

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ



E42192

IN VITRO METABOLISM OF PERMETHRIN IN CYTOCHROME P450
ENZYME FROM PYRETHROID RESISTANT AND
SUSCEPTIBLE *Aedes aegypti* STRAINS

PUCKAVADEE SOMWANG

DOCTOR OF PHILOSOPHY
IN PARASITOLOGY

THE GRADUATE SCHOOL
CHIANG MAI UNIVERSITY
AUGUST 2011



E42192

IN VITRO METABOLISM OF PERMETHRIN IN CYTOCHROME P450
ENZYME FROM PYRETHROID RESISTANT AND
SUSCEPTIBLE *Aedes aegypti* STRAINS



PUCKAVADEE SOMWANG

A THESIS SUBMITTED TO THE GRADUATE SCHOOL IN
PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENTS
FOR THE DEGREE OF
DOCTOR OF PHILOSOPHY
IN PARASITOLOGY

THE GRADUATE SCHOOL
CHIANG MAI UNIVERSITY


AUGUST 2011


IN VITRO METABOLISM OF PERMETHRIN IN CYTOCHROME P450
ENZYME FROM PYRETHROID RESISTANT AND
SUSCEPTIBLE *Aedes aegypti* STRAINS

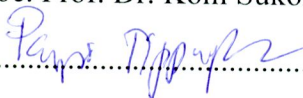
PUCKAVADEE SOMWANG


THIS THESIS HAS BEEN APPROVED
TO BE A PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENTS
FOR THE DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY
IN PARASITOLOGY


EXAMINING COMMITTEE

.......... CHAIRPERSON

Assoc. Prof. Dr. Pradya Somboon
.......... MEMBER

Assoc. Prof. Dr. Kom Sukontason
.......... MEMBER

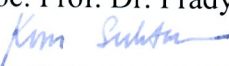
Assoc. Prof. Dr. Pongsri Tippawangkosol
.......... MEMBER

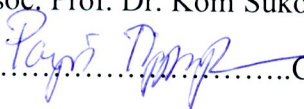
Dr. La-aied Prapanthadara
.......... MEMBER


Dr. Wannapa Suwonkerd

THESIS ADVISORY COMMITTEE

.......... ADVISOR

Assoc. Prof. Dr. Pradya Somboon
.......... CO-ADVISOR

Assoc. Prof. Dr. Kom Sukontason
.......... CO-ADVISOR

Assoc. Prof. Dr. Pongsri Tippawangkosol
.......... CO-ADVISOR

Dr. La-aied Prapanthadara

16 August 2011

ACKNOWLEDGEMENT

I wish to express my deep gratitude and appreciation to my major advisor, Associate Professor Dr. Pradya Somboon (Department of Parasitology, Faculty of Medicine, Chiang Mai University). His kindness, guidance, valuable suggestions, constructive criticism and constant encouragement have enabled to me to complete my doctoral study.

I also wish to express my deep gratitude and appreciation to my-co advisors, Dr. La-aied Prapanthadara, Dr. Nongkran Lumjuan (Research Institute for Health Sciences) and Dr. Catherine Walton (Faculty of Life Sciences, The University of Manchester) for their kindness, valuable guidance, meaningful criticism and help during my doctoral research.

I would like to thank Associate Professor Dr. Kom Sukontason and Associate Professor Dr. Pongsri Tippawangkosol (Department of Parasitology, Faculty of Medicine, Chiang Mai University), for serving as my internal examiners. I also thank Dr. Wannapa Suwonkerd (Office of the Vector Borne Disease Control Region 10, Department of Communicable Disease Control, Ministry of Public Health, Chiang Mai), for serving as my external examiner. My thanks go to Mrs. Posri Leelapat, Mrs. Warissara Suwan and staff members of Research Institute for Health Sciences, for their help advice and assistance in HPLC analysis.

This research was supported by grants from the Basic Science (BRG5080010 to La-aied Prapanthadara), the Royal Golden Jubilee Ph.D. Program (PHD/0145/2548 to Pradya Somboon and Puckavadee Somwang). We thank Faculty of Medicine,

Chiang Mai University and Research Institute for Health Sciences for facility. I also would like to thank staff members of the Department of Parasitology, Faculty of Medicine, Chiang Mai University, for their help and valuable guidance and constant encouragement throughout my studies.

