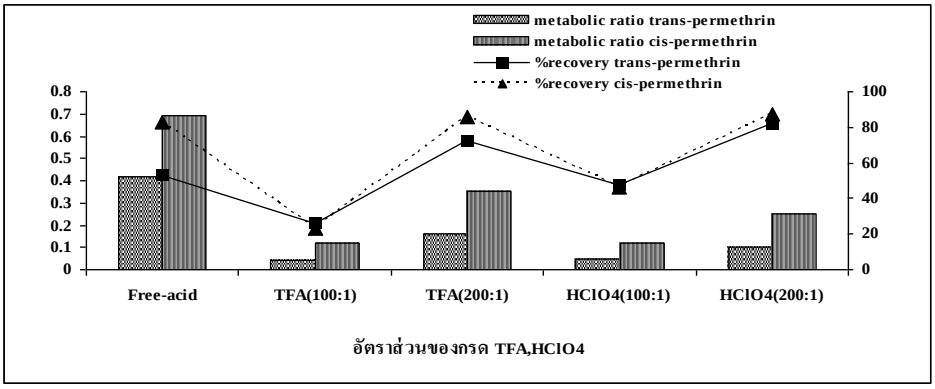
ที่อุณหภูมิที่คงที่การสูญเสีย permethrin ที่อยู่ในตัวอย่างเลือด เพิ่มขึ้นเมื่อตั้งตัวอย่างไว้เป็นระยะเวลานานขึ้น การสูญเสียลดลงเมื่ออุณหภูมิลดลง และทำตัวอย่างให้เป็นกรด การสูญเสีย permethrin ต่ำที่สุดเมื่อทำตัวอย่างให้เป็นกรดร่วมกับการควบคุมอุณหภูมิของตัวอย่างให้ต่ำลง ดังนั้นในขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างเลือดก่อนการสกัดและวิเคราะห์ permethrin ควรควบคุมสภาวะให้เหมาะสมที่สุดเพื่อทำให้ permethrin ในตัวอย่างเลือดมีความเสถียรมากที่สุด



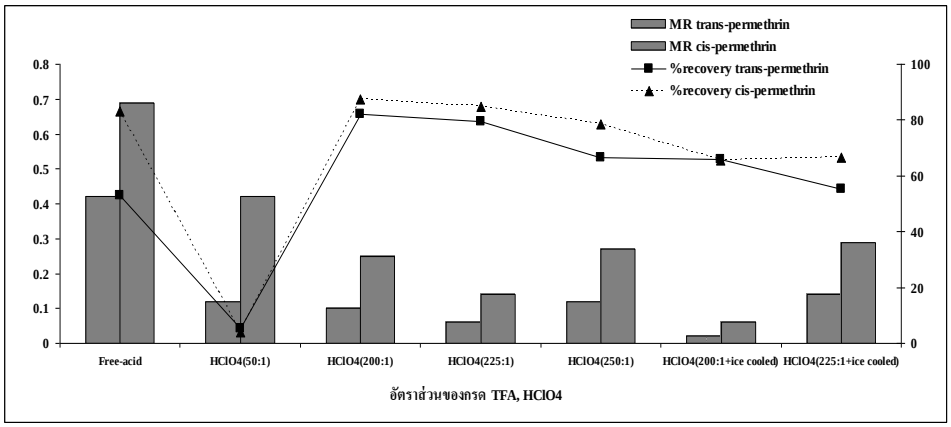
รูปที่ 1 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าเฉลี่ยพื้นที่ใต้กราฟ (± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน) ของ trans-permethrin, cis- permethrin และ phenoxybenzyl alcohol ที่อยู่ในตัวทำละลายอินทรีย์ (acetonitrile) กับ ในตัวอย่างเลือด (n=3)



รูปที่ 2 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)



รูปที่ 3 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างการทำตัวอย่างให้เป็นกรดด้วย TFA, $HClO_4$ ที่อัตราส่วน 100: 1 และ 200: 1 กับ metabolic ratio (MR) และค่าร้อยละของการกลับคืน (%recovery) ของ trans-permethrin และ cis-permethrin



รูปที่ 4 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 trans-permethrin และ cis-permethrin

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ สำหรับทุนอุดหนุนการวิจัยเพื่อวิทยานิพนธ์

ขอบคุณ อาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ ดร.เบญจมาศ จันทร์ฉวี และอาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ดร. สถาพร พฤฒิพรรลาย ที่ได้กรุณาให้ความรู้ คำปรึกษา และชี้แนะแนวทางอันเป็นประโยชน์ในการทำงานวิจัย จนทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอบคุณ ภาคเภสัชวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ให้ความอนุเคราะห์ด้านสถานที่และอุปกรณ์สำหรับการศึกษา และการทำวิจัย

ขอบคุณ สถานสัตว์ทดลอง ภาคใต้ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการใช้สัตว์ทดลองและสถานที่ในการทำงานวิจัย

เอกสารอ้างอิง

1. Soderlund DM, Clark JM, Sheets LP, *et al*. Mechanisms of pyrethroid neurotoxicity: implications for cumulative risk assessment. *Toxicology* 2002; 171: 3-59.
2. Nakamura Y, Sugihara K, Sone T, *et al*. The *in vivo* metabolism of a pyrethroid insecticide, permethrin, its hydrolysis products in rats. Toxicology 2007; 235: 176-184.
3. Satoh T, Hosokawa M. Structure, function and regulation of carboxylesterase. *Chemical-Biological Interactions* 2006; 162: 195-211.
4. Crow JA, Borazjani A, Potter PM, *et al*. Hydrolysis of pyrethroids by human and rat tissues: Examination of intestinal, liver and serum carboxylesterase. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2007; 221: 1-12.
5. Jung L, Chuichang F. Solid phase extraction method for rapid isolation and clean-up of some synthetic pyrethroid insecticides from human urine and plasma. *Forensic Science International* 1991; 51: 89-93.
6. Abu-Qare AW, Abou-Donia MB. 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* 2001; 26: 291-299.
7. Avramides EJ. Long-term stability of pure standards and stock standard solutions for the determination of pesticide residues using gas chromatography. *Journal of chromatography A* 2005; 1080: 166-176.