

การพัฒนากระบวนการสกัดสารบิสฟีนอลเอและสารบิสฟีนอลเอกลูคูโรไซด์ เพื่อใช้ในการตรวจด้วย
เทคนิคลิควิดโครมาโทกราฟี แทนเดิมแมสสเปกโทรเมทรี



นางสาวขวัญชนก สาริกิจ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาชีวเคมีคลินิกและอนุทางการแพทย์ ภาควิชาเคมีคลินิก

คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2558

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

DEVELOPMENT OF BISPHENOL A AND BISPHENOL A GLUCURONIDE EXTRACTION METHODS FOR LIQUID CHROMATOGRAPHY TANDEM MASS SPECTROMETRY ANALYSIS

Miss Kwanchanok Sareekit



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Clinical Biochemistry and Molecular
Medicine

Department of Clinical Chemistry

Faculty of Allied Health Sciences

Chulalongkorn University

Academic Year 2015

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การพัฒนากระบวนการสกัดสารบิสฟีนอลเอและสารบิสฟีนอลเอกลูคูโรไซด์ เพื่อใช้ในการตรวจด้วยเทคนิคคลิกโครมาโทกราฟี แทนเติมแมสสเปกโทรเมทรี
โดย	นางสาวขวัญชนก สารীগิจ
สาขาวิชา	ชีวเคมีคลินิกและอณูทางการแพทย์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	อาจารย์ ดร.ศิริพร แสงสุธรรม
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิโรจน์ บุญรัตน์กรกิจ

คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

.....คณบดีคณะสหเวชศาสตร์
(รองศาสตราจารย์ ดร.ประวิตร เจนวรรธนะกุล)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.รัชนา ศานติยานนท์)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(อาจารย์ ดร.ศิริพร แสงสุธรรม)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิโรจน์ บุญรัตน์กรกิจ)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.หทัยกานต์ มนัสปิยะ)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(อาจารย์ ดร.นริสา เก่งตรง บดีรัฐ)

ขวัญชนก สารีกิจ : การพัฒนากระบวนการสกัดสารบิสฟีนอลเอและสารบิสฟีนอลเอกลูคูโรไนด์ เพื่อใช้ในการตรวจด้วยเทคนิคลิควิดโครมาโทกราฟี แทนเดิมแมสสเปกโทรเมตรี (DEVELOPMENT OF BISPHENOL A AND BISPHENOL A GLUCURONIDE EXTRACTION METHODS FOR LIQUID CHROMATOGRAPHY TANDEM MASS SPECTROMETRY ANALYSIS) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก:
อ. ดร.ศิริพร แสงสุธรรม, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: ผศ. ดร.วิโรจน์ บุญรัตน์กรกิจ, 115 หน้า.

บิสฟีนอลเอ (Bisphenol A, BPA) เป็นสารเคมีที่มีฤทธิ์เป็น endocrine disruptor พบได้ในผลิตภัณฑ์ต่างๆ ในชีวิตประจำวัน เช่น บรรจุภัณฑ์ของอาหารหรือเครื่องดื่ม ขวดพลาสติก เป็นต้น การศึกษาครั้งนี้ ได้พัฒนากระบวนการสกัดสาร BPA ในน้ำผลไม้/น้ำผักสำเร็จรูปและพัฒนากระบวนการสกัดหาสารบิสฟีนอลเอกลูคูโรไนด์ (BPA-glucuronide, BPA-G) ในตัวอย่างปัสสาวะ เพื่อใช้ในการตรวจวัดด้วยลิควิดโครมาโทกราฟี แทนเดิมแมสสเปกโทรเมรี (LC-MS/MS) ในส่วนของน้ำผลไม้/น้ำผัก ได้พัฒนากระบวนการสกัดสารพลาไวโนอยด์ที่มีอยู่ในน้ำผลไม้/น้ำผักซึ่งมีโครงสร้างคล้ายคลึงกับ BPA ด้วย solid phase extraction โดยใช้สารละลาย Acetic acid/Acetonitrile เมื่อวิเคราะห์ด้วย LC-MS/MS พบว่าสามารถวิเคราะห์ BPA ได้ภายในเวลา 1 นาที และมีค่าการวิเคราะห์ที่กลับคืนในช่วง 82.73-108.79% ค่าขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัด เท่ากับ 0.05 ng/mL และขีดจำกัดต่ำสุดของการหาปริมาณ เท่ากับ 0.25 ng/mL ค่าความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน ($r^2 > 0.997$) ความเที่ยงตรงเมื่อวิเคราะห์ภายในวันเดียวกันและต่างวันกัน เท่ากับ 0.41-2.19% และ 3.62-5.75% ตามลำดับ ในการหาปริมาณ BPA ในน้ำผลไม้/น้ำผัก ที่วางขายในเขตกรุงเทพมหานคร พบว่าในน้ำผลไม้ไม่มีปริมาณ BPA ปนเปื้อนสูงสุด คือ 68.28 ng/mL สำหรับการพัฒนาวีธี salting-out assisted liquid/liquid extraction (SALLE) สำหรับสกัด BPA-G จากปัสสาวะ เมื่อวิเคราะห์ด้วย LC-MS/MS พบว่าค่าการวิเคราะห์ที่กลับคืนในช่วง 88.98-102.45% ค่าขีดจำกัดของการตรวจวัด เท่ากับ 0.4 ng/mL และขีดจำกัดของการหาปริมาณ เท่ากับ 1 ng/mL ค่าความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน ($r^2 > 0.998$) ความเที่ยงตรงเมื่อวิเคราะห์ภายในวันเดียวกันและต่างวันกัน เท่ากับ 1.95-4.99% และ 1.84-7.3% ตามลำดับ และเมื่อนำวิธี SALLE ที่พัฒนาขึ้นไปหาปริมาณ BPA-G ในปัสสาวะของผู้ร่วมโครงการวิจัย พบว่าปริมาณ BPA-G ในปัสสาวะสูงที่สุด เท่ากับ 769.62 $\mu\text{g/g}$ creatinine และต่ำที่สุด เท่ากับ 5.13 $\mu\text{g/g}$ creatinine ซึ่งวิธี SALLE ที่พัฒนาขึ้นนี้ สามารถนำไปใช้เพื่อหาปริมาณ BPA-G ในปัสสาวะ สำหรับงานวิจัยขั้นต่อไปได้

ภาควิชา เคมีคลินิก

สาขาวิชา ชีวเคมีคลินิกและอณูทางการแพทย์

ปีการศึกษา 2558

ลายมือชื่อนิสิต

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม

5576670937 : MAJOR CLINICAL BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR MEDICINE

KEYWORDS: BISPHENOL A / BPA-GLUCURONIDE / LC-MS/MS / SOLID PHASE EXTRACTION / SALLE

KWANCHANOK SAREEKIT: DEVELOPMENT OF BISPHENOL A AND BISPHENOL A GLUCURONIDE EXTRACTION METHODS FOR LIQUID CHROMATOGRAPHY TANDEM MASS SPECTROMETRY ANALYSIS. ADVISOR: DR.SIRIPORN SANGSUTHUM, CO-ADVISOR: ASST. PROF. VIROJ BOONYARATANAKORNKIT, 115 pp.

Bisphenol A (BPA) is an endocrine disrupting chemicals (EDCs) and found in everyday products i.e. food packaging, plastic bottles. This study, we developed extraction methods for quantified levels of BPA in fruit/vegetable juices and quantified levels of BPA-glucuronide (BPA-G) in urine before processed into Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS). For the quantitation of BPA in fruit/vegetable juices, we developed the new solid phase extraction (SPE) method using an acetic acid/acetonitrile system in order to distinguish flavonoids which have structural similarity to BPA in juices and interfere the quantification of BPA by LC-MS/MS. The results showed the efficient short analysis time (<1 min). The standard curve had a good linearity with $r^2 > 0.997$ with the recovery of extracted BPA using SPE were in the range 82.73-108.79%. The lower limit of detection (LLOD) depending on LC-MS/MS was 0.05 ng/mL and the lower limit of quantitation (LLOQ) was 0.25 ng/mL. The intraday and interday precisions for the quantitative analysis of BPA were in the range 0.41-2.19 and 3.62-5.75, respectively. The new SPE method was used for quantification BPA in fruit and vegetable juices sold in supermarkets in Bangkok, Thailand. The highest BPA level in fruit/vegetable juices was 68.28 ng/mL. Also we established a salting-out assisted liquid/liquid extraction (SALLE) for detecting BPA-G in urine by LC-MS/MS. The results showed efficiency of SALLE with the LLOD and LLOQ depended on LC-MS/MS were 0.4 ng/mL and 1 ng/mL, respectively. Standard curve had a good linear regression with $r^2 > 0.998$ and the recovery of extracted BPA-G using SALLE were in the range 88.98-102.45%. The intraday and interday precisions for the quantitative analysis of BPA-G were in the range 1.95-4.99% and 1.84-7.3%, respectively. The highest BPA-G level in urine was 769.62 $\mu\text{g/g}$ creatinine and the lowest BPA-G level was 5.13 $\mu\text{g/g}$ creatinine. The new SALLE method could apply for the quantitation of BPA-G in persons who expose to BPA in further study.

Department: Clinical Chemistry

Student's Signature

Field of Study: Clinical Biochemistry and
Molecular Medicine

Advisor's Signature

Co-Advisor's Signature

Academic Year: 2015

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ด้วยความกรุณาจาก อาจารย์ ดร. ศิริพร แสงสุธรรม ที่รับเป็นอาจารย์ที่ปรึกษา และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วิโรจน์ บุญรัตนกรกิจ ที่รับเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ซึ่งคอยให้คำแนะนำและแก้ไขปัญหาต่างๆที่เกิดขึ้นระหว่างการทำวิจัย

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. รัชนา ศานติยานนท์ ที่กรุณาได้รับเป็นประธานกรรมการในการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ และ รองศาสตราจารย์ ดร. หทัยกานต์ มนัสปิยะ และ อาจารย์ ดร. นริสา เก่งตรง บดีรัฐ ที่กรุณาได้รับเป็นกรรมการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิตในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ ทนุอดหนุนวิทยานิพนธ์สำหรับนิสิต จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ครั้งที่ 3/2557 ภาคการศึกษาปลาย ปีการศึกษา 2556 ปีงบประมาณ 2557 และทุนอุดหนุนการศึกษา เพื่อทำหน้าที่ผู้ช่วยสอน คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ขอขอบพระคุณ หลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเทคนิคการแพทย์ และ หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิตสาขาวิชาชีวเคมีคลินิกและอนุทางการแพทย์

ขอขอบพระคุณ ศูนย์วิทยาศาสตร์ฮาลาล จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาให้ความอนุเคราะห์การใช้เครื่องมือเพื่อการวิจัย

สุดท้ายนี้ ขอขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ ครอบครัว เพื่อนๆ พี่ๆน้องๆ ทุกท่านที่คอยให้กำลังใจ ให้ความช่วยเหลือและให้คำปรึกษาในการทำวิจัย จนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฎ
สารบัญภาพ	ฐ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 ปัญหาในงานวิจัย	4
1.3 สมมติฐานของการวิจัย.....	5
1.4 วัตถุประสงค์ของโครงการ	5
1.5 ขอบเขตของการวิจัย.....	5
1.6 กรอบแนวความคิด.....	6
1.7 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	6
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	7
2.1 สารเคมีต่างๆที่รบกวนการทำงานของต่อมไร้ท่อ (Endocrine disrupting chemical).....	7
2.2 ลักษณะทั่วไป คุณสมบัติ และการใช้ประโยชน์จากสาร Bisphenol A	8
2.3 กลไกการทำงานปกติของ steroid hormone และกลไกการทำงานของสารเคมีที่เป็น endocrine disruptors	9
2.4 กลไกการออกฤทธิ์ของ BPA.....	12
2.4.1 BPA ออกฤทธิ์เป็น xenoestrogen	12
2.4.2 BPA สามารถจับกับ estrogen-related receptor gamma	14
2.4.3 BPA ขัดขวาง Thyroid hormone pathway	15

2.4.4 BPA สามารถจับกับ glucocorticoid receptor (GR).....	15
2.4.5 BPA รบกวนการทำงานของ androgen system.....	15
2.4.6 BPA รบกวน immune system	15
2.4.7 BPA กับ epigenetic modifications.....	16
2.5 Toxicokinetic และ เมทาบอลิซึม ของ BPA.....	17
2.6 ผลกระทบของ BPA ต่อสัตว์ทดลองและเซลล์เพาะเลี้ยง.....	18
2.7 ผลกระทบของ BPA ต่อร่างกายมนุษย์.....	19
2.8 มาตรการควบคุมการใช้สาร BPA.....	20
2.9 การตรวจหาปริมาณสาร BPA ในบรรจุภัณฑ์.....	20
2.10 การตรวจหาปริมาณสาร BPA ในร่างกายมนุษย์.....	21
2.11 การเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ BPA และ BPA-G.....	23
2.11.1 Liquid-liquid extraction (LLE).....	23
2.11.2 Solid phase extraction (SPE).....	24
2.11.3 Salting-out assisted liquid/liquid extraction (SALLE)	25
2.12 เทคนิคที่ใช้วิเคราะห์ BPA และ BPA-G.....	26
2.12.1 High-performance liquid chromatography (HPLC)	26
2.12.2 Liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS)	27
2.12.3 Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS)	28
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	29
3.1 เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย.....	29
3.2 สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย.....	30
3.3 ตัวอย่างที่ใช้ในการวิจัย	31
3.4 วิธีการวิจัย	31

3.4.1 การเตรียมอุปกรณ์และเครื่องแก้วก่อนทำการวิจัย	31
3.4.2 การหาปริมาณ BPA ในน้ำผลไม้/น้ำผักสำเร็จรูป	31
3.4.3 การหาปริมาณ BPA-G ในตัวอย่างปัสสาวะ	36
บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปรายผล.....	44
4.1 การพัฒนากระบวนการสกัด BPA จากน้ำผลไม้/น้ำผักสำเร็จรูป ด้วย solid phase extraction (SPE) เพื่อใช้ในการตรวจด้วยเทคนิค LC-MS/MS.....	44
4.1.1 การพัฒนาวิธีเพื่อแยก flavonoids ออกจากน้ำผลไม้ (น้ำส้ม 100%) ออกจาก BPA โดยวิธี High-Performance Liquid Chromatography (HPLC)	44
4.1.2 การหาปริมาณ BPA ในน้ำผลไม้/น้ำผัก ด้วยเทคนิค Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS)	52
4.1.3 ผลการวิเคราะห์สารมาตรฐาน BPA ด้วยเทคนิค Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS)	53
4.1.4 ผลการวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำผลไม้/น้ำผักด้วยเทคนิค เทคนิค Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS).....	62
4.2 การพัฒนากระบวนการสกัด BPA-G ในปัสสาวะ ด้วย salting-out assisted liquid/liquid extraction (SALLE) เพื่อใช้ในการตรวจด้วยเทคนิค LC-MS/MS	72
4.2.1 การหาปริมาณ BPA-G ในปัสสาวะด้วยเทคนิค Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS).....	73
4.2.2 ผลการวิเคราะห์สารมาตรฐาน BPA-G ด้วยเทคนิค Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS).....	74
4.2.3 ผลการวิเคราะห์สิ่งตัวอย่างปัสสาวะด้วยเทคนิคเทคนิค Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS).....	86
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย.....	90
รายการอ้างอิง	92
ภาคผนวก ก การเตรียมสารละลายที่ใช้ในการทดลอง	104

ญ

หน้า

ภาคผนวก ข คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย	105
ภาคผนวก ค เอกสารจริยธรรมในมนุษย์.....	107
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์	115



สารบัญตาราง

ตารางที่ 1 Mobile phase ที่ใช้ในการวิเคราะห์ BPA ในน้ำผลไม้/น้ำผัก.....	34
ตารางที่ 2 MS/MS parameter ของ BPA และ BPA-d16.....	34
ตารางที่ 3 การเตรียม standard BPA-G ความเข้มข้น 0,1, 5, 10, 20, 30, 50 และ 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร.....	39
ตารางที่ 4 Mobile phase ที่ใช้ในการวิเคราะห์ BPA-G ในตัวอย่างปัสสาวะ.....	41
ตารางที่ 5 MS/MS parameter ของ BPA-G และ ¹³ C ₁₂ -BPAG.....	41
ตารางที่ 6 Chromatographic Conditions ของ solvent A.....	45
ตารางที่ 7 Chromatographic Conditions ของ solvent B.....	47
ตารางที่ 8 Chromatographic Conditions ของ solvent C.....	49
ตารางที่ 9 ค่า Capacity factor (K) และค่า Efficiency (N) สำหรับ Mobile phase ทั้ง 3 ระบบ.....	51
ตารางที่ 10 retention time, peak area และ peak area ratio ที่ได้จากการวิเคราะห์สารมาตรฐาน.....	58
ตารางที่ 11 ค่า nominal value, average measured value และ %CV ที่ได้จากการวิเคราะห์สารมาตรฐานที่ความเข้มข้น 5, 15, และ 50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร.....	61
ตารางที่ 12 ชนิดของบรรจุภัณฑ์ pH แหล่งผลิต และปริมาตรบรรจุของตัวอย่างน้ำผลไม้/น้ำผัก....	62
ตารางที่ 13 ข้อมูลของ retention time และ peak area และ area ratio ที่ได้จากการวิเคราะห์ของตัวอย่างตัวอย่างน้ำผลไม้/น้ำผัก.....	64
ตารางที่ 14 วันผลิต วันหมดอายุ วันวิเคราะห์ และปริมาณ BPA ที่ตรวจพบในน้ำผลไม้/น้ำผัก.....	66
ตารางที่ 15 % recovery ภายหลังจากสกัดด้วยวิธี SPE และ % CV.....	67
ตารางที่ 16 เปรียบเทียบระหว่าง สารละลายที่ใช้ชะ BPA (Solvent A (100% ACN) และ Solvent C (ACN, 2% HAC)) สำหรับการสกัด BPA จากน้ำผลไม้/น้ำผัก.....	69
ตารางที่ 17 รายละเอียดต่างๆของผู้ร่วมโครงการวิจัย.....	72

ตารางที่ 18 ข้อมูลของ ของ %recovery ที่ได้จากการวิเคราะห์จากตัวอย่างปัสสาวะด้วย SALLE method 74

ตารางที่ 19 ข้อมูลของ retention time, peak area และ peak area ratio ที่ได้จากการวิเคราะห์ 80

ตารางที่ 20 ค่า nominal value, average measured value และ %CV ที่ได้จากการวิเคราะห์สารมาตรฐานที่ความเข้มข้น 5, 20 และ 50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร 84

ตารางที่ 21 ค่า nominal value, average measured value และ %CV ที่ได้จากการวิเคราะห์สารมาตรฐานที่ความเข้มข้น 5, 30, และ 50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร 85

ตารางที่ 22 ปริมาณ BPA-G ที่พบในปัสสาวะของผู้ร่วมโครงการวิจัย 87



สารบัญภาพ

ภาพที่ 1	พลาสติกพอลิคาร์บอเนตหรืออีพอกซีเรซินที่ปล่อย BPA ออกมา	9
ภาพที่ 2	Steroid hormone receptor signaling pathway.....	11
ภาพที่ 3	การทำงานของสารเคมีที่เป็น endocrine disruptor (BPA).....	12
ภาพที่ 4	โครงสร้างทางเคมีของ BPA และ 17 β -estradiol.....	13
ภาพที่ 5	Classic ER pathway และ suggested BPA indirect pathway	13
ภาพที่ 6	Possible model for BPA-induced epigenetic effects.....	17
ภาพที่ 7	แผนภาพ physiologically based pharmacokinetic (PBPK) ของ BPA	18
ภาพที่ 8	แผนภาพของการสกัดแบบ LLE.....	24
ภาพที่ 9	แผนภาพของการสกัดแบบ SPE.....	25
ภาพที่ 10	แผนภาพของการสกัดแบบ SALLE	26
ภาพที่ 11	แผนภาพของส่วนประกอบของ HPLC	27
ภาพที่ 12	แผนภาพของส่วนประกอบของ LC-MS.....	27
ภาพที่ 13	แผนภาพของส่วนประกอบของ LC-MS/MS.....	28
ภาพที่ 14	หลักการ MRM	28
ภาพที่ 15	วิธีการสกัดน้ำผลไม้/น้ำผักด้วยวิธี SPE	33
ภาพที่ 16	MS/MS fragmentation ของ BPA (227.0 >132.9).....	34
ภาพที่ 17	MS/MS fragmentatiom ของ BPA-d16 (241.1 >141.9).....	35
ภาพที่ 18	การเตรียมสารมาตรฐานและตัวอย่างปัสสาวะด้วยวิธี SALLE	40
ภาพที่ 19	MS/MS fragmentation ของ Bisphenol A β -D glucuronide	42
ภาพที่ 20	MS/MS fragmentation ของ Bisphenol A ¹³ C ₁₂ β -D glucuronide.....	42
ภาพที่ 21	โครงสร้างของ BPA BPB และ flavonoids	44

ภาพที่ 22 โครมาโทแกรมของ Standard BPA และ BPB 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้ Solvent A เป็น mobile phase	46
ภาพที่ 23 โครมาโทแกรมของน้ำส้ม 100% ที่ spike BPA และ BPB 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้ Solvent A เป็น mobile phase.....	46
ภาพที่ 24 โครมาโทแกรมของ Standard BPA และ BPB 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้ Solvent B เป็น mobile phase	48
ภาพที่ 25 โครมาโทแกรมของ น้ำส้ม 100% ที่ spike BPA และ BPB 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้ Solvent B เป็น mobile phase.....	48
ภาพที่ 26 โครมาโทแกรมของ Standard BPA และ BPB 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้ Solvent C เป็น mobile phase	50
ภาพที่ 27 โครมาโทแกรมของ น้ำส้ม 100% ที่ spike BPA และ BPB 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้ Solvent C เป็น mobile phase.....	50
ภาพที่ 28 โครมาโทแกรมของ Blank (30% ACN).....	53
ภาพที่ 29 โครมาโทแกรมของสารมาตรฐาน BPA ความเข้มข้น 0 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร	54
ภาพที่ 30 โครมาโทแกรมของสารมาตรฐาน BPA ความเข้มข้น 2.5 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร	54
ภาพที่ 31 โครมาโทแกรมของสารมาตรฐาน BPA ความเข้มข้น 5 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร	55
ภาพที่ 32 โครมาโทแกรมของสารมาตรฐาน BPA ความเข้มข้น 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร	55
ภาพที่ 33 โครมาโทแกรมของสารมาตรฐาน BPA ความเข้มข้น 15 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร	56
ภาพที่ 34 โครมาโทแกรมของสารมาตรฐาน BPA ความเข้มข้น 25 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร	56
ภาพที่ 35 โครมาโทแกรมของสารมาตรฐาน BPA ความเข้มข้น 50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร	57
ภาพที่ 36 กราฟมาตรฐานสำหรับคำนวณปริมาณ BPA ในน้ำผลไม้/น้ำผัก.....	60
ภาพที่ 37 signal to noise ratio ของสารมาตรฐาน BPA ความเข้มข้น 0.05 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร	60
ภาพที่ 38 signal to noise ratio ของสารมาตรฐาน BPA ความเข้มข้น 0.25 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร	61

ภาพที่ 39 โครมาโทแกรมของตัวอย่างน้ำผลไม้ที่ spike ด้วย BPA-d16 ความเข้มข้น 5 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร	63
ภาพที่ 40 โครมาโทแกรมของ Blank (30% ACN).....	73
ภาพที่ 41 โครมาโทแกรมของสารมาตรฐาน BPA-G ความเข้มข้น 0 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร	75
ภาพที่ 42 โครมาโทแกรมของสารมาตรฐาน BPA-G ความเข้มข้น 1 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร	75
ภาพที่ 43 โครมาโทแกรมของสารมาตรฐาน BPA-G ความเข้มข้น 5 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร	76
ภาพที่ 44 โครมาโทแกรมของสารมาตรฐาน BPA-G ความเข้มข้น 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร	76
ภาพที่ 45 โครมาโทแกรมของสารมาตรฐาน BPA-G ความเข้มข้น 15 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร	77
ภาพที่ 46 โครมาโทแกรมของสารมาตรฐาน BPA-G ความเข้มข้น 20 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร	77
ภาพที่ 47 โครมาโทแกรมของสารมาตรฐาน BPA-G ความเข้มข้น 30 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร	78
ภาพที่ 48 โครมาโทแกรมของสารมาตรฐาน BPA-G ความเข้มข้น 50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร	78
ภาพที่ 49 โครมาโทแกรมของสารมาตรฐาน BPA-G ความเข้มข้น 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร	79
ภาพที่ 50 กราฟมาตรฐานที่เตรียมจาก human urine.....	82
ภาพที่ 51 กราฟมาตรฐานที่เตรียมจาก synthetic urine.....	82
ภาพที่ 52 signal to noise ratio ของสารมาตรฐาน BPA-G ความเข้มข้น 0.4 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร (วิเคราะห์จาก method blank)	83
ภาพที่ 53 signal to noise ratio ของสารมาตรฐาน BPA-G ความเข้มข้น 1 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร	83
ภาพที่ 54 โครมาโทแกรมของตัวอย่างปัสสาวะที่ spike ด้วย ¹³ C ₁₂ -BPAG ความเข้มข้น 20 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร.....	86

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

Bisphenol A (BPA) เป็นสารเคมีที่เป็นสารตั้งต้น โดยใช้เป็นสารตัวกลางในการผลิตของผลิตภัณฑ์ ตัวอย่างเช่น polycarbonate plastic และ epoxy resin ที่ใส่ลงไปเคลือบภายในกระป๋อง ทำหน้าที่เพิ่มความยืดหยุ่นและความแข็งแรงแก่ผลิตภัณฑ์ต่างๆ (1) สามารถพบในบรรจุภัณฑ์ต่างๆ เช่น กระป๋องอาหารหรือเครื่องดื่ม ขวดพลาสติก ขวดนม ใบเสร็จรับเงิน และเครื่องมือทางการแพทย์ เป็นต้น ทั่วโลกมีอัตราการผลิต BPA ต่อปี มากกว่า 10^9 kg (2, 3) ถึงแม้ว่า BPA จะมีประโยชน์ทางด้านอุตสาหกรรม แต่จากรายงานที่ผ่านมา พบว่า BPA ส่งผลกระทบต่อร่างกายมนุษย์ เพราะ BPA สามารถปนเปื้อนสู่อาหาร หรือเครื่องดื่มต่างๆ ที่ผู้คนบริโภคในแต่ละวันได้ (4) สาเหตุที่ BPA สามารถปนเปื้อนไปสู่อาหารได้ เนื่องจากกระบวนการผลิตกระป๋องอาหารหรือเครื่องดื่ม ต้องผ่านกระบวนการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์และสปอร์ของจุลินทรีย์ เพื่อป้องกันไม่ให้อาหารหรือเครื่องดื่มเน่าเสีย โดยใช้ความร้อนที่สูง รวมทั้งสภาพความเป็นกรดของอาหาร จึงเป็นปัจจัยที่ทำให้ BPA แพร่อกจากบรรจุภัณฑ์ และปนเปื้อนไปสู่อาหารหรือเครื่องดื่มได้ (5)