Finally, I wish to express my deepest gratitude to my beloved parents and family for their encouragement and moral support throughout my study.

Puckavadee Somwang

Thesis Title In Vitro Metabolism of Permethrin in Cytochrome P450 Enzyme from Pyrethroid Resistant and Susceptible *Aedes aegypti* Strains

Author Miss Puckavadee Somwang

Degree Doctor of Philosophy (Parasitology)

Thesis Advisory Committee

Assoc. Prof. Dr. Pradya Somboon	Advisor
Assoc. Prof. Dr. Kom Sukontason	Co-advisor
Assoc. Prof. Dr. Pongsri Tippawangkosol	Co-advisor
Dr. La-aied Prapanthadara	Co-advisor

ABSTRACT

E 42192

Control of *Aedes aegypti*, the principal vector of dengue virus, by using insecticides has led to resistance throughout the world. Previous studies have shown that permethrin resistance in selected PMD-R strain of *Ae. aegypti* from Chiang Mai, Thailand, was associated with a homozygous mutation in the knockdown resistance (*kdr*) gene and other mechanisms. In this study, the metabolic mechanism of resistance of this strain was compared to the PMD strain which is susceptible to permethrin. The permethrin susceptibility of larvae was determined by dose-response bioassay. Two synergists, namely piperonyl butoxide (PBO) and bis-(4-nitrophenyl)-phosphate (BNPP), were also added to determine if the resistance is conferred by oxidase or esterase enzymes, respectively. The LC_{50} value for PMD-R (25.42 ppb) was ~25-fold higher than for PMD (1.02 ppb). The LC_{50} was reduced 3.03-fold in PMD-R and 2.27-fold in PMD when the oxidase inhibitor (PBO) was added, but little or no reduction was observed in the presence of BNPP, indicating that oxidase

enzymes play an important role in resistance. However, the LC_{50} previously observed in the heterozygous mutation form was reduced ~8-fold, indicating that metabolic resistance is inferior to *kdr*. The levels of cytochrome P450 (P450) extracted from fourth instar larvae were similar in both strains and were about 2.3-fold greater in microsomal fractions than in crude supernatant and cytosol fractions. Microsome oxidase activities were determined by incubation with each of three substrates, i.e., permethrin, phenoxybenzyl alcohol (PBOH) and phenoxybenzaldehyde (PBCHO), in the presence or absence of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH), nicotinamide adenine dinucleotide (NAD^+), PBO, and BNPP. It is known that hydrolysis of permethrin produces PBOH which is further oxidized to PBCHO by alcohol dehydrogenase (ADH) and then to phenoxybenzoic acid (PBCOOH) by aldehyde dehydrogenase (ALDH). When incubated with permethrin, a small amount of PBCOOH was detected in both strains (about 1.1-1.2 nmole/min/mg protein), regardless of the addition of NADPH. The addition of PBO resulted in about 70% and 50% reduction of PBCOOH in PMD and PMD-R, respectively. The addition of BNPP reduced PBCOOH about 50% and 35% in PMD and PMD-R, respectively. Using PBOH as substrate increased PBCOOH ~16-fold and ~40-fold in PMD and PMD-R, respectively. Using PBCHO as substrate increased PBCOOH ~26-fold and ~50-fold in PMD and PMD-R, respectively. The addition of NADPH, and particularly NAD^+ , increased the level of PBCOOH. Together, the results have indicated the presence of a metabolic mechanism involving P450, ADHs, and ALDHs in both PMD and PMD-R strains, with greater enzyme activity in the latter.

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์

เมแทบอลิซึมของเพอร์เมธรินในหลอดทดลองใน
เอนไซม์ไซโตโครม พี450 จากยุงลายสายพันธุ์ที่ดื้อ
และไวต่อไพรีทรอยด์

ผู้เขียน

นางสาวกคดี สมหวัง

ปริญญา

วิทยาศาสตร์คณิบัณัติ (ปรสตีวิทยา)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

รศ. ดร. รัชญา สมบูรณ์	อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
รศ. ดร. นพ. กม สุคนธรรพ์	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
รศ. ดร. ผ่องศรี ทิพวงโกศล	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
ดร. ละเอียด ประพันธ์คารา	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

E 42192

การควบคุมยุงลาย *Aedes aegypti* พาหะนำเชื้อไวรัสเด็งกีโดยการใช้สารเคมีฆ่าแมลง ทำให้เกิดการดื้อต่อสารเคมีขึ้นทั่วโลก จากการศึกษาที่ผ่านมาถึงกลไกการดื้อต่อเพอร์เมธรินในยุงลายสายพันธุ์ PMD-R จากจังหวัดเชียงใหม่ พบว่ามีความสัมพันธ์กับการกลายพันธุ์แบบจับคู่เหมือน (homozygous) ของ *kdr* (knockdown resistance) ยีน และมีกลไกอื่นร่วม ในการศึกษาครั้งนี้ได้เปรียบเทียบเมแทบอลิซึมต่อการย่อยสลายเพอร์เมธรินในยุงลายสายพันธุ์ PMD-R กับสายพันธุ์ PMD ซึ่งไวต่อเพอร์เมธริน โดยการวัดระดับความไวต่อเพอร์เมธรินของลูกน้ำโดยวิธี dose-response bioassay และใส่สาร piperonyl butoxide (PBO) และ bis-(4-nitrophenyl)-phosphate (BNPP) เพื่อทดสอบว่ากลไกการดื้อเกี่ยวข้องกับเอนไซม์ออกซิเดสหรือเอสเทอร์เรสตามลำดับ พบว่าค่า LC_{50} ของสายพันธุ์ PMD-R (25.42 ppb) สูงกว่าสายพันธุ์ PMD (1.02 ppb) ประมาณ 25 เท่า เมื่อเติม PBO ค่า LC_{50} ของสายพันธุ์ PMD-R ลดลง 3.03 เท่า และของสายพันธุ์ PMD ลดลง 2.27 แต่พบการเปลี่ยนแปลงน้อยมากเมื่อเติม BNPP แสดงว่าเอนไซม์ออกซิเดสมีบทบาทสำคัญต่อการดื้อเพอร์เมธริน อย่างไรก็ตามในการศึกษาที่ผ่านมาค่า LC_{50} ของยุงที่มี *kdr* ยีนแบบจับคู่ต่าง (heterozygous) ลดลงประมาณ 8 เท่าแสดงว่ากลไกการดื้อโดยเมแทบอลิซึม มีประสิทธิภาพด้อยกว่า จากการวัดปริมาณไซโตโครม พี 450 ที่สกัดจากลูกน้ำยุงระยะที่สี่ของยุงทั้งสองสายพันธุ์พบว่ามีปริมาณพอๆกัน โดยมีในส่วนไมโครโซมมากกว่าส่วนสัคตหยาบและ ไซโทซอล 2.3 เท่า สารสกัดไมโครโซมจึงถูกนำมาศึกษาการทำงานของเอนไซม์ออกซิเดสต่อการ

เมแทบอลิซึมเพอร์เมธรินในหลอดทดลองโดยให้ทำปฏิกิริยากับสารเพอร์เมธริน, phenoxybenzyl alcohol (PBOH) และ phenoxybenzaldehyde (PBCHO) กับการเติมหรือไม่เติม nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH), nicotinamide adenine dinucleotide (NAD^+), PBO และ BNPP เนื่องจากเป็นที่รู้กันว่ากระบวนการเมแทบอลิซึมเพอร์เมธรินในขั้นแรกจะถูกไฮโดรไลซิสได้ PBOH และถูกออกซิไดซ์ต่อโดยเอนไซม์แอลกอฮอล์ ดีไฮโดรจีเนส (alcohol dehydrogenase, ADH) ได้ PBCHO และ phenoxybenzoic acid (PBCOOH) โดยเอนไซม์แอลดีไฮด์ ดีไฮโดรจีเนส (aldehyde dehydrogenase, ALDH)