BPA มีคุณสมบัติเป็น endocrine disruptor โดยจะขัดขวางการทำงานของระบบฮอร์โมนที่ส่งผลกระทบต่อพัฒนาการและหน้าที่ของทั้งระบบสืบพันธุ์เพศหญิงและเพศชาย นอกจากนี้ยังส่งผลกระทบต่ออวัยวะอื่นๆ ได้ด้วย เช่น ต่อมไทรอยด์ เป็นต้น สำหรับการศึกษาล่าสุดส่วนใหญ่เน้นไปที่ estrogen signaling pathway และเป็นส่วนน้อยจะศึกษาใน androgen หรือ hormonal signaling pathway อื่นๆ (6, 7) ในส่วนของคุณสมบัติที่เป็น xenoestrogen นั้น BPA จะทำให้เกิดการตอบสนองต่างๆ คล้ายกับ 17β -estradiol หรือ E2 ซึ่ง BPA และ E2 มีคุณสมบัติบางอย่างที่คล้ายคลึงกัน เช่น โครงสร้าง การเมทาบอลิซึม และการออกฤทธิ์ (8) แต่ BPA จะออกฤทธิ์ต่ำกว่า E2 ประมาณ 10,000 เท่า โดยมีระบบสืบพันธุ์เป็นเป้าหมายหลัก (4) นอกจากนี้ยังถูกจัดอยู่ในกลุ่มของ selective estrogen receptor modulator (SERM) (6) โดยสามารถตอบสนองทั้งแบบเป็น estrogen receptor agonist หรือ estrogen receptor antagonist มีกลไกหลักคือเปลี่ยนแปลงการส่งสัญญาณของ estrogen นอกจากนี้ BPA ยังมีคุณสมบัติเป็น anti-androgenic effect ซึ่งส่งผลกระทบต่อการส่งสัญญาณของ androgen โดยผ่านหลายกลไก ซึ่งรบกวนการทำงานของ androgen receptor และมีรายงานการวิจัยเพิ่มเติมว่า สามารถไปรบกวนการส่งสัญญาณของ steroid receptor และ thyroid hormone system นอกจากนี้ยังส่งผลให้เกิด epigenetic modification ได้อีกด้วย (7, 9, 10) จากการศึกษาวิจัยด้านระบาดวิทยาในคน พบว่า การได้รับ

BPA ส่งผลกระทบต่อร่างกายแบบผสมในระยะยาว แม้ว่าจะมีค่าครึ่งชีวิต (half-life) ที่สั้นและขับออกจากร่างกายรวดเร็ว โดยสามารถขับออกจากร่างกายภายใน 6 ชั่วโมง (8) ซึ่งผลจากการได้รับสาร BPA ในปริมาณที่สูงจะส่งผลกระทบต่อระบบฮอร์โมนของร่างกาย ทำให้เกิดพิษต่อระบบสืบพันธุ์ โรคเมเร็งโรคกลุ่ม metabolic syndrome เช่น โรคอ้วน โรคเบาหวานชนิดที่ 2 เป็นต้น (6, 11)

BPA สามารถเข้าสู่ร่างกายผ่านการรับประทานเป็นหลัก นอกจากนี้ยังสามารถเข้าสู่ร่างกายทางการหายใจ และการซึมผ่านผิวหนังได้อีกด้วย (4) เมื่อ BPA เข้าสู่ร่างกายทางการบริโภค BPA จะถูกเมทาบอลิไทท์อย่างรวดเร็วและกำจัดออกจากร่างกายภายใน 6 ชั่วโมง โดย BPA จะเข้าสู่ทางเดินอาหารไปยังลำไส้เล็กแล้วถูกส่งไปยังตับเพื่อผ่านกระบวนการเมทาบอลิซึม โดย BPA จะ conjugate กับ UDP-glucuronic acid อย่างรวดเร็วผ่านเอนไซม์ uridine diphosphate-glucuronosyl transferase (UGT) ให้กลายเป็นเมทาบอลิไทท์ที่ละลายน้ำได้ ในรูปของ BPA-glucuronide (BPA-G) ซึ่งขับออกทางปัสสาวะปริมาณมากกว่า 80% และส่วนน้อย BPA จะไป conjugate กับ sulfate (BPA-S) หรือผ่านกระบวนการ hydroxylation ซึ่งจะขับออกทางปัสสาวะในปริมาณที่น้อยกว่า 1% นอกจากนี้ยังสามารถพบ free BPA ในปัสสาวะได้ด้วย ในปริมาณน้อยกว่า 1% และสำหรับบางส่วนของ free BPA ที่ไม่ผ่านกระบวนการเมทาบอลิซึมในตับ ก็จะเข้าสู่กระแสเลือด โดย free BPA นี้เองที่มีคุณสมบัติเป็น xenoestrogen และสามารถสะสมภายในเนื้อเยื่อไขมันภายในร่างกายได้ ส่วน BPA ที่เข้าสู่ร่างกายทางการหายใจและซึมผ่านทางผิวหนัง จะมีอัตราการขับออกจากร่างกายที่ต่ำกว่า (8, 12-14) จากการที่ BPA-G เป็นเมทาบอลิไทท์หลักของ BPA ที่สามารถพบได้ในปัสสาวะ ดังนั้น BPA-G จึงมีความเหมาะสมและสามารถใช้เพื่อเป็น marker ในการประเมินความเสี่ยงต่อการได้รับ BPA ได้ (15)

การประเมินความเสี่ยงจากการบริโภค BPA จากอาหาร พิจารณาได้จากค่า TDI (tolerable daily intake) หมายถึงปริมาณ BPA ที่ยอมรับให้บริโภคสูงสุดต่อวันโดยที่ไม่ก่อให้เกิดความเสี่ยงต่อสุขภาพ ประเมินจากการได้รับ BPA จากอาหารต่อน้ำหนักตัว ดังนั้น จึงต้องมีการหาปริมาณของ BPA ที่ปนเปื้อนในอาหาร และการประเมินความเสี่ยงหลังจากการได้รับ BPA เข้าสู่ร่างกายแล้ว จะประเมินจาก BPA-G ซึ่งเป็นรูปแบบของเมทาบอลิไทท์ส่วนใหญ่ที่ละลายน้ำได้แล้วขับออกทางปัสสาวะ โดยคิดจาก Total BPA ซึ่งมี 2 วิธี โดยวิธีที่ 1 คือ การหาปริมาณ BPA-G โดยตรง รวมกับปริมาณ free BPA และวิธีที่ 2 คือการหาปริมาณ BPA-G จากการนำปัสสาวะไปย่อยด้วย β -Glucuronidase รวมกับปริมาณ free BPA ซึ่งวิธีที่ 2 ต้องผ่านกระบวนการเตรียมตัวอย่างหลายขั้นตอน ได้แก่ ขั้นตอน enzymatic hydrolysis ขั้นตอนการสกัด ขั้นตอน clean up ซึ่งจะก่อให้เกิดการปนเปื้อนของ BPA ได้ (16) ต่างจากวิธีที่ 1 ซึ่งวิเคราะห์ปริมาณ BPA-G ซึ่งเป็นรูปแบบของเมทาบอลิไทท์ในปัสสาวะโดยตรง ที่ไม่สามารถพบได้ในสิ่งแวดล้อม ทำให้การหาปริมาณ BPA-G มีความรวดเร็วและให้ผลที่มีความน่าเชื่อถือ

การหาปริมาณ BPA และ BPA-G ด้วยเทคนิค Mass spectrometry มีวิธีการเตรียมตัวอย่าง และวิธีการสกัดหลายวิธี เช่น solid phase extraction (SPE), liquid-liquid extraction (LLE), sol-gel immunoaffinity chromatography และ salting-out assisted liquid/liquid extraction (SALLE) ในการเตรียมตัวอย่างด้วยวิธี SPE มีค่าใช้จ่ายสูง สามารถเกิดการปนเปื้อนของ BPA ได้ในระดับ 0.04 ไมโครกรัมกรัมต่อลิตร แต่สามารถกำจัดออกไปด้วยการ pre-washing ด้วย methanol (17) วิธี LLE มีข้อเสีย คือ ต้องใช้สารละลายที่ไม่ละลายกัน (immiscible solvents) ในปริมาณมาก และต้องใช้เวลานาน และขั้นตอนสุดท้ายต้อง clean up ตัวอย่างด้วย C18 cartridges ก่อนจะนำไปวิเคราะห์ด้วย Mass spectrometry (18) วิธี sol-gel immunoaffinity chromatography แม้จะมีข้อดี คือ เป็นวิธีที่มีความง่าย แต่มีข้อเสีย คือ สามารถเกิด cross-reactivity กับสารอื่นที่มีโครงสร้างคล้ายกับ BPA ได้ (19) วิธี SALLE มีข้อดี คือ ใช้เวลาในการเตรียมตัวอย่างน้อย ใช้สารละลายน้อย และประหยัดกว่าการใช้ conventional method เช่น LLE และ SPE (20)

การวิเคราะห์หาปริมาณ BPA และ BPA-G นั้น มีหลายวิธี เช่น High performance liquid chromatography (HPLC) โดยเครื่องตรวจวัดชนิด fluorescence detector ซึ่งเทคนิค HPLC มีข้อดีคือ ง่ายและมีความไวสูงถึงปานกลาง ข้อเสีย คือ อาจให้ผลเป็น false positives ได้ วิธี enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) ข้อดี คือ ความไวสูงมากและสามารถตรวจวัดปริมาณ BPA ได้ในระดับนาโนกรัมต่อมิลลิตร ข้อเสีย คือ ถ้าสารมีโครงสร้างคล้ายคลึงกับ BPA โดยเฉพาะอย่างยิ่ง bisphenols และอนุพันธ์ของ bisphenols ซึ่งอาจเกิด cross-reactivity ได้ เช่นเดียวกับวิธี sol-gel immunoaffinity chromatography สำหรับเทคนิควิเคราะห์ที่ได้รับการยอมรับว่าเป็นวิธีมาตรฐานสากล ได้แก่ Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS) หรือ Gas Chromatography-Tandem Mass Spectrometry (GC-MS/MS) ซึ่งสามารถวิเคราะห์หาปริมาณ BPA ได้ในปริมาณต่ำถึงระดับพิโคกรัม และมีความจำเพาะสำหรับใช้หาปริมาณ BPA โดยไม่ต้องตรวจยืนยันด้วยวิธีอื่นอีก (21, 22) แต่ข้อเสียของวิธี GC-MS/MS คือต้องใช้กระบวนการ derivatization ที่มีความยุ่งยากและซับซ้อนในการเตรียมตัวอย่าง (18)

ปัจจุบันน้ำผลไม้/น้ำผักสำเร็จรูป กำลังเป็นที่นิยมในสังคมไทย เนื่องจากในน้ำผลไม้เป็นแหล่งของแร่ธาตุ วิตามิน และสารต้านอนุมูลอิสระ จึงทำให้น้ำผลไม้เป็นที่นิยมบริโภคมากขึ้น แต่การปนเปื้อน BPA ในน้ำผลไม้สำเร็จรูป แม้ในปริมาณเพียงเล็กน้อย อาจส่งผลต่อสุขภาพได้ ดังนั้น เพื่อจะทำการตรวจวิเคราะห์ปริมาณ BPA ปนเปื้อนในน้ำผลไม้/น้ำผักนั้น จึงต้องการเทคนิควิเคราะห์ที่มีความไวสูง และมีความยุ่งยากไม่มากนักในการเตรียมตัวอย่างสำหรับการวิเคราะห์ คือ เทคนิค LC-MS/MS

อย่างไรก็ตาม ในการวิเคราะห์หาปริมาณ BPA ด้วย LC-MS/MS ต้องทำการสกัด BPA จาก น้ำผลไม้/น้ำผักด้วย SPE จากนั้นวิเคราะห์หาปริมาณ BPA โดยใช้ chromatographic condition แบบ binary gradient elution (23) ซึ่งต้องใช้เวลาานต่อหนึ่งตัวอย่าง ดังนั้น ผู้วิจัยจึงต้องการ พัฒนาวิธีการหาปริมาณ BPA ในน้ำผลไม้/น้ำผัก เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการตรวจวิเคราะห์ โดยใช้ วิธีสกัด คือ SPE และสารละลาย Acetic acid/Acetonitrile system เพื่อกำจัด flavonoids ที่มีอยู่ใน น้ำผลไม้/น้ำผัก ที่สามารถรบกวนการวิเคราะห์ BPA ออกไปก่อนวิเคราะห์ด้วยเทคนิค LC-MS/MS ทำให้วิเคราะห์ได้ภายใน 1 นาที และในประเทศไทยยังไม่มีงานวิจัยใดๆ ที่ทำการตรวจวัดปริมาณ BPA ในน้ำผลไม้/น้ำผัก ทั้งๆ ที่ผู้บริโภคมีแนวโน้มที่จะบริโภคน้ำผลไม้/น้ำผักเพื่อสุขภาพเพิ่มขึ้นใน ทุกๆ ปี ดังนั้นผู้วิจัยจึงสนใจที่จะนำวิธีที่ได้พัฒนาขึ้นนี้มาเพื่อใช้ในการตรวจวัดปริมาณ BPA ในน้ำ ผลไม้/น้ำผัก ที่สุ่มเลือกในร้านค้าจากกรุงเทพมหานคร ประเทศไทย จำนวน 21 ตัวอย่าง

สำหรับการตรวจประเมินความเสี่ยง หลังจากร่างกายบริโภคอาหารที่มีการปนเปื้อน BPA ต้องพิจารณาจาก total BPA ดังที่ได้กล่าวไปแล้วข้างต้น แต่เพื่อหลีกเลี่ยงการปนเปื้อน BPA จาก อุปกรณ์หรือสารละลายต่างๆ ที่ใช้เตรียมตัวอย่าง เพื่อการวิเคราะห์ ดังนั้น BPA-G ซึ่งเป็นเมทา บอไลต์หลักของ BPA ที่สามารถพบได้เป็นส่วนใหญ่ในปัสสาวะ จึงมีความเหมาะสมและสามารถใช้ เพื่อเป็น marker ในการประเมินความเสี่ยงต่อการได้รับ BPA ได้ (15) ดังนั้น ผู้วิจัยจึงสนใจที่จะ พัฒนาวิธีการหาปริมาณ BPA-G ในปัสสาวะ โดยทำการสกัด BPA-G ด้วยวิธี salting-out assisted liquid/liquid extraction (SALLE) ที่ใช้ organic salt ไล่ลงไปในการผสมระหว่างชั้นน้ำและชั้นที่ไม่ ละลายในน้ำ ซึ่งจะทำให้เกิดการแยกระหว่างเฟส 2 เฟส (aqueous phase และ organic solvent phase) โดย SALLE ที่พัฒนาขึ้น มีข้อดี คือ ใช้เวลาในการเตรียมตัวอย่างน้อย ใช้สารละลายน้อย และประหยัดกว่าการใช้ conventional method เช่น LLE และ SPE (20) จากนั้น นำวิธีที่ พัฒนาขึ้นไปหาปริมาณขับออกของ BPA-G โดยตรงทางปัสสาวะของผู้ร่วมโครงการวิจัยจำนวน 20 คน โดยใช้วิธี isotope dilution แล้ววิเคราะห์ผ่าน LC-MS/MS ทำให้การหาปริมาณ BPA-G มีความ รวดเร็วและให้ผลที่น่าเชื่อถือ

1.2 ปัญหาในงานวิจัย

1. น้ำผลไม้/น้ำผักสำเร็จรูป กำลังเป็นที่นิยมในสังคมไทย แต่ BPA ซึ่งเป็นสารเคมีที่ใช้เคลือบ ภายในบรรจุภัณฑ์ สามารถปนเปื้อนไปสู่ผลไม้/น้ำผักภายในบรรจุภัณฑ์ได้ และ BPA ส่งผลกระทบต่อสุขภาพมนุษย์ในด้านต่างๆ เช่น ระบบสืบพันธุ์ ระบบไทรอยด์ และระบบภูมิคุ้มกัน เป็นต้น และใน การตรวจวิเคราะห์ปริมาณ BPA ปนเปื้อนในน้ำผลไม้/น้ำผักสำเร็จรูป ด้วยเทคนิค LC-MS/MS นั้น ต้องใช้ระยะเวลาานต่อหนึ่งตัวอย่าง จึงควรจะมีการพัฒนากระบวนการสกัด BPA เพื่อเพิ่ม ประสิทธิภาพในการตรวจวิเคราะห์

2. ในการประเมินความเสี่ยงจากการได้รับ BPA เข้าสู่ร่างกาย ส่วนหนึ่งต้องประเมินจากปริมาณ BPA-G ในปัสสาวะ และในขั้นตอนการสกัด BPA-G จากปัสสาวะ ก่อนจะนำไปวิเคราะห์หาปริมาณต่อด้วย LC-MS/MS นั้น ต้องใช้ SPE ซึ่งมีค่าใช้จ่ายสูง และใช้เวลานานในการเตรียม จึงควรจะมีการพัฒนากระบวนการสกัด BPA-G ในปัสสาวะ ที่ประหยัดค่าใช้จ่าย สะดวก รวดเร็ว ก่อนจะนำไปวิเคราะห์หาปริมาณด้วยเทคนิค LC-MS/MS

1.3 สมมติฐานของการวิจัย

1. การพัฒนากระบวนการสกัด BPA จากน้ำผลไม้/น้ำผัก ก่อนจะนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค LC-MS/MS จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการวิเคราะห์ให้ดีขึ้น และเทคนิคที่พัฒนาขึ้นสามารถนำมาใช้ตรวจวัดหาปริมาณ BPA ที่แพร่จากบรรจุภัณฑ์สู่น้ำผลไม้/น้ำผักได้

2. มีกระบวนการสกัด BPA-G จากปัสสาวะ ที่ประหยัดค่าใช้จ่าย สะดวก รวดเร็ว สามารถนำมาใช้แทนวิธี SPE ได้ และวิธีที่พัฒนาขึ้น จะสามารถนำไปใช้ในการตรวจหาปริมาณ BPA-G ในปัสสาวะได้อย่างมีประสิทธิภาพ

1.4 วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. เพื่อหาสถานะและพัฒนากระบวนการสกัด BPA จากน้ำผลไม้/น้ำผักสำเร็จรูป ด้วย solid phase extraction (SPE) เพื่อใช้ในการตรวจด้วยเทคนิค LC-MS/MS

2. เพื่อหาสถานะและพัฒนากระบวนการสกัด BPA-G ในปัสสาวะ ด้วย salting-out assisted liquid/liquid extraction (SALLE) เพื่อใช้ในการตรวจด้วยเทคนิค LC-MS/MS

3. เพื่อนำวิธีการหา BPA ในน้ำผลไม้/น้ำผักสำเร็จรูปที่พัฒนาขึ้น ไปประยุกต์ใช้กับตัวอย่างน้ำผลไม้/น้ำผักสำเร็จรูป

4. เพื่อนำวิธีการหา BPA-G ในปัสสาวะที่พัฒนาขึ้น ไปประยุกต์ใช้กับตัวอย่างปัสสาวะของผู้ที่มีสถานะการทำงานระดับและใต้เป็นปกติ

1.5 ขอบเขตของการวิจัย

พัฒนากระบวนการสกัด BPA จากน้ำผลไม้/น้ำผัก และพัฒนากระบวนการสกัด BPA-G จากปัสสาวะ ด้วยวิธีที่เหมาะสม เพื่อนำไปวิเคราะห์หาปริมาณ BPA และ BPA-G ด้วยเทคนิค LC-MS/MS จากนั้นวิเคราะห์ประสิทธิภาพของวิธีการตรวจหาปริมาณดังกล่าว เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในการหาปริมาณ BPA ในน้ำผลไม้/น้ำผัก จำนวน 21 ตัวอย่าง และนำไปประยุกต์ใช้ในการหาปริมาณ BPA-G ในปัสสาวะของผู้ที่มีสถานะการทำงานระดับและใต้เป็นปกติ จำนวน 20 คน

1.6 กรอบแนวความคิด

ในน้ำผลไม้/น้ำผัก มีสารกลุ่ม flavonoids ที่มีโครงสร้างคล้ายคลึงกันกับ BPA ทำให้การสกัดสาร BPA ออกจากน้ำผลไม้/น้ำผัก โดยใช้ C18 SPE และ Water/Acetonitrile system ไม่สามารถแยกสารกลุ่ม flavonoids และ BPA ออกจากกันได้ ในขั้นตอนการวิเคราะห์หาปริมาณ BPA ด้วยเทคนิค LC-MS/MS จะต้องใช้ chromatographic condition แบบ binary gradient ซึ่งต้องใช้เวลานานต่อหนึ่งตัวอย่าง ดังนั้น การพัฒนากระบวนการสกัด BPA ในน้ำผลไม้/น้ำผัก โดยใช้ C18 SPE และ 2% Acetic acid/Acetonitrile system ซึ่งใช้สำหรับการวิเคราะห์สารกลุ่ม flavonoids ด้วย HPLC แทนการใช้ Water/Acetonitrile system จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการตรวจวิเคราะห์ปริมาณ BPA ในน้ำผลไม้ ด้วยเทคนิค LC-MS/MS ได้

นอกจากนี้ ในการประเมินความเสี่ยงจากการได้รับ BPA เข้าสู่ร่างกาย ต้องมีการหาปริมาณ BPA-G ในปัสสาวะ ซึ่งในขั้นตอนการสกัด BPA-G จากปัสสาวะ ก่อนจะนำไปวิเคราะห์หาปริมาณต่อด้วย LC-MS/MS นั้น ต้องใช้ SPE ซึ่งมีค่าใช้จ่ายสูง และใช้เวลานานในการเตรียม และมีงานวิจัยแสดงให้เห็นว่าวิธี SALLE เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพในการสกัด free BPA และ chlorinated BPA ในปัสสาวะ ผู้วิจัยจึงต้องการพัฒนากระบวนการสกัด BPA-G จากปัสสาวะด้วยวิธี SALLE ที่ประหยัดค่าใช้จ่าย สะดวก รวดเร็ว และสามารถนำไปใช้ในการตรวจหาปริมาณ BPA-G ในปัสสาวะได้อย่างมีประสิทธิภาพ

1.7 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. วิธีการเตรียมตัวอย่างสำหรับหาปริมาณ BPA ในน้ำผลไม้/น้ำผักที่พัฒนาขึ้น นอกจากจะเหมาะสมสำหรับนำไปวิเคราะห์หาปริมาณ BPA ด้วยเทคนิค LC-MS/MS แล้ว ยังสามารถนำไปประยุกต์ใช้สำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณ BPA ด้วย RP-HPLC/fluorescence system ได้อีกด้วย
2. ได้วิธีการวิเคราะห์หาปริมาณ BPA ในน้ำผลไม้/น้ำผักสำเร็จรูป ด้วยเทคนิค LC-MS/MS ที่มีประสิทธิภาพ ลดระยะเวลาในการวิเคราะห์ และสามารถนำไปประยุกต์ใช้กับตัวอย่างน้ำผลไม้/น้ำผักสำเร็จรูปได้
3. ได้วิธีการสกัด BPA-G จากปัสสาวะ สำหรับเตรียมตัวอย่างเพื่อนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค LC-MS/MS ซึ่งวิธีที่พัฒนาขึ้นเป็นวิธีที่ประหยัด สะดวก รวดเร็ว สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในงานวิจัยที่เกี่ยวข้องต่อไปได้
4. ได้วิธีการวิเคราะห์หาปริมาณ BPA-G ในปัสสาวะ ด้วยเทคนิค LC-MS/MS ซึ่งเป็นวิธีที่ได้รับการยอมรับว่าเป็นวิธีมาตรฐาน

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 สารเคมีต่างๆที่รบกวนการทำงานของต่อมไร้ท่อ (Endocrine disrupting chemical)

สำนักงานปกป้องสิ่งแวดล้อมของสหรัฐอเมริกา (US-EPA) ให้คำจำกัดความของ Endocrine disrupting chemical ว่าเป็นสารเคมีที่รบกวนการผลิต การปล่อย การขนส่ง การเมทาบอลิซึม การจับ การแสดงออก หรือ ขัดขวางการทำงานของฮอร์โมนจากร่างกายที่รักษา homeostasis และการควบคุมกระบวนการต่างๆของร่างกาย ซึ่งไม่จำเพาะแค่ขัดขวางเฉพาะ estrogen system เท่านั้น แต่ยังรวมถึงระบบต่อมไร้ท่ออื่นๆ ได้แก่ ฮอร์โมนแอนโดรเจน ฮอร์โมนไทรอยด์ โพรแลกติน และ อินซูลิน เป็นต้น (24)

สารเคมีที่รบกวนระบบต่อมไร้ท่อ พบได้ทั้งในอาหารและสิ่งแวดล้อม ตัวอย่างเช่น

2.1.1 Bisphenol A (BPA) เป็นสารเคมีชนิดหนึ่งที่ใช้กันอย่างกว้างขวางในงานอุตสาหกรรมผลิตพลาสติกชนิดพอลิคาร์บอเนตและอีพอกซีเรซินที่เป็นบรรจุภัณฑ์บรรจุอาหาร โดย BPA จะส่งผลกระทบต่อระบบฮอร์โมน และ ระบบไร้ท่ออื่นๆ ของร่างกาย ซึ่งจะกล่าวในรายละเอียดต่อไป

2.1.2 Dioxin (Polychlorinated dibenzo-para-dioxins) และสารที่คล้ายคลึง ได้แก่ furans (Polychlorinated dibenzo furans) และ Dioxin-like PCB เป็นสารที่ใช้ในอุตสาหกรรมผลิตกระดาษ พบในกระบวนการเผาไหม้ที่ใช้อุณหภูมิสูงทุกชนิด โดยสารนี้จะไปรบกวนพัฒนาการของระบบประสาทและรบกวนระบบภูมิคุ้มกัน ระบบสืบพันธุ์และระบบต่อมไร้ท่อ และก่อมะเร็ง เป็นต้น (25)

2.1.3 สารหน่วงการติดไฟกลุ่มโบรมีน ได้แก่ polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) และ polybrominated biphenyls (PBBs) เป็นสารเคมีที่เป็นส่วนผสมอุปกรณ์อิเล็กทรอนิกส์เพื่อให้การติดไฟช้าลง เช่น โทรทัศน์ เคสคอมพิวเตอร์ พอลิยูรีเทน เป็นต้น เพื่อยับยั้งการติดไฟและอัตราการเผาไหม้ให้ช้าลง เมื่อได้รับในปริมาณสูงจะรบกวนระบบสืบพันธุ์ ส่งผลกระทบต่อพัฒนาการของทารกในครรภ์ รบกวนการทำงานของระบบประสาท และยับยั้งการทำงานของต่อมไทรอยด์ เป็นต้น (26)

2.1.4 Phthalates เป็นสารเคมีที่ใช้ในการใส่ไปในพอลิไวนิลคลอไรด์ เพื่อความยืดหยุ่นและคงตัว ที่ใส่ลงไปในพื้นไวนิล พรม น้ำยาล้างเล็บ เครื่องสำอาง ของเล่นเด็ก เป็นต้น เมื่อได้รับในปริมาณสูงจะก่อมะเร็ง รบกวนระบบสืบพันธุ์ ทำให้พัฒนาการล่าช้า และทำให้เกิดโรคหืดหอบภูมิแพ้ในเด็ก (27)

2.1.5 Dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) และ Pyrethroids เป็นสารเคมีที่ใส่ลงไปในยาฆ่าแมลง เมื่อได้รับในปริมาณสูงจะไปรบกวนระบบฮอร์โมนส่งผลกระทบต่อระบบประสาท ระบบสืบพันธุ์ ทำให้เซลล์เสื่อมเร็ว และก่อมะเร็งได้ (28)

2.1.6 สารกลุ่ม Alkylphenol ได้แก่ Nonylphenol (NP) และ Octylphenol (OP) เป็น by-product ของ nonylphenol ethoxylates และ octylphenol ethoxylates ตามลำดับ เป็นสารกลุ่มลดแรงตึงผิว ใช้แพร่หลายในอุตสาหกรรมสิ่งทอ ที่มีการใช้สารซักล้าง สารเคมีชนิดนี้สามารถสะสมได้ในสิ่งแวดล้อม เช่น แม่น้ำ น้ำผิวดิน น้ำบาดาล ดินทราย และอากาศ เป็นต้น ทำให้เกิดพิษต่อระบบนิเวศในน้ำ สารนี้จะรบกวนการทำงานของต่อมไร้ท่อโดยเลียนแบบ (mimic) การทำงานของฮอร์โมนเอสโตรเจน กระตุ้นให้เกิดมะเร็งเต้านมได้ เป็นพิษต่อระบบประสาทและระบบกระดูก รบกวนพัฒนาการของร่างกายและระบบสืบพันธุ์ นอกจากนี้ยังมีคุณสมบัติเป็น antiandrogenic activity ได้อีกด้วย (29-31)

2.1.7 กลุ่มของเอสโตรเจนสังเคราะห์ เช่น Diethylstilbestrol (DES) เป็นฮอร์โมนเอสโตรเจนสังเคราะห์ใช้ในทางการแพทย์ เพื่อป้องกันการแท้ง การคลอดก่อนกำหนด และในภาวะขาดฮอร์โมนเอสโตรเจน แต่เมื่อได้รับติดต่อกันเป็นเวลานาน สามารถก่อให้เกิดความผิดปกติของต่อมไร้ท่อได้ ทำให้เกิดโรคมะเร็งปากมดลูกและมะเร็งช่องคลอด เป็นต้น (32)

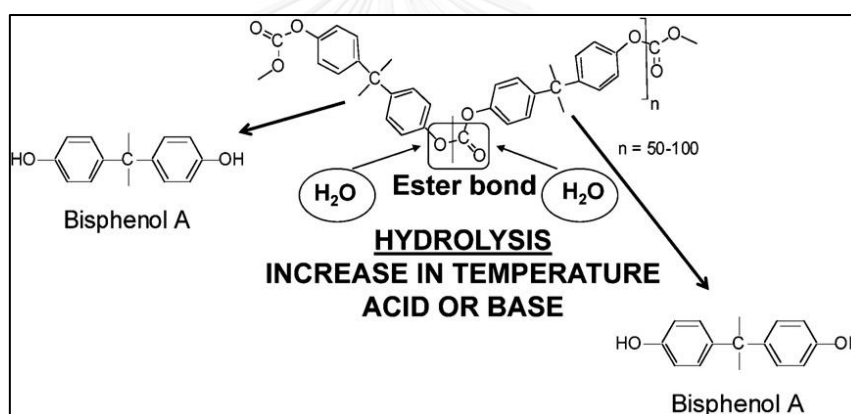
2.2 ลักษณะทั่วไป คุณสมบัติ และการใช้ประโยชน์จากสาร Bisphenol A

Bisphenol A เป็นสารเคมี ที่อยู่ในกลุ่มสารอินทรีย์ สูตรโมเลกุลคือ $C_{15}H_{16}O_2$ มีหลายชื่อเรียก เช่น 4,4'-dihydroxy-2,2-diphenylpropan, 2,2-Bis(4-hydroxyphenyl)propane เป็นต้น มี Cas number คือ 80-05-7 และมีน้ำหนักโมเลกุลคือ 228.29 g/cm³ ลักษณะเป็นของแข็งสีขาว มีจุดหลอมเหลวที่ 156°C, จุดเดือดที่ 220 °C ละลายได้ดีในไขมัน และละลายได้น้อยในน้ำ (14) โดย BPA สังเคราะห์ครั้งแรก ในปี ค.ศ.1891 เป็น monomer ที่มีไฮโดรคาร์บอนโมเลกุลเดี่ยวๆ สังเคราะห์มาจากการควบแน่นของ phenol groups 2 โมเลกุล และ acetone 1 โมเลกุล เป็นสารตั้งต้นในการผลิตอุตสาหกรรมพลาสติกและบรรจุภัณฑ์ แบ่งเป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ ได้แก่ พลาสติกพอลิคาร์บอเนตและอีพอกซีเรซิน ในส่วนของพลาสติกพอลิคาร์บอเนต สังเคราะห์จากการ BPA และ phosgene เพื่อให้ทนต่ออุณหภูมิสูงและลดการขีดข่วน พบได้บ่อยในสื่อที่ใช้งานด้านโสตทัศนูปกรณ์ (optical media) วัสดุไฟฟ้า และขวดน้ำพลาสติก นอกจากนี้ BPA ยังเป็นสารตั้งต้นในการผลิตอีพอกซีเรซิน โดยผสมกับ epichlorohydrine เป็นสารที่ใช้เคลือบด้านในกระป๋องอาหารและเครื่องดื่ม ทำให้ผลิตภัณฑ์มีคุณสมบัติทนความร้อนได้ดี ด้านทานการสึกกร่อนของกระป๋อง ตัวอย่างวัสดุอื่นๆ ที่มี BPA เป็นส่วนผสม เช่น ขวดนม ใบเสิร์ฟรับเงิน ท่อน้ำ สารเคลือบฟัน เป็นต้น (23, 33)

นอกจากนี้สาร BPA ยังใช้เป็นส่วนผสมของพลาสติกชนิดอื่นๆ เช่น polysulfone, polyacrylate, polystyrene, alkylphenolic, polyarylate, polyester-styrene และ certain polyester resins เป็นต้น

BPA เป็นสารเคมีที่ใช้กันทั่วโลก ถูกสังเคราะห์ขึ้นครั้งแรก ในปี ค.ศ.1891 และพบว่ามีคุณสมบัติเป็น estrogenic ในปี 1930 และนับตั้งแต่ปี 1940 BPA ก็ถูกใช้อย่างกว้างขวาง (8) จากการรายงานในปี 2006 มีการผลิต BPA ในยุโรปตะวันตกประมาณ 1.150×10^3 ตันต่อปี (34) ในปี 1993 BPA ประมาณ 0.017% ปล่อยออกสู่อากาศ น้ำผิวดิน น้ำเสียจากการบำบัด โดย 0.085% ถูกนำกลับมาใช้ใหม่ ฝังกลบหรือเผา (35) และในปี 2011 พบว่า มีการใช้มากกว่า 8,000 ปอนด์ต่อปี และประมาณ 100 ตัน ที่ปล่อยออกสู่สิ่งแวดล้อม (12)

BPA สามารถแพร่ออกมาจากบรรจุภัณฑ์เหล่านี้ได้ เมื่อสัมผัสกับอุณหภูมิที่สูง หรือ pH ที่เป็นกรดหรือด่างสูงๆ ดังแสดงในภาพที่ 1 (1, 8, 36, 37)



ภาพที่ 1 พลาสติกพอลิคาร์บอเนตหรืออีพอกซีเรซินที่ปล่อย BPA ออกมา (5)

2.3 กลไกการทำงานปกติของ steroid hormone และกลไกการทำงานของสารเคมีที่เป็น endocrine disruptors

จากการศึกษาก่อนหน้านี้ BPA ถูกจัดให้เป็น xenoestrogen (38) ซึ่งจะไปรบกวนการทำงานของ steroid hormone ในร่างกายที่มีด้วยกันหลายชนิด เช่น estrogen, androgen และ progesterone เป็นต้น โดยกลไกการทำงานของ steroid hormone มีอยู่หลายแบบ ดังนี้

2.3.1 กลไกเกิดแบบผ่านยีน (Genomic) คือการที่ steroid hormone จับกับ receptors บริเวณ cytosol แล้วรวมกันเป็น hormone receptor complex เข้าสู่ภายในนิวเคลียส เกิด dimerization ซึ่งจะจับกับ DNA response elements ซึ่งอยู่ใน promotor ของยีนเป้าหมาย ทำให้เกิดการแสดงออกของยีน อีกแบบหนึ่ง เมื่อ steroid hormone จับกับ receptor เมื่อเข้าสู่

นิวเคลียส จะจับกับ transcription factors จากนั้นจะเข้าไปจับกับ DNA response elements แล้วเกิดการแสดงออกของยีน (39, 40)

2.3.2 กลไกแบบไม่ผ่านยีน (non-genomic) จะเกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว เนื่องจากไม่ขึ้นกับ ขั้นตอน RNA transcription หรือ ขั้นตอน protein translation และจะเกี่ยวข้องกับ protein kinase cascades เสียเป็นส่วนใหญ่ (41) มีหลายรูปแบบ ได้แก่

1. Protein-protein interaction กับ DNA-binding transcription factors ที่จำเพาะใน นิวเคลียส หรืออาจเกิด cross-talk ของ extracellular signals ผ่าน membrane receptors คือ G-protein coupled receptor (42) ที่จะไปกระตุ้น adenylyl cyclase ทำให้เกิด cyclic AMP (cAMP) ที่เป็น secondary messenger จากนั้นจะไปกระตุ้น protein kinase A (PKA) จากนั้น PKA จะไปเติม phosphate group ให้กับ target proteins ในเซลล์เป้าหมาย นอกจากนี้ G-protein coupled receptor ยังสามารถไปกระตุ้น phospholipase C เพื่อแยก PIP2 ออก เพื่อสร้าง IP₃ และ diacylglycerol (DAG) ซึ่งเป็น secondary messenger โดยที่ IP₃ สามารถจับและเปิด Ca⁺⁺ channel ใน endoplasmic reticulum หรือ sarcoplasmic reticulum ทำให้ Ca⁺⁺ ใน cytosol สูง แล้วไปจับกับ protein เช่น calmodulin แล้วทำให้เกิดการตอบสนองของเซลล์ ส่วน DAG จะ กระตุ้น protein kinase C (PKC) จากนั้น PKC จะไปเติม phosphate group ให้กับ target proteins ในเซลล์เป้าหมาย ทำให้เกิดการตอบสนองของเซลล์ (39)

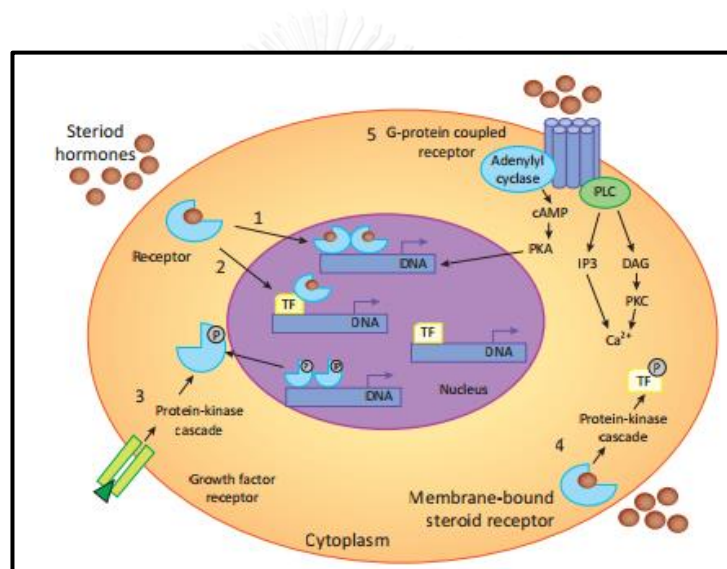
2. Steroid hormone จับกับ steroid receptors บน membrane กระตุ้นโดย protein kinase cascade ทำให้เกิดการเติม Phosphate group ให้กับ transcription factors จากนั้นจะไป จับ DNA response element ทำให้เกิดการแสดงออกของยีน (39)

3. Hormone independent mechanisms ซึ่งเป็นการเติม phosphate group ให้กับ steroid-hormone receptor ซึ่งถูกกระตุ้นโดย protein-kinase cascade ที่ตอบสนองต่อ growth factors ที่จับกับ membrane receptor จากนั้น phosphorylated steroid receptors เข้าสู่ นิวเคลียสและจับกับ DNA แล้วเกิดการตอบสนองของยีน (43)

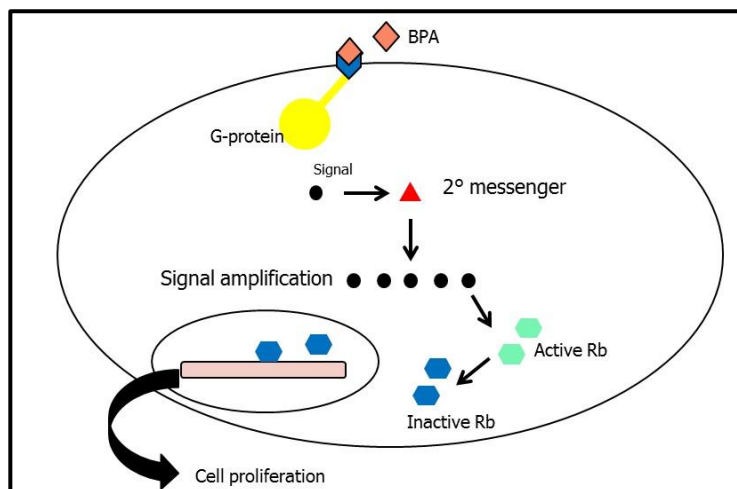
ส่วนกลไกการทำงานของสารเคมีที่เป็น endocrine disruptor สามารถเกิดได้หลายทาง กล่าวคือ สามารถเลียนแบบการทำงานของฮอร์โมนปกติของร่างกาย ตอบสนองในเวลาที่ไม่เหมาะสม ขัดขวางการทำงานของฮอร์โมนปกติของร่างกายทำให้ฮอร์โมนตัวจริงไม่สามารถทำงานได้ กระตุ้นให้ เซลล์ตอบสนองมากเกินไป เป็นต้น เช่น Bisphenol A สามารถจับกับ ER ทางอ้อมผ่าน non-genomic pathway มากกว่า genomic pathway การส่งสัญญาณเกิดขึ้นภายในเซลล์ ซึ่งจะมี receptor บริเวณ เยื่อหุ้มเซลล์ กลไกจะเกิดตรง membrane protein นั่นคือ G-Protein coupled receptor (GPR30) และสัญญาณจะถูกส่งต่อจาก G-protein ซึ่งจะกระตุ้นผ่านทาง transcription

factors ในกรณีที่ เป็น BPA จะกระตุ้น transcription factors 2 ชนิด โดยชนิดแรกคือ CREB และอีกชนิดคือ RB ที่เป็นตัวที่ควบคุม cell cycle ช่วง cell division โดย BPA จะขัดขวางกระบวนการนี้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในช่วง critical windows การตอบสนองสามารถเกิดได้หลายทาง กล่าวคือสามารถเลียนแบบการทำงานของฮอร์โมนปกติของร่างกาย ตอบสนองในเวลาที่ไม่เหมาะสม ขัดขวางการทำงานของฮอร์โมนปกติของร่างกายทำให้ฮอร์โมนตัวจริงไม่สามารถทำงานได้ กระตุ้นให้เซลล์ตอบสนองมากเกินไป เป็นต้น ซึ่งจะลงรายละเอียดในหัวข้อกลไกการออกฤทธิ์ของ BPA (39, 40, 44)

กลไกการทำงานปกติของ steroid hormone แสดงในภาพที่ 2 และการทำงานของสารเคมีที่เป็น endocrine disruptor ดังแสดงในภาพที่ 3



ภาพที่ 2 Steroid hormone receptor signaling pathway (39)



ภาพที่ 3 การทำงานของสารเคมีที่เป็น endocrine disruptor (BPA)

(ที่มา: <http://healthandenvironmentonline.com/2009/07/14/indirect-bpa-mechanism/>)

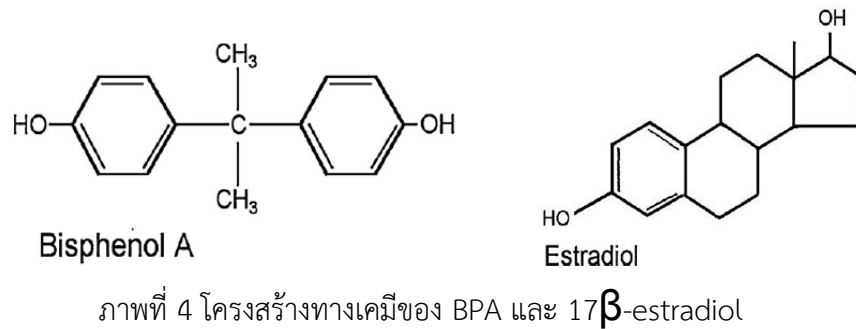
2.4 กลไกการออกฤทธิ์ของ BPA

2.4.1 BPA ออกฤทธิ์เป็น xenoestrogen

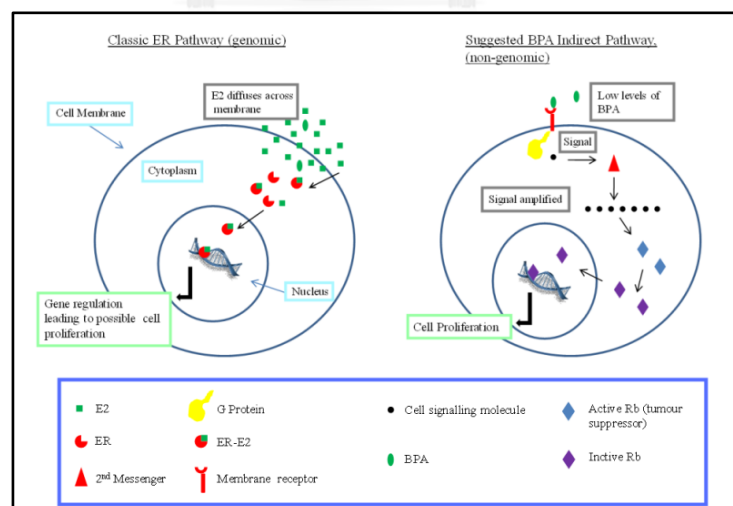
ฮอร์โมนเอสโตรเจน เป็นฮอร์โมนที่ร่างกายสร้างขึ้นมา โดยจัดเป็น steroids hormone ที่ถูกสร้างมาจาก androgen precursor โดยส่วนใหญ่ฮอร์โมนเอสโตรเจนจะหลั่งออกมาจากรังไข่ รก เนื้อเยื่อไขมัน อัณฑะ และสามารถกระตุ้นพัฒนาการและกระตุ้นการเจริญเติบโตอย่างสมบูรณ์ของเพศหญิง (female secondary sex characteristics) และส่งเสริมการเจริญเติบโตและควบคุมระบบสืบพันธุ์ของเพศหญิง (Merriam-Webster Medical Dictionary of the U.S. National Library of Medicine) โดยเอสโตรเจนเป็นกลุ่มฮอร์โมนเพศ และที่สำคัญที่สุดคือ estradiol หรือ 17β -estradiol (24)

ในส่วนของคุณสมบัติของ BPA และ 17β -estradiol (E2) มีบางอย่างที่คล้ายคลึงกัน เช่น โครงสร้าง การเมทาบอลิซึม และการออกฤทธิ์ (8, 45) แต่ BPA ออกฤทธิ์ต่ำกว่า E2 ประมาณ 10,000 เท่า โดยมีระบบสืบพันธุ์เป็นอวัยวะเป้าหมายหลัก (4) นอกจากนี้ BPA ยังถูกจัดอยู่ในกลุ่มของ selective estrogen receptor modulator (SERM) (6) โดยสามารถตอบสนองทั้งแบบเป็น estrogen receptor agonist หรือ estrogen receptor antagonist มีกลไกหลักคือ เปลี่ยนแปลง estrogen signaling pathway (46, 47) จากการตรวจทางชีวเคมี พบว่า BPA สามารถจับกับ estrogen receptor ซึ่งจับได้ทั้ง estrogen receptor alpha ($ER\alpha$) และ estrogen receptor beta ($ER\beta$) (48, 49) และจากรายงานการศึกษาจากกลไกระดับโมเลกุลของ BPA พบว่ามีหลาย

pathway ที่ BPA สามารถกระตุ้นการตอบสนองของเซลล์ แม้ความเข้มข้นของ BPA มีปริมาณน้อย (50)



BPA สามารถรบกวนการทำงานของ endogenous estrogen เช่น เลียนแบบ ไปเพิ่มหรือห้ามการทำงานของ estrogen หรือไปขัดขวางการทำงานของ estrogen nuclear hormone receptor เนื่องจาก BPA สามารถจับกับ classical ERs (ER α , ER β) และ membrane estrogen receptors (mERs) (51, 52) ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในหลายระดับ ทั้งเนื้อเยื่อ เซลล์ และการแสดงออกของยีนที่หลากหลายในอวัยวะเป้าหมาย ได้แก่ สมอง ต่อมไทรอยด์ รังไข่ มดลูก เป็นต้น นอกจากนี้การเปลี่ยนแปลงในอวัยวะเป้าหมาย สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในอวัยวะอื่นๆได้ด้วย เช่น กระดูก เนื้อเยื่อหลอดเลือดหัวใจ ตับอ่อน เนื้อเยื่อไขมันและระบบภูมิคุ้มกัน เป็นต้น (45)



ภาพที่ 5 Classic ER pathway และ suggested BPA indirect pathway

(ที่มา: healthandenvironmentonline.com/2009/07/14/indirect-bpa-mechanism/)

จากภาพที่ 5 ด้านซ้าย pathway ปกติของ estrogen (classic ER pathway) เริ่มจากเมื่อ ER จับกับ estrogen (E2) แล้ว ER-E2 complex จะทำหน้าที่เป็น transcription factor แล้วจะจับกับ DNA เพื่อควบคุมการแสดงออกของยีน ส่งผลให้เกิด cell proliferation โดยเฉพาะอย่างยิ่งในช่วง ระยะพัฒนาการ วิทยารก วิทยเจริญพันธุ์ เป็นต้น

สำหรับรูปทางขวา คือ กลไกการทำงานของ BPA ที่ตอบสนองได้แม้ความเข้มข้นต่ำมากเพียงแค่ 10^{-12} โมลาร์ หรือ 10^{-9} โมลาร์ โดยผ่าน non-genomic pathway มากกว่า genomic pathway เพราะ การส่งสัญญาณเกิดขึ้นภายในเซลล์ ซึ่งจะมี receptor บริเวณ เยื่อหุ้มเซลล์ โดยกลไกจะเกิดตรง membrane protein นั่นคือ G-Protein coupled receptor โดยสัญญาณจะถูกส่งต่อจาก G-protein ซึ่งจะกระตุ้นผ่านทาง transcription factors ในกรณีที่เป็น BPA จะกระตุ้น transcription factors 2 ชนิด ชนิดแรกคือ CREB และอีกชนิดคือ RB ที่เป็นตัวที่ควบคุม cell cycle โดยจะควบคุมช่วง cell division และจะขัดขวางกระบวนการนี้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งระหว่างช่วง critical windows จึงสามารถกล่าวได้ว่า BPA สามารถขัดขวางการทำงานของฮอร์โมนในร่างกายและส่งผลกระทบต่อร่างกายได้ โดยกระตุ้นผ่านกลไกของ G-protein coupled receptor (53, 54)

2.4.2 BPA สามารถจับกับ estrogen-related receptor gamma

Estrogen-related receptor gamma (ERR γ) เป็น subfamily ของ orphan nuclear receptors มี 3 แบบ คือ ERR α , ERR β และ ERR γ แต่ที่พบมากที่สุดคือ ERR γ มีลักษณะใกล้เคียงกับ estrogen receptor (ER α , ER β) เนื่องจากมี amino acid บริเวณ DNA-binding domains (DBD) และ ligand-binding domain (LBD) มีลักษณะคล้ายคลึงกัน (55)

BPA จะไปจับกับ ERR γ อย่างจำเพาะ โดยมี affinity constant (K_D) คือ 5.5 นาโนโมลาร์ การที่ BPA จับกับ ERR γ อย่างจำเพาะ ไม่เพียงกระทบต่อ physiologic function แต่ยังกระทบต่อการเมทาบอลิซึมของ ERR γ เอง ในหน้าที่ของการเป็น transcription-activating factor อีกด้วย โดยจะพบ ERR γ เป็นส่วนมากในรกช่วงที่มีการพัฒนาการของ fetus หรือในทารก ทำให้มี BPA สะสมในรก นอกจากนี้ยังพบ ERR γ ในสมองของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมช่วงการเปลี่ยนแปลงพัฒนาการ ปอด สมอง และ อวัยวะอื่นๆ (56) นอกจากนี้พบว่า ERR γ ที่มีมากขึ้น จะเพิ่มความเสี่ยงในการเป็นมะเร็งเต้านม เพราะ ERR γ มีบทบาทสำคัญในการควบคุม estrogen signaling ในผู้ป่วยที่เป็นมะเร็งเต้านมอีกด้วย (57)

2.4.3 BPA ขัดขวาง Thyroid hormone pathway

จากการศึกษาก่อนหน้านี้ ด้วยการทดลอง transient gene expression ใน cell line โดยให้ HepG2 (มี endogenous TRs) ถูก transfect ด้วย ME-tk-Luc แล้ว incubate ด้วย 10 นาโนโมลาร์ ของ T3 และ/หรือ 10 ไมโครโมลาร์ ของ BPA

พบว่า BPA ลด gene transcription ได้ถึง 78.7 % เมื่อเทียบกับที่ treat เฉพาะ 10 นาโนโมลาร์ ของ T3 แสดงให้เห็นว่า BPA สามารถไปลดกระบวนการ transcription (antagonist) โดยไม่ให้ T3 ไปจับกับ TR นอกจากนี้ BPA สามารถทำให้หยุดกระบวนการ transcription ได้อีกโดยกระตุ้น nuclear receptor corepressors (N-CoRs) มายัง TR (58)

2.4.4 BPA สามารถจับกับ glucocorticoid receptor (GR)

จากรายงานการศึกษาก่อนหน้านี้ พบว่า BPA สามารถจับกับ glucocorticoid receptor (GR) โดยกลไกการทำงาน และ binding energy ของ BPA คล้ายคลึงกับ DEXA (ยาสังเคราะห์กลุ่ม glucocorticoid) และ cortisol แสดงให้เห็นว่า BPA ทำหน้าที่เป็นตัวเสริม (agonist) (59) โดยผลจากการที่ BPA จับกับ GR ก็จะคล้ายคลึงกับ ฮอรโมน glucocorticoid นั่นคือ BPA จะกระตุ้นการสร้างเนื้อเยื่อไขมัน (adipogenesis) ยืนยันได้จากการศึกษาก่อนหน้า โดยการ treat preadipocytes ด้วย BPA ความเข้มข้น 1-50 ไมโครโมลาร์ ในสภาวะที่ไม่มี exogenous glucocorticoid พบว่าการสะสมของไขมันในเนื้อเยื่อสูงขึ้นตามความเข้มข้นของ BPA ที่มากขึ้น (dose-dependent) (60)

2.4.5 BPA รบกวนการทำงานของ androgen system

Androgen receptor ซึ่งเป็น nuclear receptor พบได้ในหลายเนื้อเยื่อ เช่น อัณฑะ กล้ามเนื้อ ผิวหนัง และต่อมลูกหมาก เป็นต้น (61) โดยมีการศึกษาพบว่า BPA เป็น strong anti-androgenic effect โดยจะแข่งขันจับ androgen receptor กับ dihydrotestosterone (DHT) (52, 62) โดยจะไปขัดขวาง การสังเคราะห์ การขนส่ง และการเมทาบอลิซึมของ androgen จึงลดการแสดงออกของ androgen receptor และลดการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสเปิร์ม เช่น ODF1 TNF1 เป็นผลทำให้การสร้างสเปิร์ม (spermatogenesis) ล้มเหลว (63)

2.4.6 BPA รบกวน immune system

BPA รบกวน immune system ผ่าน estrogen receptor, arylhydrocarbon receptor (AhR), peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR nuclear receptor) ดังนี้

2.4.6.1 Estrogen receptor

Estrogen receptor พบได้ใน immune cell โดยเฉพาะอย่างยิ่ง CD4+ T cells จาก peripheral blood mononuclear cells โดย ER α RNA จะมีมากกว่า ER β ส่วน CD8+ T cells

จะพบ ER α และ ER β mRNA ในระดับที่ต่ำมาก (64) ระดับของ estradiol ที่สูง ในผู้หญิงตั้งครรภ์ เหนียวนำไปให้เกิดโรคปลอกประสาทอักเสบ (multiple sclerosis) ซึ่งเกิดจาก T-cell mediated disease (65)

BPA ส่งผลต่อการทำงานของ immune response โดยไปกดการทำงานของ lipopolysaccharide (LPS) แล้วทำให้ลดการสร้าง nitric oxide (NO) และ TNF- α เนื่องจาก NF-kappaB transactivation ถูกขัดขวางการทำงาน โดยผ่านสื่อกลางคือ estrogen receptor (66)

2.4.6.2 Arylhydrocarbon receptor (AhR)

AhR เป็น nuclear receptor อีกชนิดหนึ่ง เรียกอีกอย่างว่า dioxin receptor ซึ่งพบมากใน dendritic cell และ macrophages ของ innate immune system (67) โดยมีตัวอย่างการศึกษาที่ผ่านมา พบว่า BPA เป็น antagonist ของ AhR โดยจะไปลดการทำงานของ AhR ภายในหลอดทดลอง (in vitro) นอกจากนี้การศึกษาใน breast cancer cell line พบว่า BPA ไปลด ARNT2 protein ซึ่งเป็น heterodimeric partner ของ AhR (68, 69)

2.4.6.3 Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR nuclear receptor)