ผลการศึกษาพบว่าเมื่อบ่มเพอร์เมธรินกับไมโครโซมแล้ววัดผลผลิตจากการเมแทบอลิซึม (PBCOOH) พบว่าในทั้งสองสายพันธุ์ย่อยสลายเพอร์เมธรินได้เพียงเล็กน้อย (1.1-1.2 nmol/min/mg protein) ไม่ว่าจะเป็น NADPH หรือไม่ก็ตาม เมื่อเติม PBO พบว่า PBCOOH ลดลง 70% และ 50% ในขลุ่ยสายพันธุ์ PMD และ PMD-R และเมื่อเติม BNPP พบว่า PBCOOH ลดลง 50% และ 35% ในขลุ่ยสายพันธุ์ PMD และ PMD-R ตามลำดับ เมื่อใช้ PBOH เป็นสารตั้งต้นพบว่าเอนไซม์จากสารสกัดไมโครโซมสามารถย่อยสลายได้ดีกว่าเมื่อใช้เพอร์เมธรินเป็นสารตั้งต้น โดยวัด PBCOOH ได้มากขึ้น 16 และ 40 เท่าในขลุ่ยสายพันธุ์ PMD และ PMD-R เช่นเดียวกับเมื่อใช้ PBCHO เป็นสารตั้งต้นสามารถวัด PBCOOH ได้มากขึ้น 26 และ 50 เท่าในขลุ่ยสายพันธุ์ PMD และ PMD-R ตามลำดับ เมื่อเติมตัวเร่งปฏิกิริยา NADPH และโดยเฉพาะอย่างยิ่ง NAD^+ พบว่าสามารถเร่งกระบวนการเมแทบอลิซึมได้มากขึ้น จากผลการศึกษาครั้งนี้กล่าวได้ว่าเอนไซม์ไซโตโครม พี 450, แอลกอฮอล์ ดีไฮโดรจีเนส และแอลดีไฮด์ ดีไฮโดรจีเนสเกี่ยวข้องกับกระบวนการเมแทบอลิซึมเพอร์เมธรินในขลุ่ยทั้งสองสายพันธุ์ แต่การย่อยสลายเกิดขึ้นมากกว่าในสายพันธุ์ PMD-R

TABLE OF CONTENTS

	Page
ACKNOWLEDGEMENTS	iii
ABSTRACT (IN ENGLISH)	v
ABSTRACT (IN THAI)	vii
TABLE OF CONTENTS	ix
LIST OF TABLES	xii
LIST OF FIGURES	xv
ABBREVIATIONS AND SYMBOLS	xix
CHAPTER I INTRODUCTION	1
1. Statement and significance of the problem	1
2. Literature review	4
2.1 <i>Aedes aegypti</i> and insecticide resistance	4
2.2 Biology of insecticide resistance and resistance management	5
2.3 Permethrin and permethrin metabolism	7
2.4 Permethrin resistance	10
2.5 Insecticide resistance mechanisms	11
2.5.1 Target site mechanism	11
2.5.2 Metabolic detoxification mechanism	11
2.5.2.1 Esterase-based resistance	12
2.5.2.2 Glutathione S-transferase (GST-based resistance)	12
2.5.2.3 Oxidases-based resistance	13

TABLE OF CONTENTS (continued)

	Page
3. Purposes of this study	24
4. Significance of this research	24
CHAPTER II MATERIALS AND METHODS	25
1. Mosquito strains	25
2. Rearing mosquitoes	25
3. Dose-response bioassay test for mosquito larvae	26
4. HPLC validation methods	28
5. In vitro permethrin metabolism assay	30
6. Determination of P450s levels	37
CHAPTER III RESULTS	39
1. Dose-response bioassay test of mosquito larvae	39
2. Determination of P450s levels	42
3. HPLC method validation	46
3.1 Linearity	46
3.2 Accuracy and precision	46
3.3 Limit of Detection and Limit of Quantification	46
4. In vitro metabolism of permethrin, PBOH, and PBCHO by microsomal enzymes	57
4.1 Permethrin metabolism	57
4.2 Oxidase activity of microsome preparation toward PBOH	61
4.3 Oxidase activity of microsome preparation toward PBCHO	67

TABLE OF CONTENTS (continued)