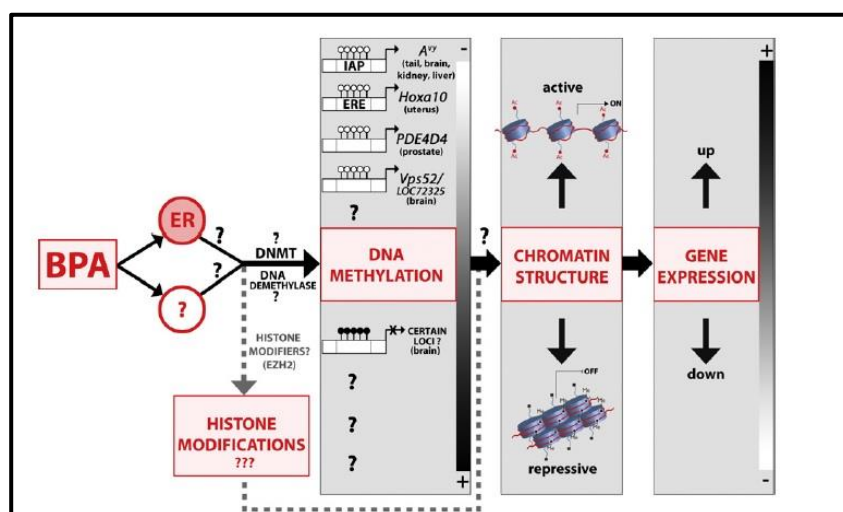
PPAR nuclear receptor พบมากใน macrophages, dendritic cells, T cells และ B cells โดยที่ BPA จะทำหน้าที่เป็น antagonist ซึ่งจะขัดขวาง PPAR regulatory/anti-inflammatory axis ซึ่งจะกระทบต่อ pro-inflammatory (70)

2.4.7 BPA กับ epigenetic modifications

Epigenetic modifications คือการเปลี่ยนแปลงเหนือระดับโมเลกุล ยับยั้งการแสดงออกของ ยีนได้โดยไม่เปลี่ยนแปลง nucleotide sequence แต่จะไปขัดขวางกระบวนการ DNA methylation หรือ histone modification ทั้ง whole genome ซึ่งรูปแบบของเซลล์ที่ต่างกันไป รูปแบบที่เกิดก็จะแตกต่างกันไป โดยช่วงที่จะไวต่อการเกิด epigenetic modifications คือช่วงที่อยู่ระหว่าง prenatal development มี 2 ระยะ คือ เกิดในระยะ early embryo (จาก zygote ไปสู่ blastocyst ของ pre-implantation development) และระหว่าง gametogenesis (เริ่มจาก mid-gestation) จะเข้าสู่กระบวนการ programming และ reprogramming ที่จะมีการเปลี่ยนแปลง DNA methylation และ histone modification ก่อนที่จะเกิด gene expression ใน เซลล์และเนื้อเยื่อ ที่จะส่งผลในช่วงชีวิตระยะยาว (71)

การได้รับ BPA จะทำให้เกิด epigenome ผ่าน ER และ/หรือผ่าน signaling pathway อื่นๆ โดยที่ BPA จะเหนียวนำไปให้เกิด hypomethylation ในส่วนของ CpG islands บน gene regulatory region และพบว่าเกิด hypermethylation บน loci ของ fetal brain เช่นกัน แต่ยังไม่พบว่ามีความสัมพันธ์กับ gene expression และยังมีข้อมูลน้อยมากเกี่ยวกับ BPA ที่ทำให้เกิด

histone modification และ chromatin structure โดยสรุปแล้ว BPA มีผลต่อทั้ง DNA methylation และ histone modification บน gene regulatory regions ที่จำเพาะ ซึ่งจะเกิดการเปลี่ยนแปลงใน chromatin structure นำไปสู่การตอบสนองแบบทั้งแบบกระตุ้นหรือกด gene expression ดังแสดงในภาพที่ 6 (72)



ภาพที่ 6 Possible model for BPA-induced epigenetic effects (72)

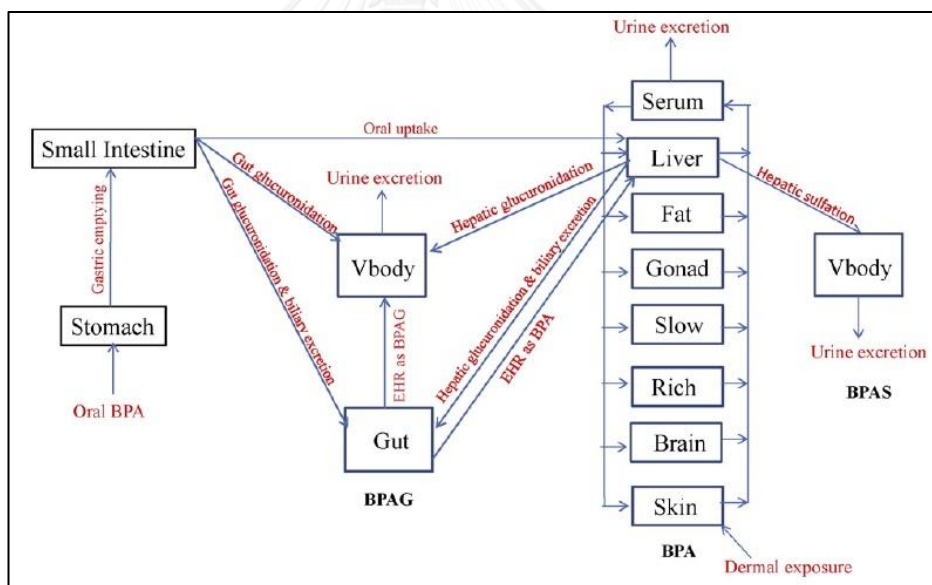
2.5 Toxicokinetic และ เมตาบอลิซึม ของ BPA

ในหนู rat เมื่อ BPA เข้าสู่ร่างกายโดยการกิน จะถูกดูดซึมในกระเพาะอาหารและลำไส้เล็ก ส่วนต้น จากนั้นจะถูกเมตาบอลิซึมไปอยู่ในรูป glucuronide (BPA-G) อย่างรวดเร็วภายใน 15 นาที โดยเอนไซม์ UDP-glucuronosyl transferase UGT2B1 ในตับ (enterohepatic vein) และขับออกสู่ลำไส้เล็กผ่านน้ำดี โดยจะพบ BPA-G ในส่วนบนแล้วเคลื่อนไปยังส่วนล่างของลำไส้เล็กและจะพบ free BPA เป็นส่วนน้อยในลำไส้เล็ก (73) นอกจากนี้ยังพบ BPA-G ในลำไส้ใหญ่ (colon) ที่จะถูก β -glucuronidase เปลี่ยนรูปไปเป็น free BPA ที่เป็นส่วนน้อยมากในส่วนของลำไส้ใหญ่ส่วนต้น (cecum) แล้วขับออกทางอุจจาระ แสดงให้เห็นว่า BPA สามารถดูดซึมอีกครั้ง ใน colon (74)

จากการศึกษา toxicokinetic โดยให้ หนู F344 ลิง cynomolgus และลิง chimpanzees รับประทาน BPA 10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม แล้วดูระดับ BPA เมตาบอลิซึมในเลือด โดยเปรียบเทียบระหว่าง หนู F344 ลิง cynomolgus และลิง chimpanzees พบว่าการเมตาบอลิซึมของ BPA ในเลือดจากมากไปน้อยคือ ลิง cynomolgus ลิง chimpanzees และ หนู F344 ตามลำดับ เนื่องจากหนูจะกำจัด BPA ได้เร็วกว่าในลิง เพราะหนูมี major route ในการกำจัด BPA เมตาบอลิซึมผ่านทางน้ำดี แต่ใน ลิง cynomolgus และลิง chimpanzees การเมตาบอลิซึม BPA จะผ่าน major route ทาง renal excretion (75)

Hepatic blood flow-rate ของหนูจะแตกต่างไปจากของมนุษย์ แต่ในลิงจะคล้ายกับในมนุษย์ ดังนั้น toxicokinetics ของ BPA ในลิงจึงเหมาะสมที่จะมาใช้เป็น model ในการศึกษา toxicokinetics ของ BPA สำหรับมนุษย์ (75)

จากการศึกษารูปแบบ physiologically based pharmacokinetic (PBPK) เมื่อมนุษย์ได้รับ d6-BPA ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ผ่านทางการรับประทานอาหาร BPA จะเข้าสู่ระบบทางเดินอาหาร ไปยังลำไส้เล็กและตับ เพื่อเมทาบอลิซึมด้วยกระบวนการ glucuronidation โดยที่ BPA จะเข้าไปเมทาบอลิซึมในลำไส้เล็กและตับผ่าน phase II metabolism ทำให้เกิด BPA glucuronide (BPA-G) และเมทาบอลิซึมที่พบน้อยในปัสสาวะ ได้แก่ BPA sulphate (BPA-S) โดยที่ BPA-G ที่มาจากลำไส้เล็กและตับจะขับผ่านน้ำดี เพียง 10% เท่านั้น โดยส่วนใหญ่ BPAG 90% เป็น major metabolite ที่จะผ่านระบบเลือดอย่างรวดเร็วแล้วถูกขับออกทางปัสสาวะ โดยมี half-life ภายใน 6 ชั่วโมง ซึ่งในปัสสาวะจะพบ free BPA ในปริมาณน้อยมากหรือไม่พบเลย (12, 44, 76) ดังแสดงในภาพที่ 7



ภาพที่ 7 แผนภาพ physiologically based pharmacokinetic (PBPK) ของ BPA (77)

2.6 ผลกระทบของ BPA ต่อสัตว์ทดลองและเซลล์เพาะเลี้ยง

จากการศึกษาก่อนหน้านี้ ได้มีการทดลองในหนู CD-1 โดยการให้กิน BPA ในปริมาณสูง พบว่าหนูที่จะเกิดมามีชีวิตรอดน้อยลงและน้ำหนักลดลง และยังพบว่าแม่หนูที่ตั้งครรภ์มีน้ำหนักลดลง และตับมีน้ำหนักเพิ่มขึ้น ซึ่งอาจเกิดมาจากการเกิด hepatotoxicity (78) สำหรับการศึกษาในหนู Fischer 344 โดยการฉีด BPA ใต้ชั้นผิวหนัง (Subcutaneous injection) ความเข้มข้น 100 หรือ 500 มิลลิกรัมต่อวัน พบ prolactin ในเลือดสูงขึ้น (hyperprolactinemia) ทั้งในหนูตัวผู้และหนูตัว

เมีย (79) นอกจากนี้ BPA ยังส่งผลต่อ breast development และเพิ่มความเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งเต้านม (80) มีการศึกษาในเซลล์เพาะเลี้ยง โดยใช้ Ishikawa cells ที่มีการแสดงออกของยีน HOXA10 ซึ่งเป็น gene ที่เกี่ยวกับ uterine development พบว่าเมื่อ treat เซลล์ด้วย BPA 0.1 นาโนโมลาร์ถึง 25 ไมโครโมลาร์ พบว่าเกิดการเปลี่ยนแปลงของการแสดงออกของยีน uterine HOXA10 ส่งผลต่อ female reproductive tract ของหนูเพศเมีย (81) นอกจากนี้ BPA ยังทำให้หนูเพศเมียเข้าสู่วัยเจริญพันธุ์เร็วขึ้น (82) และทำให้ต่อมลูกหมากโตในหนูเพศผู้ (83)

2.7 ผลกระทบของ BPA ต่อร่างกายมนุษย์

BPA สามารถเข้าสู่ร่างกายไม่เฉพาะการรับประทานอาหารและเครื่องดื่ม แต่ยังสามารถผ่านระบบทางเดินหายใจและผิวหนังได้ เมื่อ BPA ดูดซึมสู่ปอด จะผ่านกระแสเลือดไปสู่เส้นเลือดภายในตัว ส่วน BPA ที่ปนเปื้อนในอาหารและเครื่องดื่มเมื่อรับประทานไปแล้ว จะเข้าสู่ระบบย่อยอาหารของร่างกาย (37)

การได้รับ BPA ในปริมาณสูง สามารถขัดขวางการทำงานของฮอร์โมนหลายชนิดของร่างกาย เช่น sex hormone, leptin, insulin และ thyroxin นอกจากนี้ยังเป็นพิษต่อระบบประสาทกระตุ้นให้เกิดโรคมะเร็ง เป็นต้น (14)

จากรายงานการวิจัย ที่มีการตรวจวัดทั้ง free BPA และ BPA-glucuronide ในเด็กทารก พบว่าในเด็กทารก 2-3 เดือน จะมี BPA สูง ในเลือดและในปัสสาวะ เนื่องจากเอนไซม์ UDP-glucuronosyl transferase พัฒนาไม่สมบูรณ์ (84) เมื่อได้รับนมแม่หรือขวดนมที่มี BPA ปนเปื้อนอยู่ เด็กทารกซึ่งมีขีดจำกัดในกระบวนการ glucuronidation เพื่อเปลี่ยน BPA ให้เป็น inactive form เพื่อกำจัดออกจากร่างกาย จึงส่งผลกระทบต่อพัฒนาการของเด็ก (85)

สำหรับในผู้ใหญ่เมื่อได้รับ BPA ปริมาณสูง จะมีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคที่หลากหลายประกอบไปด้วย โรคเบาหวาน ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยที่ว่า BPA ระดับต่ำๆจะไปยับยั้งการปล่อย adiponectin จาก adipose tissue ทำให้เกิดโรคหัวใจและหลอดเลือด และเปลี่ยนแปลงเอนไซม์ในตับ (12)

ในผู้หญิง พบว่าทำให้ 17β -estradiol ลดลง และในวัยหมดประจำเดือน พบว่าระดับ BPA ที่สูงขึ้น มีความสัมพันธ์กับการอักเสบ และ oxidative stress และ BPA ในระดับนาโนโมลาร์ ยังเหนี่ยวนำให้เกิดโรคมะเร็งเต้านม โดยการทำงานผ่าน ERK1/2/ERR γ pathways ส่วนในผู้ชาย พบว่า BPA จะทำให้จำนวนและคุณภาพของ sperm ลดลง (12, 57) นอกจากนี้ จากรายงานการวิจัยในสัตว์ทดลอง พบว่า หนูตัวเมียเมื่อได้รับสาร BPA ทำให้เกิดความผิดปกติของประจำเดือน เกิดการเจริญของมดลูกเพิ่มขึ้น เปลี่ยนแปลงการจัดเรียงตัวของต่อมน้ำนม การเพิ่มความหนาของชั้นโปรตีนที่มดลูก มีรอบเดือนและเข้าสู่วัยเจริญพันธุ์เร็วขึ้น อวัยวะในระบบสืบพันธุ์ผิดปกติ เป็นต้น ในทางกลับกัน

การทดลองให้สาร BPA ในหนูตัวผู้ พบว่า ทำให้น้ำหนักของอวัยวะสืบพันธุ์ ซึ่งประกอบด้วย prostate testes epididymal และ seminal vesicle ลดลง นอกจากนี้ยังลดระดับของ luteinizing hormone (LH) testosterone และ sperm counts อีกด้วย (11, 86)

ช่วงเวลาที่เป็น “critical window of development” เป็นช่วง ที่ fetus หรือทารก จะไว ต่อสารเคมีต่างๆ มากกว่าในช่วงวัยอื่น เนื่องจากระบบต่างๆยังไม่สมบูรณ์ แม้ได้รับสารเคมีในปริมาณ น้อยมาก โดยผ่าน placental blood-barrier (87) BPA สามารถผ่าน blood-brain barrier จึงทำ ให้มีผลกระทบต่อ การเติบโตและพัฒนาการของระบบประสาทส่วนกลางและระบบประสาทส่วนปลาย (88)

จากการตรวจปริมาณ total BPA ในเลือดจากผู้หญิงตั้งครรภ์ พบว่าปริมาณ total BPA ใน เลือด มีความสัมพันธ์กับผู้หญิงที่ทารกในครรภ์มีความผิดปกติในโครโมโซม และผู้หญิงที่ทารกในครรภ์ มีพัฒนาการปกติ สาเหตุที่มีความผิดปกติอาจเกิดจากการเมทาบอลิซึมของ BPA ที่ไม่ดี ทำให้ free BPA มีปริมาณสูง นอกจากนี้ BPA ยังสามารถรบกวนกระบวนการ meiotic maturation และการได้รับ BPA เป็นเวลานานก็จะไปลดปริมาณ oocyte ในกระบวนการ meiosis II ได้อีกด้วย (88, 89)

2.8 มาตรการควบคุมการใช้สาร BPA

เนื่องจาก BPA ส่งผลต่อระบบต่างๆ ในร่างกาย ดังที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้น ดังนั้น องค์การ ความปลอดภัยของอาหารแห่งยุโรป (European Food Safety Authority : EFSA) จึงได้กำหนดค่า reference dose (RfD) สำหรับ BPA คือ 4 $\mu\text{g}/\text{kg bw}/\text{day}$ ในเดือน มกราคม ในปี 2015 (90)

สหภาพยุโรป (EU) ได้กำหนดค่า Migration limit ของ BPA ไปสู่บรรจุภัณฑ์พลาสติก คือ 0.6 มิลลิกรัมกรัมต่อกิโลกรัม ในปี 2004 (91)

สำหรับประเทศไทย มีการประกาศจากกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 369 ในปี พ.ศ. 2558 ว่าด้วยเรื่องขบวนการและและภาชนะบรรจุภัณฑ์สำหรับทารกและเด็กเล็ก ได้กำหนด migration limit ของ BPA จากขวดนมไปยังนมผงเด็ก คือ 0.25 ไมโครกรัมต่อลิตร

2.9 การตรวจหาปริมาณสาร BPA ในบรรจุภัณฑ์

เนื่องจากภายในกระป๋องจะเคลือบไว้ด้วยสาร BPA เพื่อลดการเน่าเสีย และทำให้กระป๋องมี ความทนทานขึ้น แต่สาร BPA อาจปนเปื้อนไปสู่อาหารและเครื่องดื่มได้ ตัวอย่างงานวิจัยที่ตรวจพบ BPA ในกระป๋องอาหารและเครื่องดื่มกระป๋อง เช่น ในประเทศสหรัฐอเมริกา Gregory และคณะ (23) ได้ทำการตรวจ BPA ในอาหารกระป๋อง 78 ตัวอย่าง ผลคือ พบปริมาณ BPA ใน 71 ตัวอย่าง โดยอยู่ ในช่วง 2.6 ถึง 730 นาโนกรัมต่อกรัม ในประเทศแคนาดาได้มีการตรวจ BPA ในกระป๋องนม ผล พบว่า มี BPA ในทุกตัวอย่าง ในช่วง 2.27 ถึง 10.2 นาโนกรัมต่อกรัม (92) นอกจากนี้ เมื่อมีการตรวจ BPA ใน soft drink ทั้งหมด 72 ตัวอย่าง พบ BPA ในช่วง 0.032 ไมโครกรัมกรัมต่อลิตรถึง 4.5

ไมโครกรัมกรัมต่อลิตร (93) ในประเทศอังกฤษได้มีการตรวจ BPA ในอาหารกระป๋อง จำนวน 62 ตัวอย่าง ตรวจพบ BPA จำนวน 38 ตัวอย่าง อยู่ในช่วงน้อยกว่า 0.07 มิลลิกรัมกรัมต่อกิโลกรัม ใน 37 ตัวอย่าง และอีก 1 ตัวอย่าง 0.38 มิลลิกรัมกรัมต่อกิโลกรัม (94) ตลาดในประเทศตุรกี พบปริมาณ BPA ในอาหารกระป๋องอยู่ในช่วง 21.86 ± 0.80 ถึง 1858.71 ± 8.24 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม พบในกล่องอาหาร 36.48 ± 0.95 ถึง 554.69 ± 3.18 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม และพบ BPA ในบรรจุภัณฑ์ที่เป็นแก้วเช่นกันเนื่องจากฝาเคลือบด้วย plastic film โดยใช้เครื่องมือวิเคราะห์คือ HPLC (95)

สำหรับรายงานการวิจัยที่ศึกษาเกี่ยวกับปริมาณ BPA ที่แพร่ออกมาจากกรงหนู ที่ทำด้วยพลาสติกชนิดพอลิคาร์บอเนตไปสู่น้ำที่อุณหภูมิห้อง pH เป็นกลาง ที่ทิ้งไว้ 7 วัน พบว่ากรงพลาสติกที่ใช้แล้วมี BPA แพร่ออกมาสูงถึง 310 ไมโครกรัมกรัมต่อลิตร สำหรับกรงพลาสติกใหม่มี BPA แพร่ออกมาน้อยกว่าคือ 0.3 ไมโครกรัมกรัมต่อลิตร (96) และงานวิจัยที่ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อปริมาณการแพร่ของ BPA ออกมาสู่น้ำที่บรรจุในขวดน้ำพลาสติกชนิดพอลิคาร์บอเนตที่ใช้แล้วกับที่ยังไม่ใช้ พบว่าอุณหภูมิสูงขึ้นส่งผลต่ออัตราการแพร่ของ BPA ที่มากขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่าปริมาณ BPA แพร่ออกจากขวดน้ำพลาสติกที่ยังไม่ใช้งานมากกว่าขวดน้ำพลาสติกที่ใช้งานแล้ว (97)

2.10 การตรวจหาปริมาณสาร BPA ในร่างกายมนุษย์

สำหรับระดับ BPA ในร่างกายมนุษย์ สามารถตรวจได้จากหลายทาง ได้แก่ น้ำลาย ชีรั่ม พลาสมา ปัสสาวะ อสุจิ follicular fluid เนื้อเยื่อรก น้ำคร่ำ นมแม่ และเลือดจากสายสะดือทารก (umbilical cord blood) เป็นต้น โดยการตรวจระดับ BPA ในผู้หญิงท้องและทารกมีความจำเป็น โดยเฉพาะทารก เนื่องจากมีความไวสูงที่จะได้รับผลกระทบจาก BPA ซึ่งจะไปขัดขวางการเจริญเติบโตและพัฒนาการ จากผลการวิจัยที่ผ่านมา พบว่าระดับ BPA ในชีรั่มของผู้ใหญ่อยู่ในช่วง 0.2-20 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร พบในน้ำลาย 90 ถึง 913 $\mu\text{g}/\text{saliva}$ ภายหลังจากอดพื้นเป็นเวลา 1 ชั่วโมง นอกจากนี้ ยังตรวจพบระดับ BPA ในชีรั่มของผู้หญิงท้อง ซึ่งพบ BPA ในช่วง 0.3 ถึง 18.9 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร พบในน้ำคร่ำ 8.3 ถึง 8.7 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และ เนื้อเยื่อรก 1.0 ถึง 104.9 นาโนกรัมต่อกรัม โดย GC-MS และยังสามารถตรวจพบสารนี้ในชีรั่มของทารกในช่วง 0.2 ถึง 9.2 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรอีกด้วย (11, 98, 99) เนื่องจาก BPA เป็น lipophilic compound ซึ่งสามารถไปสะสมอยู่ในชั้นเยื่อไขมันและนมน้ำนม ได้มีการวิเคราะห์ปริมาณ BPA ในนมน้ำนมของหญิงตั้งครรภ์ การศึกษาที่มีกลุ่มประชากร (n=20) พบปริมาณ free BPA 60% จากตัวอย่างน้ำนม โดยค่าเฉลี่ยอยู่ที่ 0.4 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และสำหรับ total BPA (free BPA และ BPA conjugates) พบใน 90% ของตัวอย่าง ซึ่งมีค่าเฉลี่ย 1.1 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร (100) นอกจากนี้มีการศึกษาอื่นๆ ในตัวอย่างน้ำนม 101 ตัวอย่าง พบ BPA ในช่วง 1 ถึง 7 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีค่าเฉลี่ย 3.41 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร (101) ในส่วนของปัสสาวะ BPA จะอยู่ในรูปของ conjugated form เสียเป็นส่วน

ใหญ่ ได้แก่ BPA-glucuronide และ BPA-sulfate โดยส่วนใหญ่ก่อนการตรวจวัดจะผ่าน enzyme treatment (เช่น glucuronidase และ/หรือ sulfatase) เพื่อที่จะวัด total BPA (free/unconjugated+ conjugated) แต่บางงานวิจัยก็ไม่ใช้ enzyme treatment เพื่อที่จะวัดปริมาณ free BPA เพียงอย่างเดียว และเนื่องจากปริมาณปัสสาวะของแต่ละบุคคลขึ้นกับปัจจัยหลายอย่าง เช่น การดื่มน้ำ การออกกำลังกาย ปัจจัยการใช้ชีวิตอื่นๆ เพื่อควบคุมความแตกต่างของปริมาณของปัสสาวะ ความเข้มข้นของ BPA ในปัสสาวะจึงต้องปรับเทียบกับระดับของ creatinine ที่อยู่ในปัสสาวะของแต่ละคนซึ่งมีค่าคงที่ (102) งานวิจัยอื่นๆ เช่น Volkel และคณะ ได้วัดปริมาณ free BPA และ total BPA ในปัสสาวะเด็กทารกจำนวน 47 คน จำนวน 91 ตัวอย่าง พบ free BPA เพียง 3 ตัวอย่าง (3%) และสำหรับ total BPA พบในตัวอย่างปัสสาวะ 38 ตัวอย่าง (42%) โดยอยู่ในช่วง น้อยกว่า LOQ (0.45 µg/L) จนถึง 17.85 ไมโครกรัมกรัมต่อลิตร (3) นอกจากนี้ในปี 2011 ยังมีการตรวจการสัมผัส BPA ของประชากร ใน 7 ประเทศของทวีปเอเชียในปัสสาวะ 296 ตัวอย่าง โดยพบ total BPA 94.3% ของตัวอย่างปัสสาวะทั้งหมด พบในช่วง น้อยกว่า 0.1 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ถึง 30.1 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร โดยทั้ง 7 ประเทศ ได้แก่ ประเทศคูเวต (ค่าเฉลี่ย: 3.05 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร, 2.45 µg/g creatinine) ประเทศเกาหลี (ค่าเฉลี่ย 2.17 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร, 2.40 µg/g creatinine) ประเทศอินเดีย (ค่าเฉลี่ย 1.71 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร, 2.09 µg/g creatinine) ประเทศเวียดนาม (ค่าเฉลี่ย 1.18 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร, 1.15 µg/g creatinine) ประเทศจีน (ค่าเฉลี่ย 1.10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร, 1.38 µg/g creatinine) ประเทศมาเลเซีย (ค่าเฉลี่ย 1.06 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร, 2.31 µg/g creatinine) และประเทศญี่ปุ่น (ค่าเฉลี่ย 0.95 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร, 0.58 µg/g creatinine) (103) ก่อนหน้านี้ ประเทศจีน ก็ได้ตรวจ BPA ในปัสสาวะ พบปริมาณ BPA เฉลี่ยสูง 10.5 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร, 24.9 µg/g creatinine (104) การศึกษาอื่นๆที่ประเทศจีนตรวจหาปริมาณ BPA ในปัสสาวะ พบความแตกต่างของปริมาณ BPA สูงมาก คืออยู่ในช่วงน้อยกว่า 2.7 ถึง 3,950 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งความแตกต่างที่เกิดขึ้น อาจเกิดจากเครื่องมือที่มีความไวไม่พอและมีกลุ่มตัวอย่างที่น้อยไป (n=20) (105) ศูนย์ควบคุมและป้องกันโรค ตรวจ BPA ในประชากรประเทศสหรัฐอเมริกา พบ BPA (free BPA และ conjugated BPA) ในปัสสาวะของเด็กอายุมากกว่า 6 ปี 93% โดยตรวจพบค่าเฉลี่ย คือ 2.7 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรโดยเปรียบเทียบข้อมูลจากปี 2003-2004 ของ National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES)

สำหรับการศึกษาในคน เพื่อศึกษาการขับออกของ BPA ทางปัสสาวะ มีหลายการศึกษา ตัวอย่างเช่น การให้ผู้ร่วมโครงการวิจัยนักเรียนจาก Harvard School of Public Health (HSPH) จำนวน 75 คน โดยให้บริโภคน้ำที่เตรียมสดเปรียบเทียบกับบริโภคน้ำที่กรอง โดยช่วงเวลาที่ใช้ทดสอบในแต่ละ phase ใช้เวลา 5 วัน ผลพบว่าปริมาณ BPA ในปัสสาวะของผู้ร่วมการทดลอง บริโภคน้ำที่กรอง ตรวจพบปริมาณ BPA ในปัสสาวะ 1.1 ไมโครกรัมกรัมต่อลิตร น้อยกว่าปริมาณ BPA