	Page
CHAPTER IV DISCUSSION	72
CHAPTER V CONCLUSION	76
REFERENCES	78
APPENDIX	87
CURRICULUM VITAE	105

LIST OF TABLES

Table		Page
1	Reactions catalyzed by cytochrome P450	17
2	Total number of P450s (excluding pseudogenes) determined from the genomes of six insect species, relative to four mammals	19
3	A highly speculative estimation of the relative percentages of P450s involved in various biological processes of a generalized insect	20
4	Classification of detoxification genes in <i>Drosophila melanogaster</i> , <i>Anopheles gambiae</i> and <i>Aedes aegypti</i>	22
5	Reaction mixture for in vitro permethrin metabolism	36
6	Cytochrome C standard assay	38
7	Susceptibility of PMD and PMD-R larvae to permethrin in the presence of PBO or BNPP after 24-h exposure	41
8	Absorbance values of 5 concentrations of standard cytochrome C	43
9	Equivalent units of cytochrome P450s content in different enzyme fractions of PMD and PMD-R strains compared between with and without PD-10 desalting purification	44
10	Detected peak areas of seven concentrations of standard permethrin	47

LIST OF TABLES (continued)

Table		Page
11	Detected peak areas of seven concentrations of standard PBOH	48
12	Detected peak areas of seven concentrations of standard PBCHO	49
13	Detected peak areas of seven concentrations of standard PBCOOH	50
14	The regression equation and the correlation coefficient of permethrin, PBOH, PBCHO and PBCOOH from linearity calibration curve	51
15	Concentrations of standard PBOH, PBCHO and PBCOOH after fortified with 2.5 ng/10 µl	52
16	Permethrin and its metabolite products, PBOH, PBCHO and PBCOOH formations after incubation with different PMD-R microsomal protein (Mic) in the presence of NADPH	55
17	Comparison of metabolite products after incubation the substrates, permethrin, PBOH and PBCHO with PMD-R microsomal fractions (Mic) with and without PD-10 desalting purification	56
18	Reaction mixtures for standard preparation	58

LIST OF TABLES (continued)

Table		Page
19	Permethrin and its metabolite products, PBOH, PBCHO and PBCOOH formations after incubation of the PMD and PMD-R microsomal fraction (Mic) in the presence or absence of co-enzyme and inhibitors (NADPH, BNPP and PBO)	59
20	Amount of PBOH and its metabolite products, PBCHO and PBCOOH formations after incubation of the PMD and PMD-R microsomal fraction (Mic) in the presence or absence of co-enzymes and inhibitors (NADPH, NAD ⁺ , BNPP and PBO)	66
21	Amount of PBCHO and its metabolite product, PBCOOH formations after incubation of the PMD and PMD-R microsomal fraction (Mic) in the presence or absence of co-enzymes and inhibitor (NADPH, NAD ⁺ , and PBO)	71

LIST OF FIGURES

Figure	Page
1 Dengue and dengue hemorrhagic fever cases in Thailand, 2000-2010	6
2 Permethrin structure	7
3 Postulated metabolic pathways of <i>cis</i> - and <i>trans</i> - permethrins by rat liver preparations	9
4 Cross-resistance relationships of commonly used classes of insecticides	10
5 The oxidation of ethanol by alcohol dehydrogenase	14
6 The oxidation of acetaldehyde	14
7 Reaction cycle of cytochrome P450. Diagram shows the binding of substrate, transfer of the first and second electrons from NADPH-cytochrome P450 reductase, and binding of O ₂	16
8 A schematic diagram of the enzymes preparation	31
9 Peroxidase reaction	37
10 The log dose-probit mortality lines of the PMD and PMD-R strains after exposure to permethrin with and without synergists (PBO and BNPP).	40

LIST OF FIGURES (continued)

Figure		Page
11	Cytochrome C standard curve. The cytochrome C standard curve was used to measure the P450s levels. The curve had an R^2 value of 0.985 and the equation used was $y = 60.21x - 0.261$.	43
12	The equivalent units of total P450/mg protein in the PMD and PMD-R strains after PD-10 desalting purification. The different letters (a and b) indicate significant difference ($p < 0.05$) among the enzyme fractions.	45
13	Linearity curve of permethrin concentrations and peak areas. The curve had the R^2 value of 0.9986 and the equation used was $y = 2742.6x - 12287$.	47
14	Linearity curve of PBOH concentrations and peak areas. The curve had the R^2 value of 0.9997 and the equation used was $y = 2537.1x - 2436.8$.	48
15	Linearity curve of PBCHO concentrations and peak areas. The curve had the R^2 value of 0.9934 and the equation used was $y = 4505.1x - 26792$.	49
16	Linearity curve of PBCOOH concentrations and peak areas. The curve had the R^2 value of 0.9905 and the equation used was $y = 3953.9x - 10060$.	50