ของผู้ร่วมโครงการวิจัยที่บริโภคชุปกระป๋อง 20.8 ไมโครกรัมกรัมต่อลิตร ซึ่งปริมาณ BPA ที่เพิ่มสูงขึ้นมากถึง 1221% เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่บริโภคชุปสด (106) อีกหนึ่งรายงานการศึกษาให้ผู้ร่วมโครงการวิจัยที่เป็นนักเรียน 77 คน จากวิทยาลัยฮาร์วาร์ด โดยให้ดื่มน้ำจากขวดน้ำสแตนเลส (washout phase) 7 วัน เปรียบเทียบกับดื่มน้ำจากขวดน้ำพลาสติกพอลิคาร์บอเนต (intervention phase) 7 วัน แล้วเปรียบเทียบ total BPA ของทั้ง 2 ช่วง พบว่าช่วง washout phase พบปริมาณ BPA เฉลี่ย 1.2 $\mu\text{g/g}$ creatinine แต่พบปริมาณ BPA เฉลี่ยเพิ่มขึ้นในช่วง intervention phase ได้แก่ 2 $\mu\text{g/g}$ creatinine โดยปริมาณ BPA เพิ่มขึ้นถึง 69% ภายหลังดื่มน้ำจากขวดน้ำพลาสติกพอลิคาร์บอเนต (107)

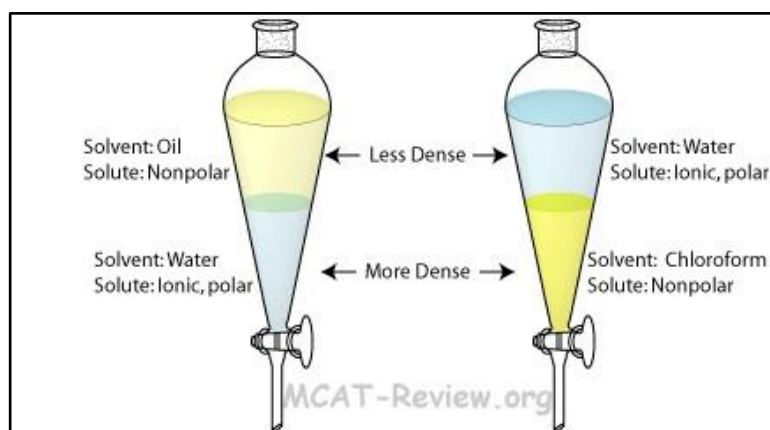
2.11 การเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ BPA และ BPA-G

การเตรียมตัวอย่างก่อนที่จะทำการวิเคราะห์หาปริมาณ BPA และ BPA-G เป็นสิ่งที่จำเป็นเนื่องจากตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์เป็นสารที่ไม่บริสุทธิ์ จึงต้องเอาสิ่งต่างๆ ที่รบกวนในตัวอย่างออกไปเพื่อให้มีสภาวะที่เหมาะสมและมีประสิทธิภาพแก่การวิเคราะห์ ซึ่งประกอบไปด้วยขั้นตอนต่างๆ ได้แก่ pre-treatment, extraction และ clean up ตัวอย่าง ซึ่งบางกรณีจะเพิ่มขึ้นตอน derivatization ไปด้วย โดยวิธีส่วนใหญ่ที่ใช้สำหรับสกัด และ clean up ตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณ BPA และ BPA-G ได้แก่ liquid-liquid extraction (LLE), solid phase extraction (SPE) และ salting-out assisted liquid/liquid extraction (SALLE) ดังรายละเอียด ต่อไปนี้

2.11.1 Liquid-liquid extraction (LLE)

LLE เป็นเทคนิคการสกัดที่อาศัยหลักการ การละลายได้ของสารที่สนใจ ในตัวทำละลายที่ไม่ละลายกัน (immiscible solvents) ส่วนใหญ่ จะใช้สารที่มีขั้ว เช่น น้ำ และสารที่ไม่มีขั้ว เช่น chloroform ซึ่งเป็นเฟสสองเฟส คือเฟสตัวอย่างและเฟสตัวทำละลายที่ใช้สกัด เมื่อสารละลายที่ใช้สกัด (extracting solvent) ถูกใส่เข้าไปในตัวอย่าง จากนั้นเฟสสองเฟสจะถูกทำให้ผสมให้เข้ากันโดยการเขย่า แล้วเกิดการแยกที่ชัดเจน โดยสารที่มีขั้วจะอยู่ในชั้นน้ำ ขณะที่สารที่ไม่มีขั้วจะอยู่ในชั้นสารอินทรีย์ จากนั้นจึงนำตัวอย่างที่เราสนใจที่ละลายอยู่ในเฟสที่เข้ากันได้ แยกออกไป และเข้าสู่กระบวนการต่อไป โดยเทคนิคนี้เป็นเทคนิคที่ง่าย สะดวก รวดเร็ว แต่มีข้อเสีย คือ ต้องใช้ผู้ที่มีความชำนาญ ต้องใช้แรงงานคน ต้องใช้ solvent จำนวนมาก และอาจเกิดการปนเปื้อนของสารระหว่างเฟสสองเฟสได้ (108)

แผนภาพของการสกัดแบบ LLE ดังแสดงในภาพที่ 8



ภาพที่ 8 แผนภาพของการสกัดแบบ LLE

2.11.2 Solid phase extraction (SPE)

SPE เป็นเทคนิคที่มาใช้แทนที่การใช้เทคนิค LLE ซึ่งเป็นการสกัดด้วยตัวดูดซับของแข็งอาศัยหลักการแบ่งละลาย (partition) ของสารที่สนใจ (analyte) ที่ละลายอยู่ระหว่างของแข็งกับ solvent ที่ใช้เป็นตัวชะ โดยเทคนิค SPE เป็นกระบวนการเตรียมตัวอย่าง เพื่อแยกสารประกอบต่างๆ ที่ปนเปื้อนออกจากสารที่เราสนใจ ซึ่งจะถูกลดดูดซับไปบน cartridge แล้วทิ้งสารที่ไม่ต้องการออกไป และเก็บสารที่เราสนใจออกมาโดยการชะด้วยสารละลายที่เหมาะสม ซึ่งจะทำให้สารที่ต้องการวิเคราะห์มีความเข้มข้นขึ้นและทำให้ตัวอย่างให้มีความบริสุทธิ์มากขึ้นก่อนการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคต่างๆ ต่อไป ซึ่งเป็นเทคนิคที่ได้รับความนิยม เพราะเตรียมตัวอย่างง่าย สะดวก รวดเร็ว ลดการสูญเสียตัวอย่าง ใช้ solvent น้อยกว่าวิธี LLE และเสี่ยงการปนเปื้อนจากสารอื่นๆ (108, 109) โดยขั้นตอนสำหรับการสกัดด้วย SPE มี 4 ขั้นตอนหลัก ดังนี้

1. Conditioning

เป็นขั้นตอนการเตรียม sorbent ที่บรรจุอยู่ใน SPE cartridges ให้พร้อมใช้งานรองรับสารตัวอย่าง โดยการใช้ solvent ที่เหมาะสม ส่วนมากจะใช้ methanol หรือ acetonitrile ผ่านไปยัง SPE cartridges ก่อนจะโหลดตัวอย่างในขั้นตอนต่อไป

2. Loading

เป็นขั้นตอนใส่สารตัวอย่างที่เป็นของเหลวลงไปใน packed SPE โดยอาศัยแรงดันจากระบบสุญญากาศหรือการใช้ปั๊ม โดยอัตราไหลของสารตัวอย่างต้องคงที่

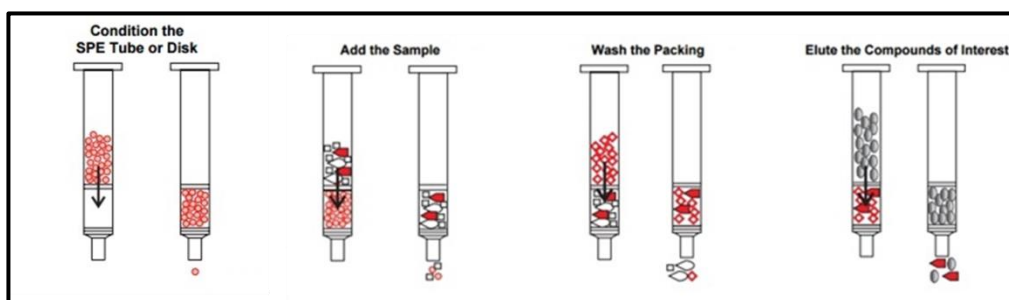
3. Washing

เป็นขั้นตอนที่ชะเอาสารที่เราไม่สนใจที่ติดอยู่ในผิว sorbent ออกไป ส่วนใหญ่จะใช้น้ำที่มี 10-20% organic solvent เป็นตัวชะ ตัวอย่างเช่น 10% methanol

4. Elution

เป็นขั้นตอนที่สารตัวอย่างที่เราสนใจที่ดูดซับอยู่ใน sorbent จะถูกชะด้วย eluting solvent ที่เหมาะสมด้วยเทคนิคอื่นๆต่อไป เช่น LC-MS/MS, GC-MS/MS และ HPLC เป็นต้น โดย eluting solvent ที่ดี ต้องสามารถชะสารตัวอย่างที่เราสนใจออกมาจาก sorbent ได้ทั้งหมด

แผนภาพของการสกัดแบบ SPE ดังแสดงในภาพที่ 9



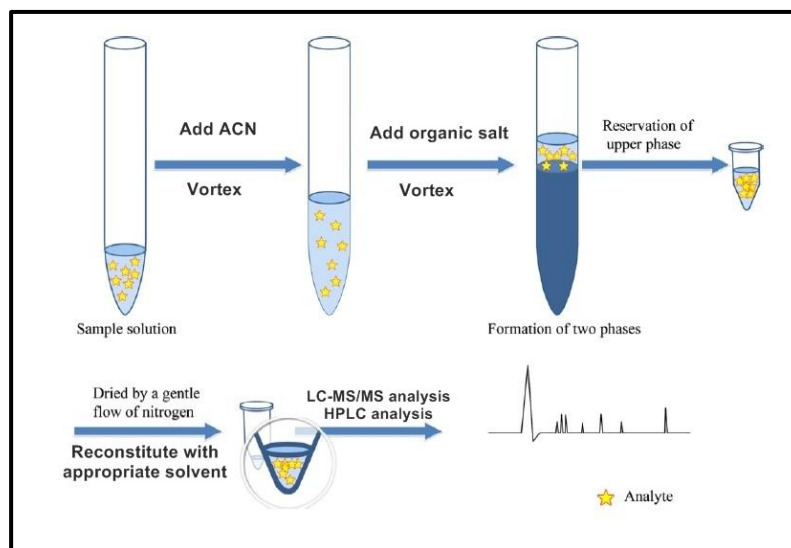
ภาพที่ 9 แผนภาพของการสกัดแบบ SPE

2.11.3 Salting-out assisted liquid/liquid extraction (SALLE)

เป็นวิธีที่ใช้ organic salt หรือ inorganic salt ที่มีความเป็นขั้วสูงและละลายได้ในน้ำจะถูกนำมาใช้สำหรับการสกัดด้วย SALLE โดยใส่ลงไปในสารละลายระหว่างชั้นน้ำและชั้นสารละลายอินทรีย์ที่ละลายน้ำได้ เช่น acetonitrile methanol และ acetone เป็นต้น เพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดการแยก ระหว่างชั้นสารละลายอินทรีย์ที่ละลายน้ำได้ที่อยู่ในชั้นน้ำ ทำให้สารที่มีขั้วย้ายไปอยู่ในชั้นสารอินทรีย์ โดยชนิดและความเข้มข้นของเกลือที่ต่างกัน เป็นปัจจัยที่จะทำให้การแยกชั้นต่างกัน

SALLE มีข้อดี คือ เป็นเทคนิคที่ง่าย ลดขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง ลดการใช้ solvent และประหยัดกว่า conventional method เช่น LLE และ SPE

แผนภาพของการสกัดแบบ SALLE ดังแสดงในภาพที่ 10



ภาพที่ 10 แผนภาพของการสกัดแบบ SALLE (110)

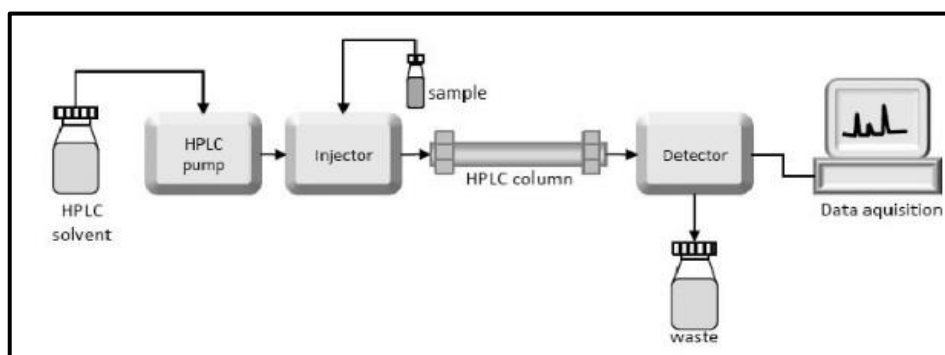
2.12 เทคนิคที่ใช้วิเคราะห์ BPA และ BPA-G

การวิเคราะห์ BPA และ BPA-G ต้องการเทคนิคที่มีความไวและความจำเพาะสูง เนื่องจาก BPA ที่มีอยู่ในตัวอย่างอาจมีปริมาณที่น้อยและมีความซับซ้อนของตัวอย่าง โดยเทคนิคที่นิยมใช้วิเคราะห์ BPA และ BPA-G ในตัวอย่าง ได้แก่ High-performance liquid chromatography (HPLC), Liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS), Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS) เป็นต้น นอกจากนี้ ยังมีวิธีอื่นๆ ด้วย immunochemical methods เช่น ELISA ซึ่งเทคนิคหลักๆ จะกล่าวในรายละเอียด ดังนี้

2.12.1 High-performance liquid chromatography (HPLC)

HPLC เป็นเครื่องมือที่ใช้วิเคราะห์ BPA และ BPA-G ที่อาศัยหลักการ การแยกองค์ประกอบของสารผสม โดยอาศัยความแตกต่างของอัตราการเคลื่อนที่ของสารผสมที่ดูดซับบนเฟสนิ่ง (stationary phase) ภายใต้การพาของเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) โดยสารที่จะถูกแยกออกมาในเวลาที่แตกต่างกัน ขึ้นกับความสามารถในการเข้ากันได้ดีของสารนั้นกับเฟสนิ่งหรือเฟสเคลื่อนที่ เช่น สารใดที่เข้ากันได้ไม่ดีกับเฟสเคลื่อนที่ หรือเข้ากันได้ดีกับเฟสนิ่ง จะถูกแยกออกมาทีหลัง โดยสารที่ถูกแยกจะเข้าสู่เครื่องตรวจวัด และสัญญาณที่ออกมาจะมีลักษณะเป็นพีค เรียกว่า โครมาโทแกรม

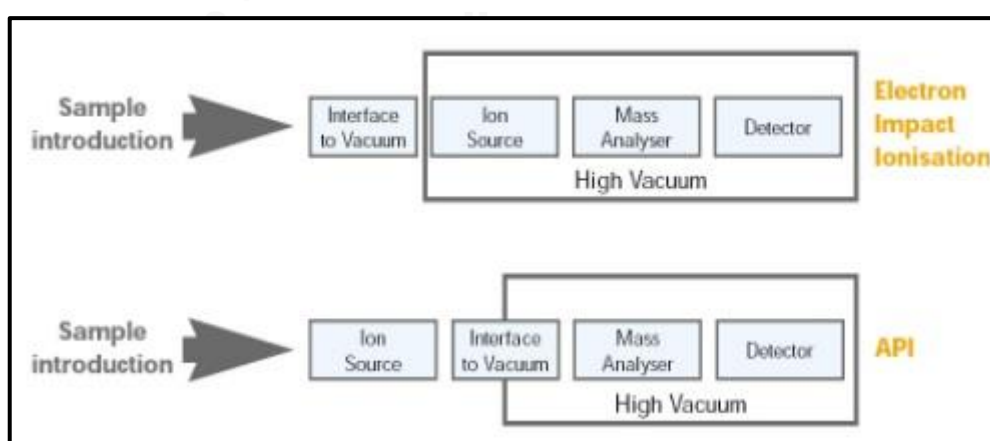
ส่วนประกอบของ HPLC ประกอบด้วย ส่วนที่เป็น mobile phase, pump, injector, column และ detector โดยแผนภาพของส่วนประกอบของ HPLC ดังแสดงในภาพที่ 11



ภาพที่ 11 แผนภาพของส่วนประกอบของ HPLC (111)

2.12.2 Liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS)

LC-MS เป็นเทคนิคขั้นสูง ที่ใช้วิเคราะห์หาชนิดและปริมาณสาร ที่การเตรียมตัวอย่างที่ดีมีความจำเป็น ซึ่งเทคนิค LC-MS จะมีความน่าเชื่อถือ มีความไวและมีความจำเพาะสูงกว่าการใช้ HPLC และมีข้อดีกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับ เทคนิค Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) ที่ต้องผ่านขั้นตอนกระบวนการ derivatization ที่มีความยุ่งยากและซับซ้อน (93) โดยส่วนประกอบของ LC-MS ประกอบด้วย ส่วนที่เป็น ionization source ที่เป็นส่วนทำให้ตัวอย่างแตกตัวเป็นไอออนด้วยวิธีต่าง เช่น electrospray ionization (ESI), Atmospheric Pressure Chemical Ionization (APCI) จากนั้นสารจะเข้าสู่ mass analyzer และถูกตรวจวัดด้วย detector และสัญญาณที่ออกมาจะมีลักษณะเป็นพีค เรียกว่า แมสสเปกตรัม ส่วนประกอบของ LC-MS ดังแสดงในภาพที่ 12

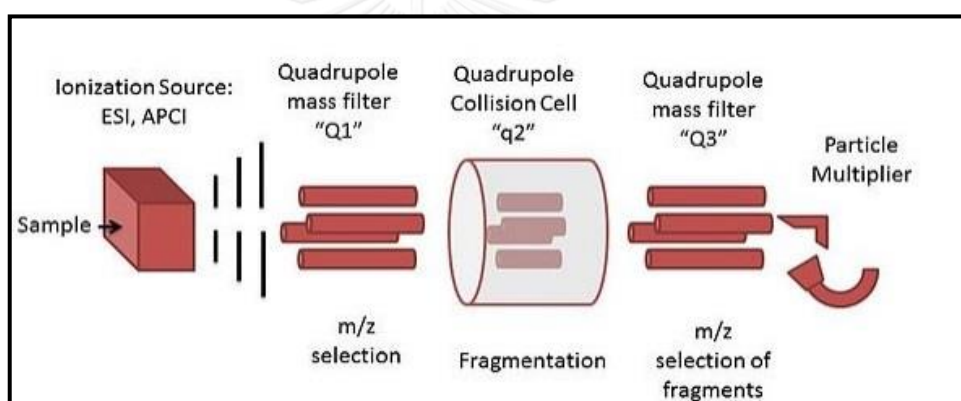


ภาพที่ 12 แผนภาพของส่วนประกอบของ LC-MS

(ที่มา: <http://share.psu.ac.th/blog/pan5/12403>)

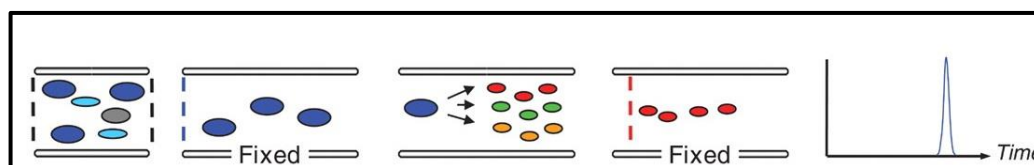
2.12.3 Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS)

LC-MS/MS เป็นเทคนิควิเคราะห์ขั้นสูง ที่มีความไวและความจำเพาะสูงมาก โดยส่วนประกอบต่างๆ จะคล้ายกับ LC-MS แต่มีส่วนของ analyzer 2 ตัวที่แยกออกจากกันด้วย Collision-induced dissociation (CID) โดยจะใช้หลักการ Multiple Reaction Monitoring (MRM) ในการเลือกสารที่ต้องการวิเคราะห์ โดยเริ่มจากการที่ตัวอย่างผ่านระบบ HPLC แล้ว ตัวอย่างเข้าสู่ขั้นตอนการแตกตัวให้เป็นไอออน จากนั้นเข้าสู่ mass analyzer ตัวที่ 1 ที่จะเลือกเฉพาะ parent ion ที่สนใจ จากนั้น parent ion ที่เราสนใจ จะเข้าสู่ collision cell แล้ว เกิดการแตกตัวเป็น fragment ion เข้าสู่ mass analyzer ตัวที่ 2 ที่จะเลือกเฉพาะ daughters ion ที่เราสนใจเท่านั้น เพื่อเข้าสู่ส่วน detector และสัญญาณที่ออกมาจะมีลักษณะเป็นพีค เรียกว่า แมสสเปกตรัม ส่วนประกอบของ LC-MS/MS ดังแสดงในภาพที่ 13 และหลักการ MRM ดังแสดงในภาพที่ 14



ภาพที่ 13 แผนภาพของส่วนประกอบของ LC-MS/MS

(ที่มา: https://en.wikipedia.org/wiki/Triple_quadrupole_mass_spectrometer)



ภาพที่ 14 หลักการ MRM

(ที่มา: <http://inac-sk.blogspot.com/p/appendix.html>)

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

-20 °C freezer	Sanyo Electric, ญี่ปุ่น
-80°C deep freezer	Ilshin Lab, เนเธอร์แลนด์
SPE cartridges	Waters, สหรัฐอเมริกา
SPE vacuum manifold	Teknokroma Anlitica, สเปน
Vacuum pump	Gast, สหรัฐอเมริกา
Nitrogen evaporators	Taitec, ญี่ปุ่น
ชุดกรองสารละลายตัวชะ	Duran, เยอรมัน
pH meter	Mettler Toledo, สวิตเซอร์แลนด์
Hot air oven	Memmert, เยอรมัน
Vortex mixer	AS1, นิวซีแลนด์
Volumetric flask 10 มิลลิลิตร	Witeg, เยอรมัน
Volumetric flask (25, 50 มิลลิลิตร)	Pyrex, สหรัฐอเมริกา
Serological pipette (5, 10 มิลลิลิตร)	Precicolor HGB, เยอรมัน
Beaker (10, 25, 50 มิลลิลิตร)	Pyrex, สหรัฐอเมริกา
Autopipette 1-10 ไมโครลิตร	Gilson, ฝรั่งเศส
Autopipette 10-100 ไมโครลิตร	Proline, สหรัฐอเมริกา
Autopipette 100-1000 ไมโครลิตร	Proline, สหรัฐอเมริกา
Autopipette 1000-5000 ไมโครลิตร	Gilson, ฝรั่งเศส
Pipette tips 0.5-10 ไมโครลิตร	Extragene, ไต้หวัน
Pipette tips 2-200 ไมโครลิตร	Gilson, ฝรั่งเศส
Centrifuge 3000 rpm	Kokusan, ฟิลิปปินส์
Centrifuge 15000 rpm	Boston Industries, Inc. สหรัฐอเมริกา
Centrifuge tube (15, 50 มิลลิลิตร)	Nest Biotechnology, สหรัฐอเมริกา
Microcentrifuge tube 1.5 มิลลิลิตร	Nest Biotechnology, สหรัฐอเมริกา
Glass micro-insert	La-Pha-Pack, สหรัฐอเมริกา
Vials and lids	La-Pha-Pack, สหรัฐอเมริกา

Vortex mixer Genie 2	Scientific Industries, สหรัฐอเมริกา
Agilent 1200 Infinity LC	Agilent Technologies, สหรัฐอเมริกา
LC-MS/MS (รุ่น QTRAP 5500 series)	ABSciex, สหรัฐอเมริกา
HPLC Class LC-10	Shimadzu, ญี่ปุ่น
UPS phenyl column	Vertical, ไทย
C18 column	Kinetex, แคลิฟอร์เนีย

3.2 สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

Bisphenol A	AccuStandard, สหรัฐอเมริกา
BPA-d16 (98%)	Cambridge Isotope Laboratory, สหรัฐอเมริกา
Bisphenol A β -D-glucuronide	Toronto Research Chemicals, แคนาดา
Bisphenol A- ¹³ C ₁₂ β -D-glucuronide	Toronto Research Chemicals, แคนาดา
Water, HPLC grade	Honeywell Burdick and Jackson, สหรัฐอเมริกา
Acetonitrile, HPLC grade	Honeywell Burdick and Jackson, สหรัฐอเมริกา
Methanol, HPLC grade	Honeywell Burdick and Jackson, สหรัฐอเมริกา
Ammonium acetate	Emsure, เยอรมัน
Acetic acid	Emsure, เยอรมัน
Potassium Chloride	ORëC, นิวซีแลนด์
Sodium Chloride	Merck, เยอรมัน
Urea	Amresco, สหรัฐอเมริกา
Citric acid	Emsure, เยอรมัน
Ascorbic acid	POCH, โปแลนด์
Potassium Phosphate	ORëC, นิวซีแลนด์
Creatinine	Merck, เยอรมัน
Sodium Hydroxide	Univar, ออสเตรเลีย
Sodium Bicarbonate	Merck, เยอรมัน
Sulfuric acid	Emsure, เยอรมัน

ในขั้นตอนการดำเนินการวิจัย แบ่งเป็น 2 ส่วนหลัก ได้แก่ การพัฒนาวิธีเพื่อหาปริมาณ BPA ในน้ำผลไม้/น้ำผัก และการพัฒนาวิธีหาปริมาณ BPA-G ในปัสสาวะของผู้ร่วมโครงการวิจัย

การทดลองที่ 1 การพัฒนากระบวนการสกัด BPA จากน้ำผลไม้/น้ำผักสำเร็จรูป ด้วย solid phase extraction (SPE) เพื่อใช้ในการตรวจด้วยเทคนิค LC-MS/MS

3.3 ตัวอย่างที่ใช้ในการวิจัย

น้ำผลไม้/น้ำผัก 21 ตัวอย่างที่สุ่มเลือกจากซูเปอร์มาร์เก็ตในกรุงเทพมหานคร ประเทศไทย ซึ่งประกอบไปด้วย sample 1 - sample 21

3.4 วิธีการวิจัย

3.4.1 การเตรียมอุปกรณ์และเครื่องแก้วก่อนทำการวิจัย

สาร BPA สามารถปนเปื้อนได้จากวัสดุอุปกรณ์ที่เป็นพลาสติก ดังนั้นในการเตรียมสารละลายมาตรฐานและสิ่งตัวอย่าง จึงจำเป็นต้องใช้เครื่องมือที่เป็นเครื่องแก้ว หรือพลาสติกชนิดพอลิโพรพิลีน (PP) โดยล้างทำความสะอาด แล้วจึงล้างด้วย น้ำ HPLC grade ตามด้วย 100% Acetonitrile (ACN) ตามลำดับ จากนั้นให้นำเครื่องแก้วไปอบแห้ง เพื่อใช้เตรียมสารมาตรฐานและตัวอย่างต่อไป

3.4.2 การหาปริมาณ BPA ในน้ำผลไม้/น้ำผักสำเร็จรูป

3.4.2.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน BPA และ BPA-d16 สำหรับทำข้อมูลกราฟมาตรฐาน เพื่อใช้ในการหาความเข้มข้นของ BPA ในสิ่งตัวอย่าง