LIST OF FIGURES (continued)

Figure		Page
17	HPLC chromatogram of the standard chemicals. RT = retention time in minutes. Standard chemical concentrations are indicated as nanogram per injection.	58
18	HPLC elution profile of permethrin metabolites separated in a C-18 reverse phase column. (A) Permethrin and its metabolites, PBOH, PBCHO and PBCOOH peaks were detected at retention times 13.0, 4.5, 8.5 and 5.3. (B) The peak area of PBOH, PBCHO and PBCOOH was magnified in order to visualize metabolites produced as a result of the permethrin metabolism.	60
19	HPLC elution profile of PBOH metabolites separated in a C-18 reverse phase column. PBOH and its metabolites, PBCHO and PBCOOH peaks were detected at retention times 4.5, 8.6 and 5.2.	63
20	HPLC elution profile of PBOH metabolites in the presence of NADPH separated in a C-18 reverse phase column. PBOH and its metabolites, PBCHO and PBCOOH peaks were detected at retention times 4.5, 8.6 and 5.2.	64

LIST OF FIGURES (continued)

Figure		Page
21	HPLC elution profile of PBOH metabolites in the presence of NAD^+ separated in a C-18 reverse phase column. PBOH and its metabolites, PBCHO and PBCOOH peaks were detected at retention times 4.5, 8.6 and 5.2.	65
22	HPLC elution profile of PBCHO metabolites separated in a C-18 reverse phase column. PBCHO and its metabolite, PBCOOH peaks were detected at retention times 8.6 and 5.2.	68
23	HPLC elution profile of PBCHO metabolites in the presence of NADPH separated in a C-18 reverse phase column. PBCHO and its metabolite, PBOH and PBCOOH peaks were detected at retention times 8.6, 4.5 and 5.2.	69
24	HPLC elution profile of PBCHO metabolites in the presence of NAD^+ separated in a C-18 reverse phase column. PBCHO and its metabolite, PBOH and PBCOOH peaks were detected at retention times 8.6, 4.5 and 5.2.	70

ABBREVIATIONS AND SYMBOLS

~	approximate
%	percentage
<	less than
et al	and others
i.e.	id est
e.g.	exempli gratia
ADH	alcohol dehydrogenase
ALDH	aldehyde dehydrogenase
BNPP	Bis(4-nitrophenyl)-phosphate
BSA	bovine serum albumin
°C	degree Celcius
conc.	concentration
cm	centimeter
CI	confidence interval
CYP	cytochrome P450
DDT	dichlorodiphenyltrichloroethane
DTT	dithiothreitol
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
g	gram
GABA	γ -aminobutyric acid
GSH	glutathione

GST	Glutathione S-transferases
G6PD	glucose-6-phosphate dehydrogenase
G6P	glucose-6-phosphate
h	hour
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
H ₂ O ₂	hydrogen peroxide
<i>kdr</i>	knockdown resistance
LC	lethal concentration
LOD	Limit of detection
LOQ	Limit of quantification
M	molar
mM	millimolar
mm	millimeter
ml	milliliter
mg	milligram
min	minute
MFOs	mixed-function oxidases
MW	molecular weight
n	number of examined
ng	nanogram
nm	nanometer
nmole	nanomole
NAD ⁺	nicotinamide adenine dinucleotide

NADPH	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
OPs	Organophosphorus insecticides
<i>p</i>	propability
ppb	parts per billion
P450s	cytochrome P450
PBOH	3-phenoxybenzyl alcohol
PBCHO	3-phenoxybenzylaldehyde
PBCOOH	3-phenoxybenzoic acid
PBO	piperonyl butoxide
PMD	Pang Mai Daeng
PMD-R	Pang Mai Daeng Resistance
PMSF	phenylmethysulphonyl fluoride
rpm	revolutions per minute
R^2	correlation coefficient
SE	standard error
SD	standard deviation
SR	synergist ratio
TMBZ	tetramethyl benzidine
WHO	World Health Organization
μ l	microliter
μ m	micrometer