นำ stock standard BPA 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (AccuStandard (New Haven, USA)) มาทำการเตรียม working standard BPA โดยการนำ stock standard BPA มาปริมาตร 500 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรด้วย 30% ACN ให้ได้ปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตร ใน volumetric flask เก็บเป็น working standard BPA จากนั้นในการเตรียมสารละลายมาตรฐาน BPA ความเข้มข้น 2.5, 5, 10, 15, 25 และ 50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ให้ปิเปต working standard BPA มาปริมาตร 6.25 ไมโครลิตร, 12.5 ไมโครลิตร, 25 ไมโครลิตร, 37.5 ไมโครลิตร, 62.5 ไมโครลิตร และ 125 ไมโครลิตร ตามลำดับ จากนั้นปรับปริมาตรทั้ง 6 ความเข้มข้นด้วย pooled BPA-d16 (Pooled Internal Standard) ความเข้มข้น 5 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ให้ได้ 25 มิลลิลิตร ใน volumetric flask จากนั้นแบ่งสารมาตรฐานใส่หลอดทดลอง และเก็บที่อุณหภูมิต่ำ -80 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้

ซึ่งสาร BPA-d16 (Cambridge Isotope Laboratory, Inc (MA, USA)) 5 มิลลิกรัม ละลายใน 30% ACN ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน แล้วปรับปริมาตรด้วย 30% ACN ให้ได้ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ใน volumetric flask เก็บเป็น stock standard BPA-d16 หลังจากนั้นนำ stock standard BPA-d16 มาปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย 30% ACN ให้ได้ปริมาตร 50 มิลลิลิตรใน volumetric flask เก็บเป็น working standard BPA-d16 เพื่อใช้เป็น internal standard จากนั้นแบ่งสารมาตรฐานใส่หลอดทดลอง และเก็บที่อุณหภูมิต่ำ -80 องศาเซลเซียสเช่นเดียวกับ BPA

เตรียม pooled BPA-d16 ความเข้มข้น 5 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร โดยนำ working standard BPA-d16 มาปริมาตร 250 ไมโครลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วย 30% ACN ให้ได้ปริมาตรเป็น 500 มิลลิลิตร ใน volumetric flask

3.4.2.2 การพัฒนาวิธีเพื่อแยก flavonoids ออกจากน้ำผลไม้ (น้ำส้ม 100%) ออกจาก BPA โดยวิธี High-Performance Liquid Chromatography (HPLC)

ในการวิเคราะห์หาปริมาณ BPA ด้วย LC-MS/MS ต้องทำการสกัด BPA จากน้ำผลไม้/น้ำผัก ด้วย SPE จากนั้นวิเคราะห์หาปริมาณ BPA โดยใช้ chromatographic condition แบบ binary gradient elution ซึ่งต้องใช้เวลาานต่อหนึ่งตัวอย่าง ดังนั้น ผู้วิจัยจึงต้องการเพิ่มประสิทธิภาพในการวิเคราะห์หาปริมาณ BPA โดยมีจุดประสงค์ในการพัฒนากระบวนการสกัด BPA ด้วย SPE ที่สามารถกำจัด flavonoids ที่มีอยู่ในน้ำผลไม้/น้ำผัก ซึ่งรบกวนการวิเคราะห์ BPA ด้วยเทคนิค LC-MS/MS ดังนั้น ผู้วิจัยจึงใช้ standard Bisphenol A (BPA) และ Bisphenol B (BPB) เติมน้ำผลไม้แบบกล่อง (น้ำส้ม 100%) เพื่อใช้เป็น model สำหรับหาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัด BPA ออกจากน้ำผลไม้ การเติม BPB ซึ่งมีโครงสร้างใกล้เคียงกับ BPA มากที่สุด แตกต่างเพียงมีการเติมหมู่เมทิล CH₃ เพิ่ม 1 หมู่ ดังนั้น ถ้าสามารถพัฒนาระบบ solvent ที่ใช้ในการแยก BPA ออกจาก BPB และ flavonoids โดย reverse phase HPLC ได้ ระบบ solvent นั้น ก็จะเหมาะสมที่จะนำไปใช้ในการสกัดแยก BPA ออกจาก flavonoids ในน้ำผลไม้/น้ำผัก ด้วย C18 SPE ต่อไป โดย mobile phase ที่ใช้พัฒนาวิธี มีทั้งหมด 3 ระบบ ได้แก่

1. Solvent A ประกอบด้วย 100% ACN และ H₂O
2. Solvent B ประกอบด้วย ACN และ 25 mM acetic acid/25 mM ammonium acetate (1.45:1, v/v)
3. Solvent C ประกอบด้วย ACN และ 2% acetic acid

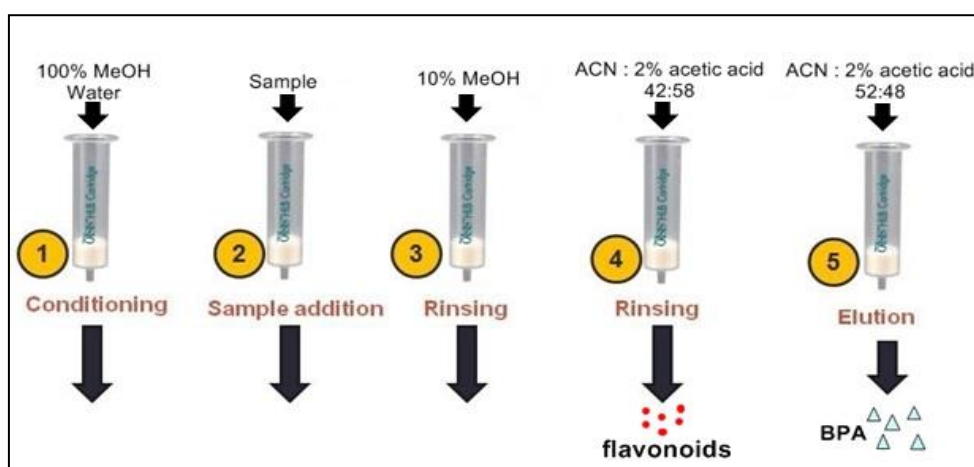
HPLC (Class LC-10, Shimadzu) คอลัมน์ UPS phenyl column, 2.1 x 100 mm และใช้ทั้ง UV detector wavelength 265 nm และ fluorescence detector ที่ Excited wavelength 273 nm และ Emission wavelength 300 nm

3.4.2.3 การเตรียมตัวอย่างน้ำผลไม้/น้ำผัก

นำตัวอย่างน้ำผลไม้/น้ำผัก มาวัดค่า pH เพื่อดูความเป็นกรด จากนั้นนำไปปั่นที่ความเร็วรอบ 3000 rpm เป็นเวลา 10 นาที เมื่อครบเวลาให้นำเฉพาะส่วนใสของน้ำผลไม้/น้ำผัก ปริมาณ 5 มิลลิลิตร ตูดอก 2.5 ไมโครลิตร นำมาผสมกับ internal standard (working standard BPA-d16) 2.5 ไมโครลิตร จะได้ความเข้มข้นของ internal standard เท่ากับ 5 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วสกัดด้วยวิธี SPE หรือเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 °C จนกว่าจะนำมาสกัด

3.4.2.4 การสกัด BPA ในตัวอย่างน้ำผลไม้ด้วย SPE

เริ่มต้น equilibrate คอลัมน์ให้เต็มไปด้วย 100% methanol 10 มิลลิลิตร ตามด้วย น้ำ 10 มิลลิลิตร เพื่อให้คอลัมน์พร้อมใช้งาน จากนั้นเติมน้ำผลไม้/น้ำผักที่เตรียมไว้ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงไป แล้วเติม 10% methanol ตามด้วย สารละลาย ACN: 2% acetic acid (42: 58) เพื่อชะสารต่างๆ ที่มีอยู่ในน้ำผลไม้/น้ำผัก เช่น สาร flavonoids ที่จับไป โดยใช้ flow rate ที่ 1 มิลลิลิตรต่อนาที จากนั้นเก็บ BPA ในน้ำผลไม้ด้วยสารละลายอัตราส่วน ACN: 2% acetic acid (52: 48) ดังแผนภาพ



ภาพที่ 15 วิธีการสกัดน้ำผลไม้/น้ำผักด้วยวิธี SPE

เก็บสารละลายที่ชะจากคอลัมน์ SPE ที่ -80 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไประเหยแห้ง ด้วยเครื่องระเหยสารแบบไนโตรเจน (Nitrogen evaporator) จากนั้นนำมาละลายกลับด้วย 30% ACN ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ก่อนที่จะนำไปวิเคราะห์หา BPA โดยวิธี LC-MS/MS ต่อไป

3.4.2.5 ขั้นตอนการตรวจวัด BPA ด้วยเทคนิควิเคราะห์ LC-MS/MS

การหาปริมาณ BPA ในน้ำผลไม้/น้ำผักและในปัสสาวะ วิเคราะห์โดยเทคนิค LC-MS/MS โดยมี LC ต่อเข้ากับ MS/MS โดยเทคนิคที่ทำให้สารแตกตัวเป็นไอออน คือ electrospray ionization (ESI)

การวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Liquid Chromatography Tandem Mass spectrometry (LC-MS/MS) ของบริษัท AB SCIEX รุ่น QTRAP 5500 ใช้คอลัมน์ชนิด C18 ขนาด 50 x 2.1 มิลลิเมตร ยี่ห้อ kinetex โดยปรับอุณหภูมิของคอลัมน์เป็น 25 องศาเซลเซียส โดยมี mobile phase คือ 1 mM ammonium acetate (A) และ 100% ACN (B) จากนั้นใช้ solvent B 80% ในการชะสารแบบ isocratic elution เป็นเวลา 3 นาที โดยมี flow rate เป็น 200 ไมโครลิตรต่อนาที โดยฉีดครั้งละ 10 ไมโครลิตร ต่อตัวอย่าง รายละเอียดดังตารางที่ 1

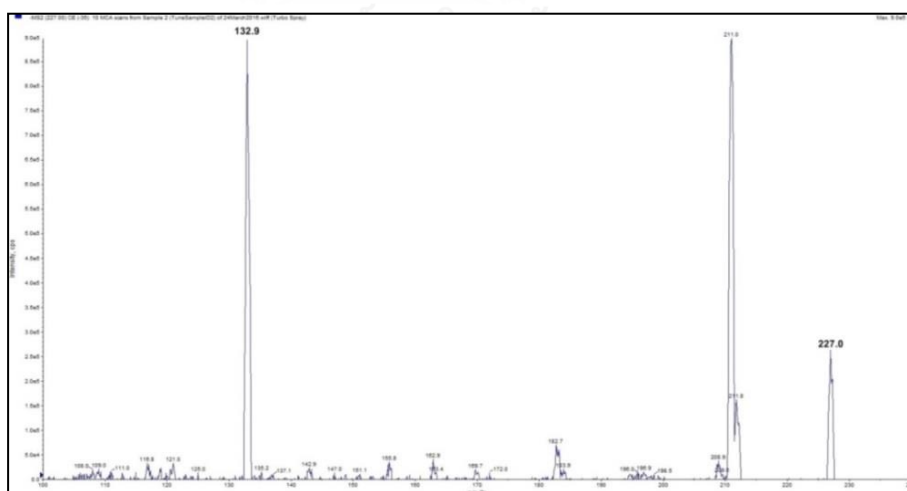
ตารางที่ 1 Mobile phase ที่ใช้ในการวิเคราะห์ BPA ในน้ำผลไม้/น้ำผัก

นาที	%1mM Ammonium Acetate (Mobile Phase A)	%ACN (Mobile Phase B)
0.00	20	80
3.00	20	80

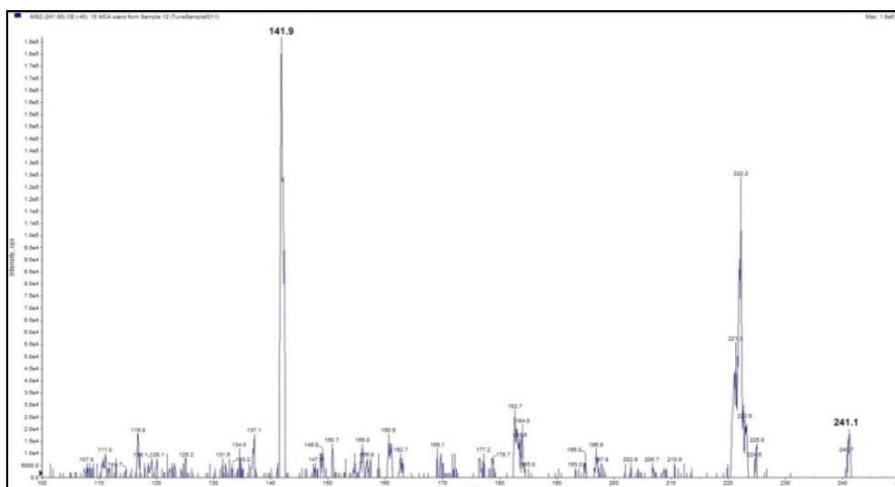
สำหรับ MS/MS parameter ของ BPA มี Precursor ion mass คือ 226.9 m/z, Product ion mass คือ 133.0 m/z และสำหรับ BPA-d16 มี Precursor ion mass คือ 241.1 m/z, Product ion mass คือ 141.9 m/z รายละเอียดดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 MS/MS parameter ของ BPA และ BPA-d16

Compound	Time (msec)	MRM (m/z)	DP (Volts)	EP (Volts)	CE (Volts)	CXP (Volts)
BPA	200	227.0 - 132.9	-30	-8	-35	-16
BPA-d16	200	241.1 - 141.9	-100	-10	-40	-16



ภาพที่ 16 MS/MS fragmentation ของ BPA (227.0 >132.9)



ภาพที่ 17 MS/MS fragmentation ของ BPA-d16 (241.1 >141.9)

3.4.2.6 การวิเคราะห์ผลการทดลอง

1. Linearity พิจารณาจาก Standard curve ระหว่าง area ratio ของ BPA และ BPA-d16 และความเข้มข้นของ BPA โดยใช้ least-squares linear regression analysis
2. Lower limit of detection (LLOD) พิจารณา จาก signal to noise ratio (S/N) เท่ากับ 3
3. Lower limit of quantification (LLOQ) พิจารณา จาก signal to noise ratio (S/N) เท่ากับ 10

หลังจากการวิเคราะห์หาปริมาณ BPA ด้วยเทคนิค LC-MS/MS จะรวบรวมข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์มาทำการแปลผล คำนวณ พร้อมทั้งสรุปผลโดย จะนำผลการวิเคราะห์สาร BPA มาตรฐานมาคำนวณหาค่า %CV ในทุกความเข้มข้นของสารมาตรฐานเพื่อดูความเที่ยงตรงของการวิเคราะห์จากสูตร

$$\%CV = (SD \div \text{Mean}) \times 100$$

จากนั้นนำข้อมูลของการวิเคราะห์สารมาตรฐานมาทำกราฟมาตรฐานระหว่าง peak area ratio และความเข้มข้นของ BPA เพื่อใช้เป็นกราฟสำหรับหาปริมาณ BPA ในตัวอย่าง สำหรับสิ่งตัวอย่างที่วิเคราะห์ได้จะนำข้อมูลมาหาค่า %CV และ peak area ratio แล้วใช้คำนวณหาความเข้มข้นของ BPA ในตัวอย่างจากกราฟมาตรฐานดังกล่าว

การหาปริมาณของ BPA ในตัวอย่างทำได้โดยเทียบกับสารมาตรฐาน BPA ที่ความเข้มข้น 2.5, 5, 10, 15, 25, และ 50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมี BPA-d16 ความเข้มข้น 5 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร เป็น internal standard

ในขั้นตอนการวิเคราะห์ จะทำการฉีดวิเคราะห์สารมาตรฐาน BPA ที่ความเข้มข้น 2.5, 5, 10, 15, 25 และ 50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวนสามครั้ง เพื่อสร้างกราฟมาตรฐานระหว่าง peak area ratio และความเข้มข้นของ BPA สำหรับการวิเคราะห์ โดยกราฟมาตรฐานนี้จะใช้ในการหาปริมาณสาร BPA ในสิ่งตัวอย่าง จากนั้นจะทำการละลายกลับตัวอย่างด้วย 30% ACN ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วฉีดซ้ำสามครั้งต่อตัวอย่าง ปริมาตร 10 ไมโครลิตร แล้วนำค่า peak area ratio ที่ได้มาเทียบกับกราฟมาตรฐานเพื่อหาปริมาณสาร BPA และนำข้อมูลที่ได้มาหาค่า %recovery เพื่อดูความสามารถในการได้กลับคืนมาของ BPA-d16 (IS) หลังจากการสกัดสาร ซึ่งบ่งบอกถึงประสิทธิภาพของการสกัดสาร จากสูตร

$$\% \text{ Recovery} = (\text{BPA-d16 Area ที่ผ่านการสกัดด้วย SPE} \div \text{BPA-d16 Area Standard}) \times 100$$

การทดลองที่ 2 การพัฒนากระบวนการสกัด BPA-G ในปัสสาวะ ด้วย salting-out assisted liquid/liquid extraction (SALLE) เพื่อใช้ในการตรวจด้วยเทคนิค LC-MS/MS

3.4.3 การหาปริมาณ BPA-G ในตัวอย่างปัสสาวะ

ในขั้นตอนการดำเนินการวิจัย จะประกอบด้วยขั้นตอนหลัก คือ การคัดเลือกผู้ร่วมโครงการวิจัยการเก็บปัสสาวะ การเตรียมสารละลายมาตรฐานสำหรับทำข้อมูลกราฟมาตรฐาน เพื่อใช้ในการหาความเข้มข้นของ BPA-glucuronide (BPA-G) ในสิ่งตัวอย่าง ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างปัสสาวะ ขั้นตอนการตรวจวัดด้วยเทคนิควิเคราะห์ LC-MS/MS และสุดท้ายคือขั้นตอนการวิเคราะห์และสรุปผล

3.4.3.1 การเตรียมผู้มีส่วนร่วมในงานวิจัย เพื่อเข้าร่วมในโครงการวิจัย

1. ผู้ร่วมโครงการวิจัย

นิสิตและเจ้าหน้าที่คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่มีอายุระหว่าง 20-28 ปี จำนวน 20 คน โดยการเดินเข้าไปหา แล้วแจกแบบสอบถาม การสำรวจความเสี่ยงในการได้รับสาร BPA เลือกเฉพาะผู้ที่มีความเสี่ยงต่ำที่มีคะแนนการตอบแบบสอบถามที่ได้คะแนน 7-15 คะแนน โดยเกณฑ์การให้คะแนนอยู่ในแบบสอบถาม นอกจากนี้ต้องเป็นผู้ที่มีการทำงานของไตปกติโดยเจาะเลือด เพื่อคัดกรองผู้ร่วมโครงการวิจัย ปริมาตร ประมาณ 3 cc และเก็บปัสสาวะ ปริมาตร ประมาณ 15 cc โดยตรวจค่า ALT อยู่ในช่วงปกติ 0-40 ยูนิตต่อลิตร และการทำงานของไตปกติ โดยตรวจด้วย

urine test strip เพื่อตรวจระดับสารที่ขับออกมาทางปัสสาวะ เช่น กลูโคส โปรตีน เป็นต้น ซึ่งให้ผลปกติ เพื่อจะได้ไม่มีผลต่อกระบวนการเมตาบอลิซึมและขับสาร BPA ออกจากร่างกาย

โครงการนี้ได้ผ่านการพิจารณาจากคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ กลุ่ม สหสถาบันชุดที่ 1 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย COA No. 137/2558 เลขที่โครงการวิจัย 095/58

เกณฑ์การคัดเลือก (Inclusion criteria)

1. เพศชาย หรือหญิง อายุระหว่าง 20-25 ปี จำนวน 20 คน
2. ผู้ที่ตอบแบบสอบถามที่ได้คะแนน 7-15 คะแนน
3. สามารถช่วยเหลือตัวเองในการเก็บปัสสาวะได้
4. เป็นผู้ที่มีการทำงานของตับ และไตปกติ

เกณฑ์ในการคัดออก (Exclusion criteria)

1. เก็บปัสสาวะได้ต่ำกว่าปริมาณที่กำหนด
2. ปัสสาวะที่มีสิ่งผิดปกติเจือปน หรือ พิจารณาแล้วว่าไม่สามารถนำมาตรวจวิเคราะห์ได้

2. วิธีการดำเนินการวิจัยเพื่อศึกษาปริมาณ BPA-G ในปัสสาวะของผู้เข้าร่วมโครงการวิจัย

ขอความร่วมมือให้ผู้ร่วมโครงการวิจัยเก็บปัสสาวะโดยเก็บเป็น first morning urine 2 วัน และทำการตรวจค่า creatinine เนื่องจากปริมาณปัสสาวะของแต่ละบุคคลขึ้นกับปัจจัยหลายอย่าง เช่น การดื่มน้ำ การออกกำลังกาย ปัจจัยการใช้ชีวิตอื่นๆ เพื่อควบคุมความแตกต่างของปริมาณของ ปัสสาวะ ความเข้มข้นของ BPA ในปัสสาวะจึงต้องปรับเทียบกับ ระดับของ creatinine ที่อยู่ใน ปัสสาวะของแต่ละคน ซึ่งมีค่าคงที่ นอกจากนี้ยังบอกถึงการทำหน้าที่ของไตร่วมด้วย (102) นอกจากนี้ ยังขอความร่วมมือให้ผู้ร่วมโครงการวิจัย งดรับประทานอาหารกระป๋องอื่นๆ ในช่วงเวลาที่อยู่ใน โครงการวิจัยด้วย

3.4.3.2 เตรียม standard Bisphenol A β -D glucuronide (BPA-G)

เตรียม stock standard BPA-G 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยละลายด้วย 50% ACN 1000 ไมโครลิตร จากนั้นทำการเตรียม working standard BPA-G โดยการนำ stock standard BPA-G ปริมาตร 125 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรด้วย 50 % ACN ให้ได้ปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตร ใน volumetric flask เก็บเป็น working standard BPA-G เตรียม stock Bisphenol A13C12 β -D glucuronide (13C12-BPAG) 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยละลายด้วย 50% ACN 1000 ไมโครลิตร จากนั้นทำการเตรียม working standard 13C12-BPA-G โดยการ นำ stock standard 13C12 BPA-G มาปริมาตร 125 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรด้วย 50% ACN ให้ได้ปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตร ใน volumetric flask เก็บเป็น working standard 13C12 BPA-G เพื่อใช้เป็น internal Standard

จากนั้นในการเตรียมสารละลายมาตรฐาน BPA-G ที่จะใช้เจาะจงให้ได้ความเข้มข้น 5, 10, 20, 30, 50 และ 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร เตรียมเพื่อจะได้ spike ปริมาตรเท่ากันทุกความเข้มข้นทั้งระบบ โดยมีวิธีการดังนี้

Standard BPA-G 5 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร เตรียมจาก standard BPA-G 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร
Standard BPA-G 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร เตรียมจาก standard BPA-G 200 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร

Standard BPA-G 20 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร เตรียมจาก standard BPA-G 400 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร

Standard BPA-G 30 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร เตรียมจาก standard BPA-G 600 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร

Standard BPA-G 50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร เตรียมจาก standard BPA-G 1000 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร

Standard BPA-G 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร เตรียมจาก standard BPA-G 2000 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร

เตรียม $^{13}\text{C}_{12}$ -BPAG ความเข้มข้น 400 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร โดยนำ working standard $^{13}\text{C}_{12}$ -BPAG ปริมาตร 1600 ไมโครลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วย 30% ACN ให้ได้ปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร ใน volumetric flask

ผู้วิจัยได้พัฒนาวิธีในการหาปริมาณ BPA-G ในปัสสาวะ 2 วิธี คือ วิธีที่ 1 การหาปริมาณ BPA-G จากกราฟมาตรฐานแบบ matrix matched calibration curve โดยวิธีการ spike standard ลงใน human urine และวิธีที่ 2 การหาปริมาณ BPA-G จากกราฟมาตรฐานแบบ matrix matched calibration curve โดยวิธีการ spike standard ลงใน synthetic urine ซึ่งไม่มีการปนเปื้อนของ BPA-G

สำหรับการเตรียม standard BPA-G ใน human urine หรือ synthetic urine ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 การเตรียม standard BPA-G ความเข้มข้น 0,1, 5, 10, 20, 30, 50 และ 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร

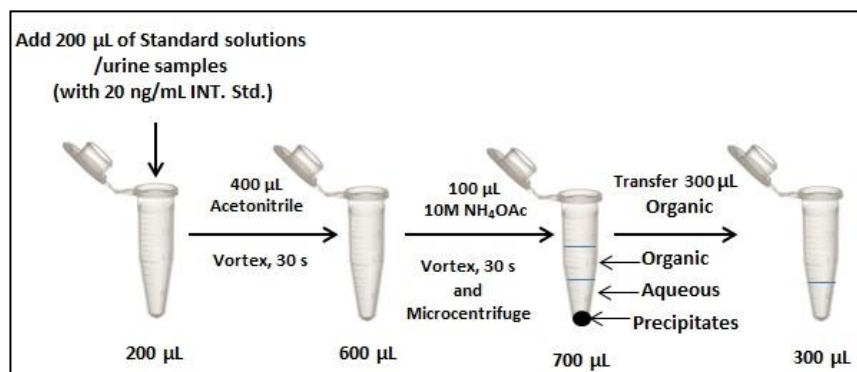
					Working BPA-G (ng/mL)							
Standard BPAG (ng/mL)	Synthetic /human urine (μL)	30% ACN (μL)	Water (μL)	IS 400 ng/mL (μL)	20 (μL)	100 (μL)	200 (μL)	400 (μL)	600 (μL)	1000 (μL)	2000 (μL)	
0	900	50	-	50	-	-	-	-	-	-	-	
1	900	-	-	50	50	-	-	-	-	-	-	
5	900	-	-	50	-	50	-	-	-	-	-	
10	900	-	-	50	-	-	50	-	-	-	-	
20	900	-	-	50	-	-	-	50	-	-	-	
30	900	-	-	50	-	-	-	-	50	-	-	
50	900	-	-	50	-	-	-	-	-	50	-	
100	900	-	-	50	-	-	-	-	-	-	50	
MB	-	50	900	50	-	-	-	-	-	-	-	

MB : Method blank



3.4.3.3 การเตรียมสารมาตรฐานในปัสสาวะและการเตรียมตัวอย่างปัสสาวะ

นำสารมาตรฐานใน human urine/synthetic urine และตัวอย่างปัสสาวะที่เตรียมไว้ ไปตกตะกอนด้วย 10M ammonium acetate ตามวิธีการ ดังนี้



ภาพที่ 18 การเตรียมสารมาตรฐานและตัวอย่างปัสสาวะด้วยวิธี SALLE

จากนั้นนำชั้น organic ไประเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยสารแบบไนโตรเจน (Nitrogen evaporator) แล้วละลายกลับด้วย 1 mM Ammonium acetate ปริมาตร 200 ไมโครลิตร แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค LC-MS/MS

3.4.3.4 ขั้นตอนการตรวจวัด BPA-G ด้วยเทคนิควิเคราะห์ LC-MS/MS

การวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Liquid Chromatography Tandem Mass spectrometry (LC-MS/MS) ของบริษัท AB SCIEX รุ่น QTRAP 5500 ใช้คอลัมน์ชนิด C18 ขนาด 50 x 2.1 มิลลิเมตร (Phenomenex) โดยปรับอุณหภูมิเป็น 30 องศาเซลเซียส และ flow rate เป็น 200 ไมโครลิตรต่อนาที จากนั้นใช้การชะสารแบบ gradient elution ออกจากคอลัมน์ รายละเอียดดังตารางที่ 4

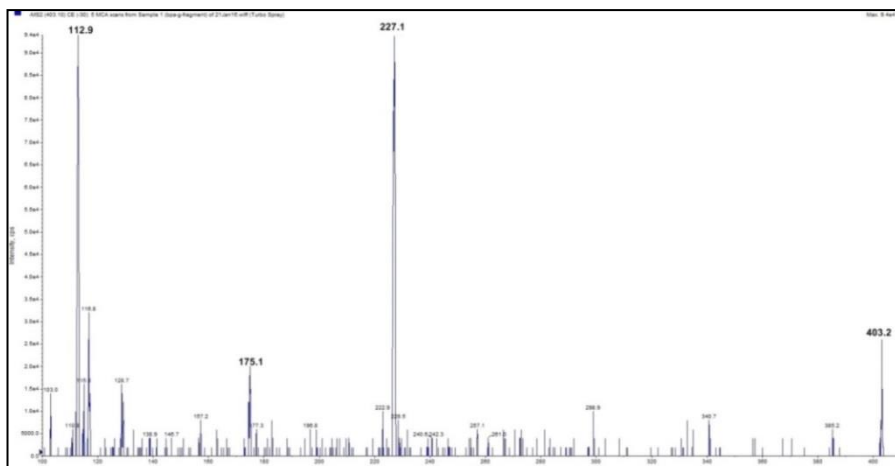
ตารางที่ 4 Mobile phase ที่ใช้ในการวิเคราะห์ BPA-G ในตัวอย่างปัสสาวะ

นาที	%1mM Ammonium Acetate (Mobile Phase A)	% ACN (Mobile Phase B)
0.00	65	35
1.00	65	35
2.00	0	100
9.00	0	100
10.00	65	35
15.00	65	35

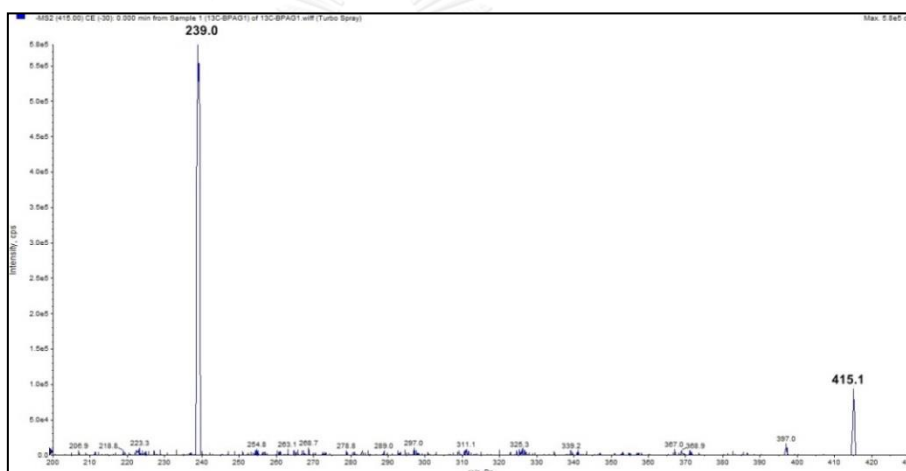
สำหรับ MS/MS parameter ของ Bisphenol A β -D glucuronide (BPA-G) มี precursor ion mass 403.2 m/z, product ion mass คือ 227.0 m/z และสำหรับ Bisphenol A $^{13}\text{C}_{12}$ β -D glucuronide ($^{13}\text{C}_{12}$ -BPAG) มี precursor ion mass คือ 415.0 m/z, product ion mass 239.0 m/z รายละเอียดดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 MS/MS parameter ของ BPA-G และ $^{13}\text{C}_{12}$ -BPAG

Compound	Time (msec)	MRM (m/z)	DP (Volts)	EP (Volts)	CE (Volts)	CXP (Volts)
BPA-G	200	403.2 -227.1	-57	-5	-33.8	-6
$^{13}\text{C}_{12}$ -BPAG	200	415.1 -239.0	-105	-4.2	-36	-12



ภาพที่ 19 MS/MS fragmentation ของ Bisphenol A β -D glucuronide



ภาพที่ 20 MS/MS fragmentation ของ Bisphenol A $^{13}\text{C}_{12}$ β -D glucuronide

การหาปริมาณของ BPA-G ในตัวอย่างทำได้โดยเทียบกับสารมาตรฐาน BPA ที่ความเข้มข้น 5, 10, 20, 30, และ 50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมี $^{13}\text{C}_{12}$ -BPAG ความเข้มข้น 20 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร เป็น internal standard

ในขั้นตอนการวิเคราะห์ จะทำการฉีดวิเคราะห์สารมาตรฐาน BPA ที่ความเข้มข้น 5, 10, 20, 30, และ 50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวนสามครั้ง เพื่อสร้างกราฟมาตรฐานระหว่าง peak area ratio และความเข้มข้นของ BPA-G สำหรับการวิเคราะห์ โดยกราฟมาตรฐานนี้จะใช้ในการหาปริมาณสาร BPA-G ในสิ่งตัวอย่าง จากนั้นจะทำการละลายกลับสิ่งตัวอย่างด้วย 1mM ammonium acetate ปริมาตร 200 ไมโครลิตร แล้วฉีดซ้ำสามครั้งต่อตัวอย่าง ปริมาตร 5 ไมโครลิตร แล้วนำค่า peak area ratio ที่ได้มาเทียบกับกราฟมาตรฐานเพื่อหาปริมาณสาร BPA-G และนำข้อมูลที่ได้มาหา

ค่า % recovery เพื่อดูความสามารถในการได้กลับคืนหลังจากสกัด BPA-G ด้วย SALLE ซึ่งบ่งบอกถึงประสิทธิภาพของการสกัดสารจากสูตร

% Recovery = (area ratio ระหว่าง BPA-G: $^{13}\text{C}_{12}$ -BPAG ที่เติมก่อนการสกัดด้วย SALLE method ÷ area ratio ระหว่าง BPA-G: $^{13}\text{C}_{12}$ -BPAG ที่เติมหลังการสกัดด้วย SALLE method) x 100

3.4.3.5 การวิเคราะห์ผลการทดลอง

1. Linearity พิจารณาจาก Standard curve ระหว่าง area ratio ของ BPA-G และ $^{13}\text{C}_{12}$ -BPAG และความเข้มข้นของ BPA โดยใช้ least-squares linear regression analysis

2. Lower limit of detection (LLOD) พิจารณา จาก signal to noise ratio (S/N) เท่ากับ 3

3. Lower limit of quantification (LLOQ) พิจารณา จาก signal to noise ratio (S/N) เท่ากับ 10

หลังจากการวิเคราะห์หาปริมาณ BPA ด้วยเทคนิค LC-MS/MS จะรวบรวมข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์มาทำการแปลผล คำนวณ พร้อมทั้งสรุปผลโดย จะนำผลการวิเคราะห์สาร BPA มาตรฐานมาคำนวณหาค่า %CV ในทุกความเข้มข้นของสารมาตรฐานเพื่อดูความเที่ยงตรงของการวิเคราะห์จากสูตร

$$\%CV = (SD \div \text{Mean}) \times 100$$

จากนั้นนำข้อมูลของการวิเคราะห์สารมาตรฐานมาทำกราฟมาตรฐานระหว่าง peak area ratio และความเข้มข้นของ BPA-G เพื่อใช้เป็นกราฟมาตรฐาน สำหรับหาปริมาณ BPA-G ในตัวอย่างปัสสาวะ สำหรับสิ่งตัวอย่างที่วิเคราะห์ได้จะนำข้อมูลมาหาค่า %CV และ peak area ratio แล้วใช้คำนวณหาความเข้มข้นของ BPA-G ในตัวอย่างจากกราฟมาตรฐานดังกล่าว และนำมาปรับค่าที่แท้จริงด้วย creatinine concentration จากสูตร

$$\text{ความเข้มข้นของ BPA-G ที่วิเคราะห์ได้ } (\mu\text{g/L}) = \text{ความเข้มข้นของ creatinine (g/L)}$$

บทที่ 4

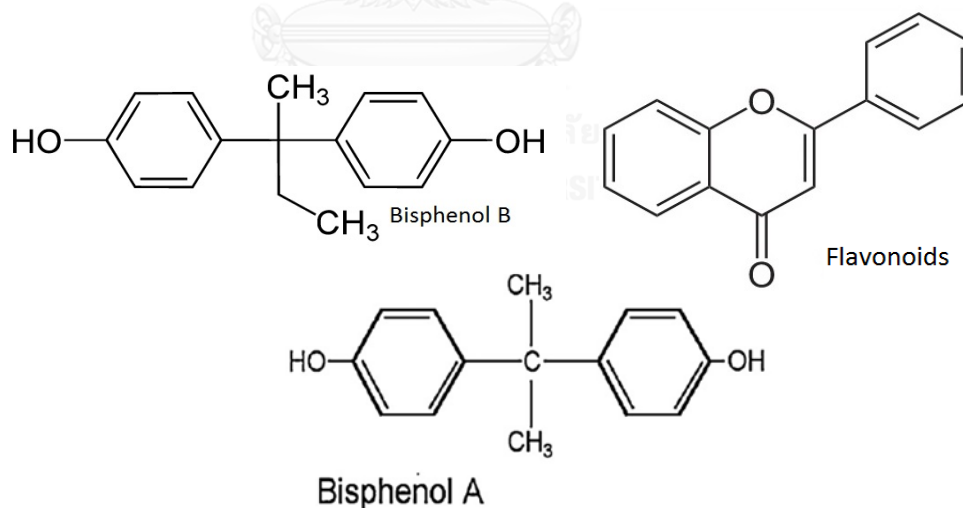
ผลการวิจัยและอภิปรายผล

4.1 การพัฒนากระบวนการสกัด BPA จากน้ำผลไม้/น้ำผักสำเร็จรูป ด้วย solid phase extraction (SPE) เพื่อใช้ในการตรวจด้วยเทคนิค LC-MS/MS

ในการพัฒนาวิธีการหาปริมาณ BPA ในน้ำผลไม้/น้ำผัก เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการวิเคราะห์หาปริมาณ BPA ด้วย LC-MS/MS ผู้วิจัยประสบความสำเร็จในการพัฒนากระบวนการสกัด BPA ด้วย C18 SPE ที่สามารถกำจัด flavonoids ที่มีอยู่ในน้ำผลไม้/น้ำผัก ซึ่งกระบวนการวิเคราะห์ BPA ออกไป ก่อนวิเคราะห์ด้วยเทคนิค LC-MS/MS ซึ่งช่วยให้ลดเวลาในการวิเคราะห์ตัวอย่างลงจากเดิม โดยการใช้ chromatographic condition แบบ isocratic elution แทน binary gradient elution ซึ่งต้องใช้เวลานานต่อหนึ่งตัวอย่าง

4.1.1 การพัฒนาวิธีเพื่อแยก flavonoids ออกจากน้ำผลไม้ (น้ำส้ม 100%) ออกจาก BPA โดยวิธี High-Performance Liquid Chromatography (HPLC)

ผู้วิจัยใช้ standard Bisphenol A (BPA) และ Bisphenol B (BPB) เติมลงไปน้ำส้ม 100% ชนิดบรรจุกล่อง เพื่อใช้เป็น model สำหรับหาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัด BPA ออกจากน้ำผลไม้



ภาพที่ 21 โครงสร้างของ BPA BPB และ flavonoids

ซึ่งมี flavonoids เป็นองค์ประกอบหลัก และมีโครงสร้างที่คล้ายคลึงกับ BPA และ BPB เมื่อนำตัวอย่างไปวิเคราะห์ด้วย reverse phase HPLC โดยใช้ mobile phase 3 ระบบ คือ Solvent A (ACN, H₂O) Solvent B (ACN, 25 mM acetic acid/25 mM ammonium acetate (1.45:1,

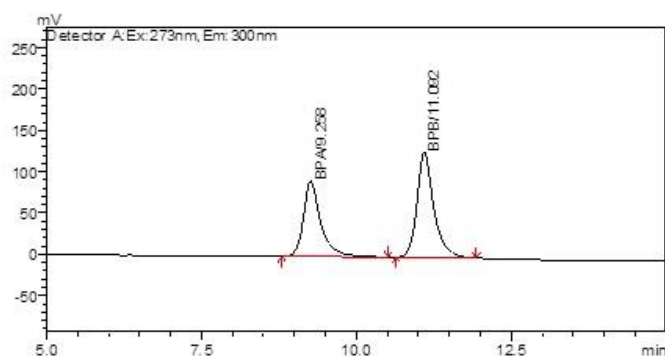
v/v)) และ Solvent C (ACN, 2% acetic acid) คอลัมน์ UPS phenyl column, 2.1 x 100 mm, UV detector wavelength 265 nm และ fluorescence detector ที่ Excited wavelength 273 nm และ Emission wavelength 300 nm พบว่า การใช้ mobile phase ACN และ 2% acetic acid สามารถแยก BPA ออกจาก flavonoids และ BPB ซึ่งมีโครงสร้างใกล้เคียงกับ BPA มากที่สุด แตกต่างเพียงหมู่เมทิล (-CH₃) ที่เพิ่มขึ้น 1 หมู่ ดังนั้น ระบบ solvent ที่ใช้ในการแยก BPA ออกจาก BPB และ flavonoids โดย reverse phase HPLC ได้ ระบบ solvent นั้น ก็จะเหมาะสมที่จะนำไปใช้ในการสกัดแยก BPA ออกจาก flavonoids ในน้ำผลไม้/น้ำผัก ด้วย C18 SPE ต่อไป ผลการวิจัยจากการใช้ทั้ง 3 ระบบ ในการแยก BPA BPB และ flavonoids แสดงรายละเอียด ดังด้านล่าง

ระบบที่ 1: ACN, H₂O (Solvent A)

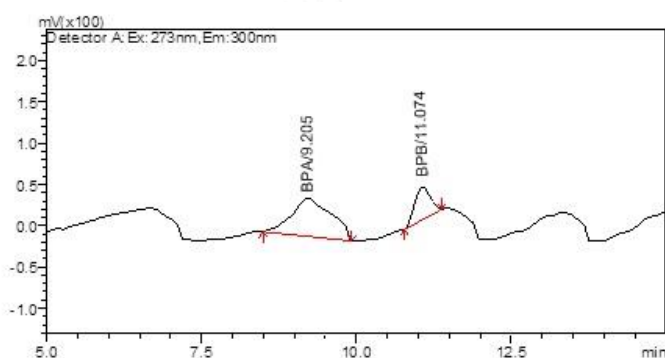
ตารางที่ 6 Chromatographic Conditions ของ solvent A

Time (min)	% Mobile phase A (Water)	% Mobile phase B (ACN)
0.01	60	40
20.01	40	60
21.01	30	70
25.00	30	70
27.00	60	40
37.00	60	40

โครมาโทแกรม ของ standard BPA 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และ BPB 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร เปรียบเทียบกับน้ำส้ม 100% ที่ spike BPA 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และ BPB 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นดังนี้



ภาพที่ 22 โครมาโทแกรมของ Standard BPA และ BPB 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้ Solvent A เป็น mobile phase



ภาพที่ 23 โครมาโทแกรมของน้ำส้ม 100% ที่ spike BPA และ BPB 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้ Solvent A เป็น mobile phase

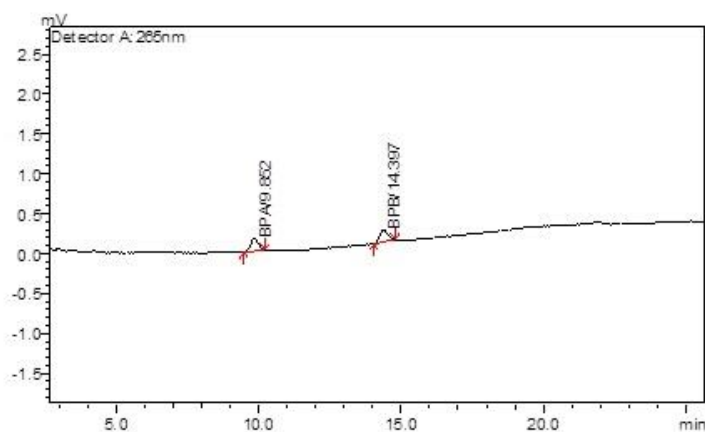
ผลจาก โครมาโทแกรม ในการใช้ solvent A เป็น mobile phase เมื่อเปรียบเทียบระหว่าง โครมาโทแกรม ของ standard BPA 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และ BPB 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร กับน้ำส้ม 100% ที่ spike BPA 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และ BPB 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าในน้ำส้มที่ spike BPA และ BPB ไม่สามารถแยก BPA และ BPB จากสารชนิดอื่นๆ ที่มีอยู่ในน้ำส้มได้ แสดงว่า solvent A ไม่เหมาะที่จะนำมาใช้สกัดแยก BPA และ BPB ออกจากน้ำส้ม ผู้วิจัยจึงได้พัฒนาเปลี่ยน mobile phase เป็น ACN, 25 mM acetic acid/25 mM ammonium acetate ซึ่งปรับปรุงมาจาก Technical note 191 : Determination of Phenols in Drinking and Bottled Mineral Waters Using Online Solid-Phase Extraction

ระบบที่ 2 ACN, 25 mM acetic acid/25 mM ammonium acetate (Solvent B)

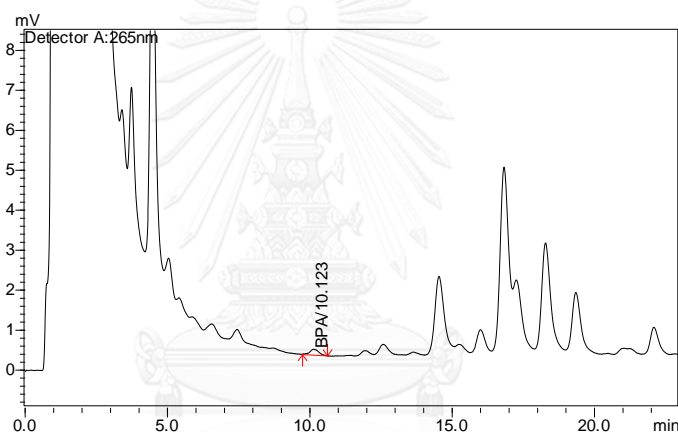
ตารางที่ 7 Chromatographic Conditions ของ solvent B

Time (min)	% Mobile phase A (25 mM acetic acid/25 mM ammonium acetate)	% Mobile phase B (ACN)
0.01	75	25
13.00	62	38
21.00	58	42
26.00	45	55
27.00	5	95
37.00	5	95
38.00	75	25
53.00	75	25

โครมาโทแกรม ของ standard BPA และ BPB 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร เปรียบเทียบกับ น้ำส้ม 100% ที่ spike BPA และ BPB 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นดังนี้



ภาพที่ 24 โครมาโทแกรมของ Standard BPA และ BPB 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร
โดยใช้ Solvent B เป็น mobile phase



ภาพที่ 25 โครมาโทแกรมของ น้ำส้ม 100% ที่ spike BPA และ BPB 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร
โดยใช้ Solvent B เป็น mobile phase

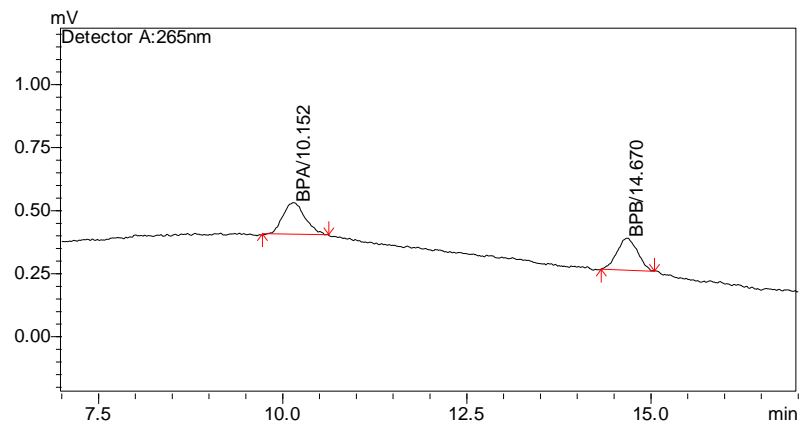
ผลจาก โครมาโทแกรม ในการใช้ solvent B เป็น mobile phase เมื่อเปรียบเทียบระหว่าง โครมาโทแกรมของ standard BPA และ BPB 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร กับน้ำส้ม 100% ที่ spike BPA และ BPB 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่า solvent B ไม่สามารถใช้วิเคราะห์แยก BPA และ BPB จากสารชนิดอื่นๆ ในน้ำส้มได้ ผู้วิจัยจึงได้พัฒนาเป็น mobile phase ระบบที่ 3 ซึ่งปรับปรุงมาจาก Technical note: Determination of flavonoids in fruit juice ซึ่งใช้ acetonitrile และ 2% HAC

ระบบที่ 3: ACN, 2% HAC (Solvent C)

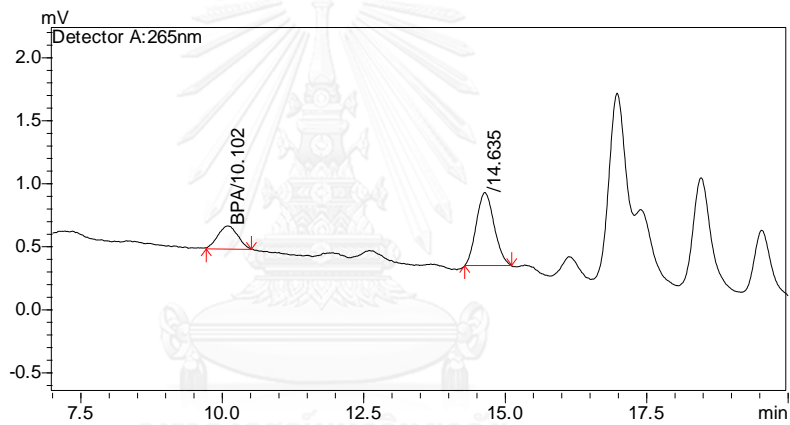
ตารางที่ 8 Chromatographic Conditions ของ solvent C

Time (min)	% Mobile phase A (2% Acetic acid)	% Mobile phase B (ACN)
0.01	75	25
13.00	62	38
21.00	58	42
26.00	45	55
27.00	5	95
37.00	5	95
38.00	75	25
53.00	75	25

โครมาโทแกรม ของ standard BPA และ BPB 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร เปรียบเทียบกับน้ำส้ม 100% ที่ spike BPA และ BPB 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นดังนี้



ภาพที่ 26 โครมาโทแกรมของ Standard BPA และ BPB 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร
โดยใช้ Solvent C เป็น mobile phase



ภาพที่ 27 โครมาโทแกรมของ น้ำส้ม 100% ที่ spike BPA และ BPB 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร
โดยใช้ Solvent C เป็น mobile phase

ผลจาก โครมาโทแกรม ในการใช้ solvent C เป็น mobile phase เมื่อเปรียบเทียบระหว่าง โครมาโทแกรมของ standard BPA และ BPB 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร กับน้ำส้ม 100% ที่ spike BPA และ BPB 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าการใช้ solvent C (ACN, 2% HAC) เป็น mobile phase สามารถแยก BPA ออกจากสารรบกวนในน้ำส้มได้ และ retention time ของ BPA คือ 10.102 นาที แต่ไม่สามารถแยก BPB ออกจากสารรบกวนในน้ำผลไม้ ซึ่งถ้าพิจารณาเฉพาะ retention time ของ BPB จะพบว่าเป็นเวลาเดียวกับ standard BPB แต่ถ้าพิจารณาจากพื้นที่ใต้พีคของ BPB จะพบว่ามีค่ามากกว่าพื้นที่ใต้พีคของ standard BPB จึงอาจอธิบายได้ว่ามีสารรบกวนอื่นๆ ในน้ำส้มที่ถูกชะออกมาในเวลาเดียวกันกับ BPB

สำหรับค่า Capacity factor (K) และค่า Efficiency (N) สำหรับ BPA ที่ spike ในน้ำส้มที่ได้ จาก mobile phase ทั้ง 3 ระบบ ซึ่งคำนวณได้จากสูตร $K = (t_r - t_0)/t$ และ $N = 16(t_r/w)^2$ ดังแสดง ในตารางที่ 9

ตารางที่ 9 ค่า Capacity factor (K) และค่า Efficiency (N) สำหรับ Mobile phase ทั้ง 3 ระบบ

Mobile phase	Capacity factor (K)	Efficiency (N)
Solvent A	can not calculate	can not calculate
Solvent B	can not calculate	can not calculate
Solvent C	8.3	7768

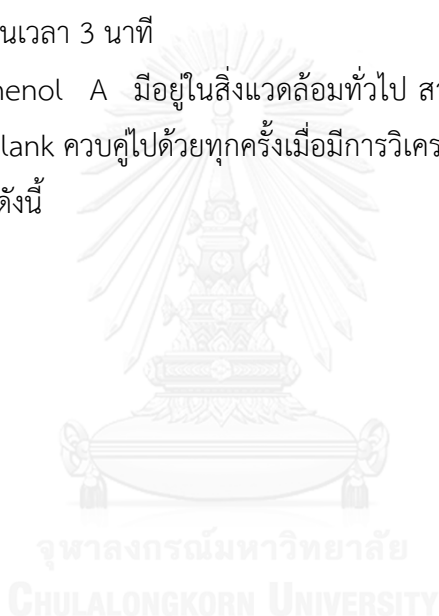
จากตารางที่ 9 solvent C มีค่า capacity factor สำหรับการแยก BPA, $K = 8.3$ ใกล้เคียงกับ acceptable range สำหรับการวิเคราะห์โดย HPLC และมีประสิทธิภาพสำหรับการแยก BPA, $N = 7768$ เป็นค่าสูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับ solvent A และ solvent B

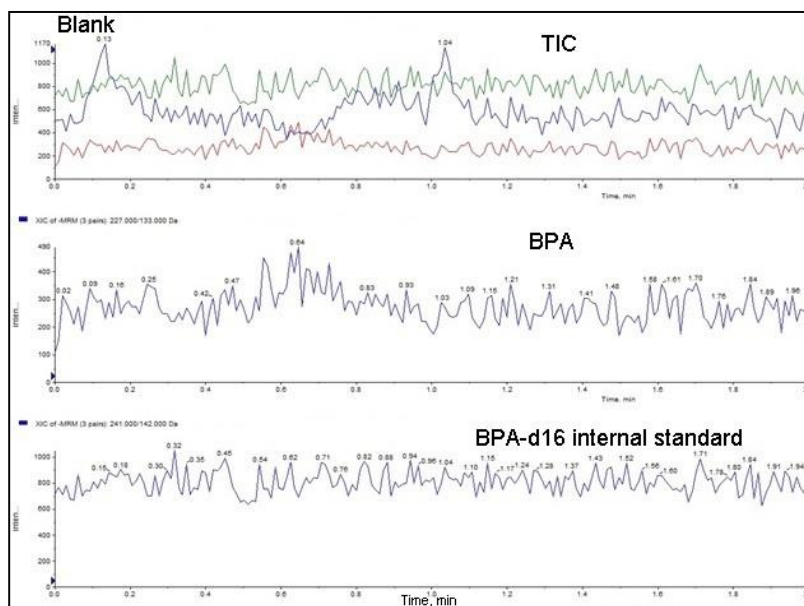
จากผลการทดลองข้างต้น แสดงให้เห็นว่า solvent C เหมาะสมสำหรับจะนำมาปรับใช้ในการสกัด BPA ด้วย SPE เพื่อกำจัด flavonoids ที่มีอยู่ในน้ำผลไม้/น้ำผัก ซึ่งรบกวนการวิเคราะห์ BPA ออกไป ก่อนวิเคราะห์ด้วยเทคนิค LC-MS/MS และจากข้อมูล chromatographic conditions ที่ได้ จึงนำไปสู่การการนำ solvent C ไปใช้สกัด BPA จากน้ำผลไม้/น้ำผักด้วย SPE โดยในการชะสารรบกวนในขั้นตอน SPE ใช้อัตราส่วน 2% Acetic acid : 100% ACN (42 : 58) และการชะ BPA ใช้อัตราส่วน 2% Acetic acid : 100% ACN (52 : 48)

4.1.2 การหาปริมาณ BPA ในน้ำผลไม้/น้ำผัก ด้วยเทคนิค Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS)

การวิเคราะห์หาปริมาณ BPA ในน้ำผลไม้ใช้เทคนิค LC-MS/MS ด้วย QTRAP 5500 system ของบริษัท AB SCIEX โดยมีส่วนเชื่อมต่อที่ทำให้เกิดการแตกตัวเป็นไอออน (Ionization interface) ชนิด electrospray ionization (ESI) ใช้คอลัมน์ชนิด C18 ขนาด 50 x 2.1 มิลลิเมตร (Phenomenex) จากนั้นทำการหาสภาวะที่เหมาะสมเพื่อแยกพีคของ BPA และ internal standard Bisphenol A-d16 (BPA-d16) แล้วทดสอบโดยใช้ standard BPA ความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 2.5, 5, 10, 15, 25, 50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ spike ด้วย BPA-d16 ความเข้มข้น 5 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร มาวิเคราะห์ ซึ่งพบว่าสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการหาปริมาณ BPA และ BPA-d16 คือ isocratic elution ที่ 80% ACN เป็นเวลา 3 นาที

เนื่องจาก Bisphenol A มีอยู่ในสิ่งแวดล้อมทั่วไป สามารถปนเปื้อนมาจากขั้นตอนการเตรียมสารได้ จึงต้องทำ blank ควบคู่ไปด้วยทุกครั้งเมื่อมีการวิเคราะห์หาปริมาณ BPA โดยวิเคราะห์จาก blank (30% ACN) ดังนี้



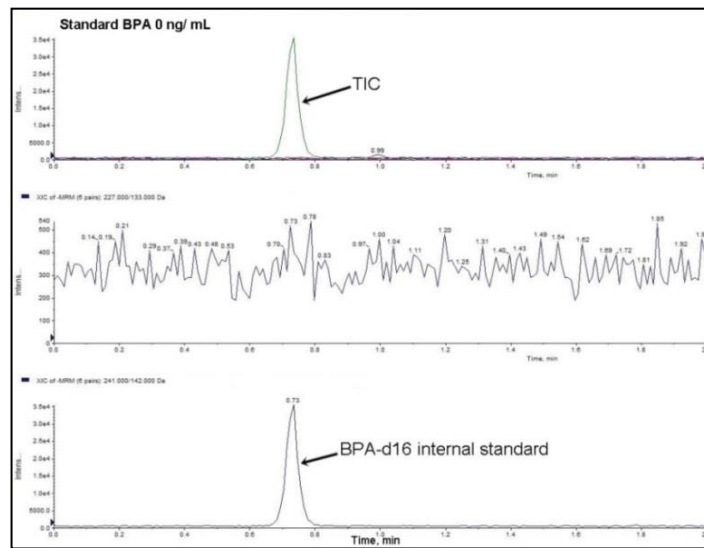


ภาพที่ 28 โครมาโทแกรมของ Blank (30% ACN)

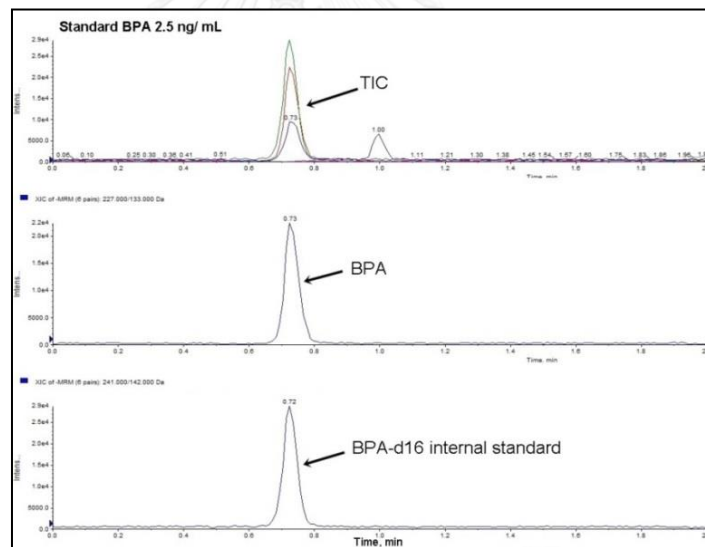
จากโครมาโทแกรมที่วิเคราะห์ blank พบว่าไม่มีพีคของ BPA และ BPA-d16 แสดงว่าไม่มีหรือมี BPA ปนเปื้อนอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้

4.1.3 ผลการวิเคราะห์สารมาตรฐาน BPA ด้วยเทคนิค Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS)

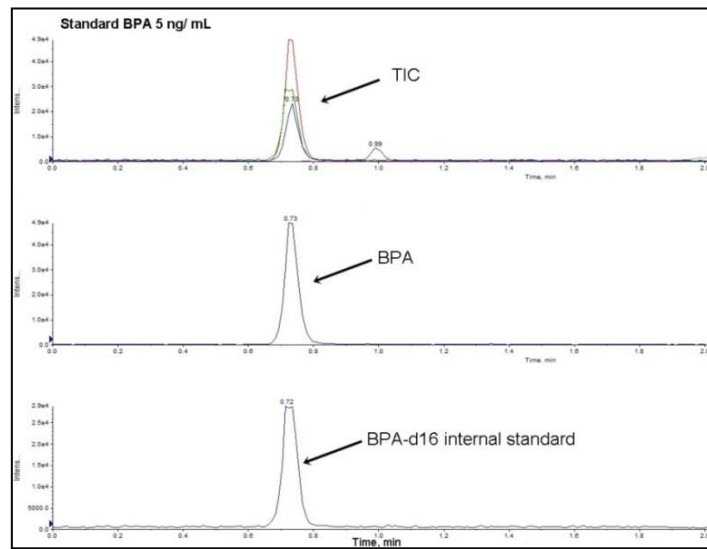
ในการวิเคราะห์สารมาตรฐาน BPA ที่ได้เตรียมให้มีความเข้มข้นต่างๆ คือ 2.5, 5, 10, 15, 25, 50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมี BPA-d16 ความเข้มข้น 5 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร เป็น internal standard โดยผลการทดลองจากเครื่อง LC-MS/MS แสดงเป็นโครมาโทแกรม ดังนี้



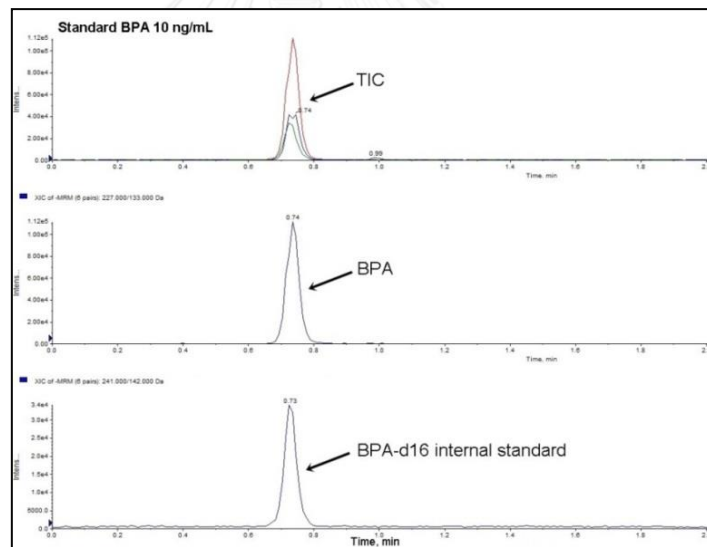
ภาพที่ 29 โครมาโทแกรมของสารมาตรฐาน BPA ความเข้มข้น 0 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร



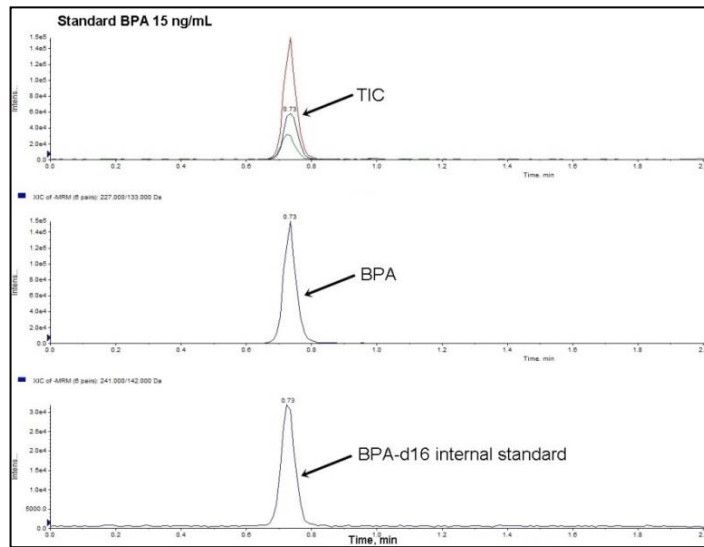
ภาพที่ 30 โครมาโทแกรมของสารมาตรฐาน BPA ความเข้มข้น 2.5 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร



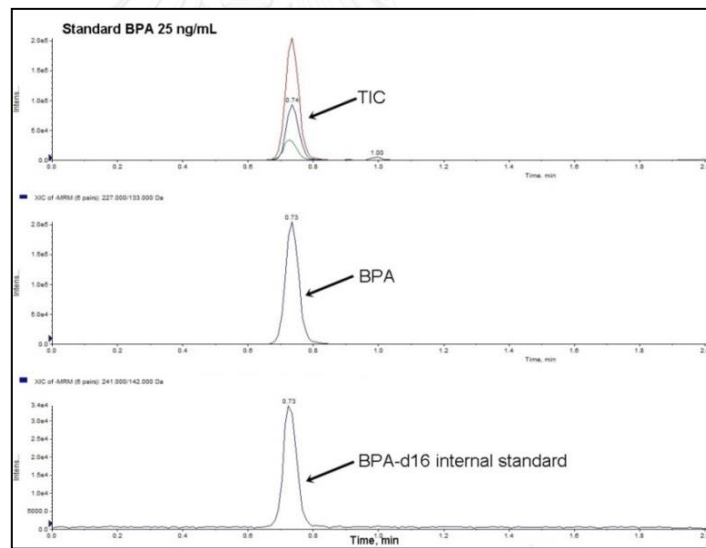
ภาพที่ 31 โครมาโทแกรมของสารมาตรฐาน BPA ความเข้มข้น 5 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร



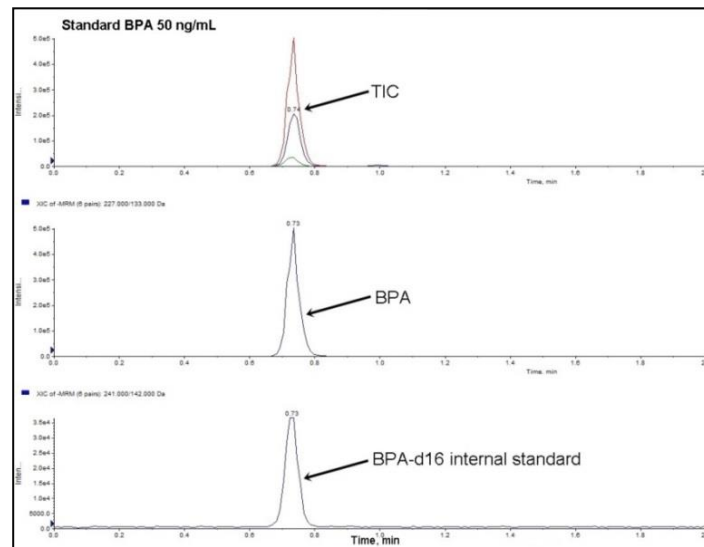
ภาพที่ 32 โครมาโทแกรมของสารมาตรฐาน BPA ความเข้มข้น 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร



ภาพที่ 33 โครมาโทแกรมของสารมาตรฐาน BPA ความเข้มข้น 15 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร



ภาพที่ 34 โครมาโทแกรมของสารมาตรฐาน BPA ความเข้มข้น 25 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร



ภาพที่ 35 โครมาโทแกรมของสารมาตรฐาน BPA ความเข้มข้น 50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร

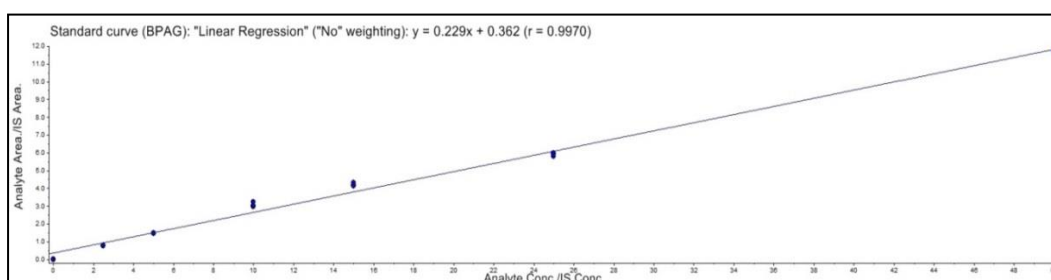
จาก โครมาโทแกรมที่ได้จากการวิเคราะห์สารมาตรฐาน BPA ที่ความเข้มข้น 0, 2.5, 5, 10, 15, 25 และ 50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ทั้งสามครั้ง โดยข้อมูลของ retention time, peak area และ peak area ratio ที่ได้จากการวิเคราะห์แสดงดังตารางที่ 10

ตารางที่ 10 retention time, peak area และ peak area ratio ที่ได้จากการวิเคราะห์สารมาตรฐาน

BPA Concentration	Retention Time	Peak Area	Peak Area Ratio
0 ng/mL			
BPA ₁	-	586	0.0069
BPA-d16 ₁	0.73	84300	
BPA ₂	-	542	0.0054
BPA-d16 ₂	0.73	98900	
BPA ₃	-	293	0.0029
BPA-d16 ₃	0.73	98000	
2.5 ng/mL			
BPA ₁	0.73	69000	0.77
BPA-d16 ₁	0.72	88700	
BPA ₂	0.73	63700	0.75
BPA-d16 ₂	0.73	84800	
BPA ₃	0.73	78800	0.78
BPA-d16 ₃	0.72	99900	
5 ng/mL			
BPA ₁	0.73	146000	1.48
BPA-d16 ₁	0.72	98500	
BPA ₂	0.74	138000	1.45
BPA-d16 ₂	0.73	94900	
BPA ₃	0.73	147000	1.50
BPA-d16 ₃	0.72	97600	

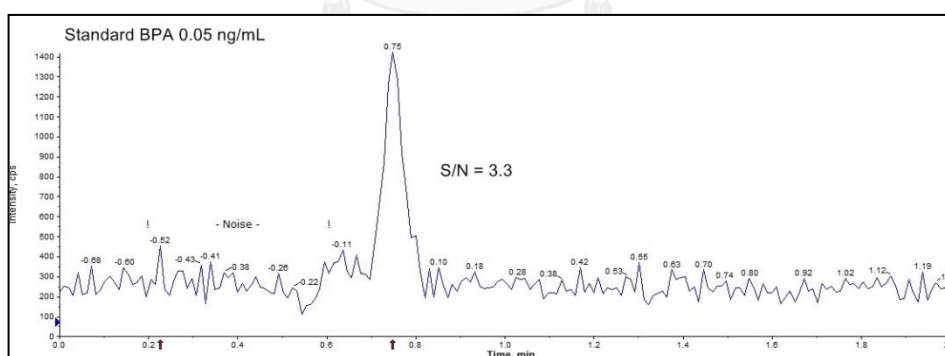
BPA Concentration	Retention Time	Peak Area	Peak Area Ratio
10 ng/mL			
BPA ₁	0.74	307000	3.24
BPA-d16 ₁	0.73	94600	
BPA ₂	0.73	308000	2.96
BPA-d16 ₂	0.73	104000	
BPA ₃	0.73	317000	3.04
BPA-d16 ₃	0.72	104000	
15 ng/mL			
BPA ₁	0.73	410000	4.20
BPA-d16 ₁	0.73	97400	
BPA ₂	0.73	413000	4.31
BPA-d16 ₂	0.72	95800	
BPA ₃	0.74	399000	4.12
BPA-d16 ₃	0.73	96700	
25 ng/mL			
BPA ₁	0.73	592000	5.8039
BPA-d16 ₁	0.73	102000	
BPA ₂	0.73	595000	5.98
BPA-d16 ₂	0.73	99400	
BPA ₃	0.73	609000	5.91
BPA-d16 ₃	0.73	103000	
50 ng/mL			
BPA ₁	0.73	1240000	11.69
BPA-d16 ₁	0.73	106000	
BPA ₂	0.73	1200000	11.65
BPA-d16 ₂	0.73	103000	
BPA ₃	0.73	1210000	11.74
BPA-d16 ₃	0.73	103000	

จากข้อมูลที่ได้ นำค่า Peak Area Ratio (Area BPA/Area BPA-d16) และสารมาตรฐาน BPA ความเข้มข้นของ 0, 2.5, 5, 10, 15, 25 และ 50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร มาสร้างกราฟมาตรฐาน สำหรับใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณ BPA ในสิ่งตัวอย่างได้ดังนี้

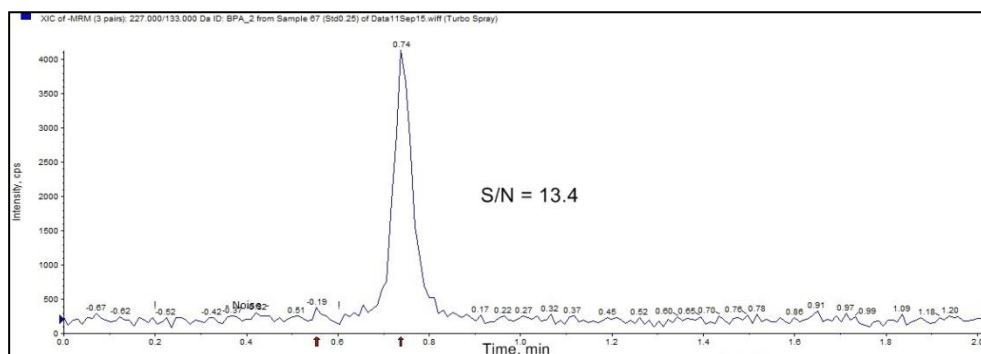


ภาพที่ 36 กราฟมาตรฐานสำหรับคำนวณปริมาณ BPA ในน้ำผลไม้/น้ำผัก

จากกราฟและโครมาโทแกรม พบว่า LLOD (Lower limit of detection) หรือปริมาณ BPA ที่ต่ำที่สุดที่จะวิเคราะห์ได้เท่ากับ 0.05 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งพิจารณาจาก S/N (signal to noise ratio) มากกว่าหรือเท่ากับสาม และ LLOQ (Lower limit of quantification) ซึ่งพิจารณาจาก S/N (signal to noise ratio) มากกว่าหรือเท่ากับสิบ เท่ากับ 13.4 จากโครมาโทแกรมที่ได้จากการวิเคราะห์สารมาตรฐาน BPA



ภาพที่ 37 signal to noise ratio ของสารมาตรฐาน BPA ความเข้มข้น 0.05 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร



ภาพที่ 38 signal to noise ratio ของสารมาตรฐาน BPA ความเข้มข้น 0.25 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร

จากข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์สารมาตรฐาน BPA ทั้งสามครั้ง เป็นเวลา 6 วัน แล้วหาค่า intraday และ interday ของค่าต่ำ (5 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร) ค่ากลาง (15 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร) และค่าสูง (50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร) เพื่อดูความเที่ยงตรงของการวิเคราะห์ดังแสดงในตารางที่ 11 ตารางที่ 11 ค่า nominal value, average measured value และ %CV ที่ได้จากการวิเคราะห์สารมาตรฐานที่ความเข้มข้น 5, 15, และ 50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร

		Intraday (n = 3)			Interday (n = 6)		
BPA	Nominal value (ng/mL)	Average measured value	Accuracy	% CV	Average measured value	Accuracy	% CV
Low	5	4.95	98.86	1.75	4.97	99.30	3.62
Medium	15	16.90	112.70	2.19	16.24	108.44	5.75
High	50	49.43	98.76	0.41	49.53	99.06	4.58

จากผลของ %CV พบว่าค่าที่ได้อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ เนื่องจาก %CV มีค่าไม่เกิน 15%

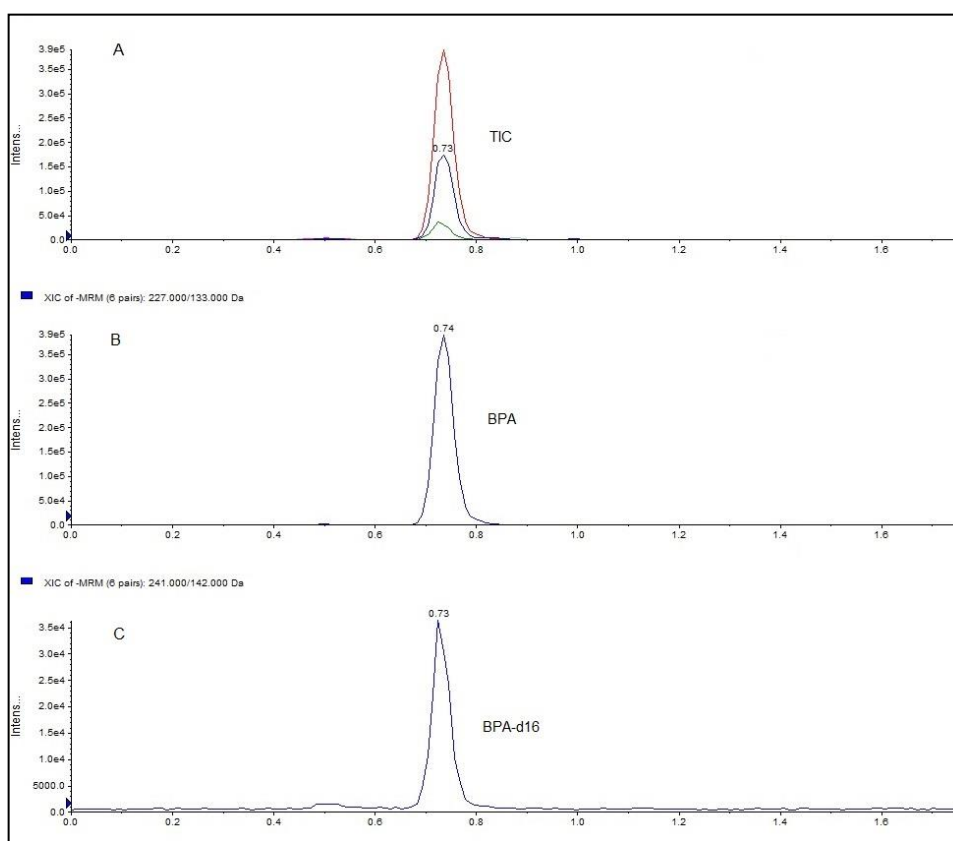
(20)

4.1.4 ผลการวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำผลไม้/น้ำผักด้วยเทคนิค เทคนิค Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS)

ตารางที่ 12 ชนิดของบรรจุภัณฑ์ pH แหล่งผลิต และปริมาณบรรจุของตัวอย่างน้ำผลไม้/น้ำผัก

ลำดับ	น้ำผลไม้/น้ำผัก	pH	ประเทศที่ผลิต	ปริมาตร (mL)
1.	Sample 1	3.24	ประเทศไทย	240
2.	Sample 2	3.24	ประเทศไทย	240
3.	Sample 3	3.49	ประเทศไทย	240
4.	Sample 4	4.47	สหรัฐอเมริกา	163
5.	Sample 5	4.32	ประเทศไทย	155
6.	Sample 6	3.91	ประเทศไทย	155
7.	Sample 7	4.06	ประเทศไทย	155
8.	Sample 8	4.15	ญี่ปุ่น	185
9.	Sample 9	4.23	ญี่ปุ่น	185
10.	Sample 10	4.48	สหรัฐอเมริกา	163
11.	Sample 11	3.69	ประเทศไทย	180
12.	Sample 12	3.05	ประเทศไทย	250
13.	Sample 13	3.05	ประเทศไทย	250
14.	Sample 14	3.45	ประเทศไทย	230
15.	Sample 15	4.55	ประเทศไทย	565
16.	Sample 16	3.43	ประเทศไทย	200
17.	Sample 17	3.95	ประเทศไทย	200
18.	Sample 18	4.19	ประเทศไทย	200
19.	Sample 19	4.11	ประเทศไทย	250
20.	Sample 20	4.17	ประเทศไทย	180
21.	Sample 21	3.51	ประเทศไทย	200

หลังจากวิเคราะห์สารมาตรฐาน BPA แล้ว จึงทำการวิเคราะห์ BPA จากสิ่งตัวอย่างน้ำผลไม้/น้ำผัก ที่เตรียมจากการสกัดโดย solid phase extraction (SPE) ด้วย 2% Acetic acid : 100% ACN ในอัตราส่วน 52 : 48 ด้วยเครื่อง Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS) โดยการวิเคราะห์ซ้ำสามครั้งในแต่ละตัวอย่าง ผลการทดลอง แสดงเป็นตัวอย่างโครมาโทแกรม ดังนี้



ภาพที่ 39 โครมาโทแกรมของตัวอย่างน้ำผลไม้ที่ spike ด้วย BPA-d16 ความเข้มข้น 5 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร

(A) Total ion chromatogram, (B) โครมาโทแกรมของ BPA ที่ตรวจพบในตัวอย่างน้ำผลไม้ และ (C) โครมาโทแกรมของ BPA-d16 ความเข้มข้น 5 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร

จากโครมาโทแกรมที่ได้จากการวิเคราะห์สิ่งตัวอย่างน้ำผลไม้ โดยข้อมูลของ Retention time Peak area และ Peak Area Ratio จากการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐาน แสดงดังตารางที่ 13

ตารางที่ 13 ข้อมูลของ retention time และ peak area และ area ratio ที่ได้จากการวิเคราะห์ของตัวอย่างตัวอย่างน้ำผลไม้/น้ำผัก

	Retention Time	Area	Area Ratio
Sample 1			
BPA	0.74	24800	0.27
BPA-d16	0.73	89700	
Sample 2			
BPA	0.74	45211	0.29
BPA-d16	0.73	151667	
Sample 3			
BPA	0.75	58900	0.39
BPA-d16	0.74	150000	
Sample 4			
BPA	0.76	14200	0.20
BPA-d16	0.75	68900	
Sample 5			
BPA	0.76	181000	2.48
BPA-d16	0.75	72900	
Sample 6			
BPA	0.75	562000	7.99
BPA-d16	0.75	70300	
Sample 7			
BPA	0.75	693000	4.45
BPA-d16	0.74	156000	
Sample 8			
BPA	-	11300	0.16
BPA-d16	0.75	67300	

	Retention Time	Area	Area Ratio
Sample 9			
BPA	0.77	10500	0.06
BPA-d16	0.77	158000	
Sample 10			
BPA	0.76	14100	0.19
BPA-d16	0.75	71000	
Sample 11			
BPA	0.75	389000	5.25
BPA-d16	0.74	74000	
Sample 12			
BPA	0.74	2118889	12.43
BPA-d16	0.73	170444	
Sample 13			
BPA	0.74	2905000	17.95
BPA-d16	0.73	162500	
Sample 14			
BPA	0.77	23000	0.30
BPA-d16	0.75	74900	
Sample 15			
BPA	0.76	52200	1.00
BPA-d16	0.75	52200	
Sample 16			
BPA	0.73	6390	0.04
BPA-d16	0.73	136000	
Sample 17			
BPA	0.74	3140	0.02
BPA-d16	0.73	142000	
Sample 18			
BPA	-	7950	0.05
BPA-d16	0.81	147000	

	Retention Time	Area	Area Ratio
Sample 19			
BPA	-	2140	0.03
BPA-d16	0.75	60900	
Sample 20			
BPA	0.88	8890	0.05
BPA-d16	0.87	163000	
Sample 21			
BPA	0.74	21200	0.14
BPA-d16	0.73	146000	

เมื่อทำการวิเคราะห์ปริมาณ BPA ในน้ำผลไม้/น้ำผัก ที่จำหน่ายจากร้านค้า ในเขต กรุงเทพมหานคร จำนวน 21 ตัวอย่าง พบปริมาณ BPA ในน้ำผลไม้/น้ำผัก ดังแสดงในตารางที่ 14 ตารางที่ 14 วันผลิต วันหมดอายุ วันวิเคราะห์ และปริมาณ BPA ที่ตรวจพบในน้ำผลไม้/น้ำผัก

น้ำผลไม้/น้ำผัก	วันผลิต	วันหมดอายุ	BPA ± SD (ng/mL)
Sample 1	23April2015	23April2017	n/d
Sample 2	18June2015	18June2017	n/d
Sample 3	12Nov2015	12Nov 2016	n/d
Sample 4	-	29Sep2016	n/d
Sample 5	10Feb2015	10Feb2017	13.80 ± 1.17
Sample 6	12May2015	12May2017	48.6 ± 2.94
Sample 7	15June2015	15July2017	17.43 ± 0.60
Sample 8	-	27Dec2016	n/d
Sample 9	-	12Sep2016	n/d
Sample 10	-	14Sep2016	n/d
Sample 11	17June2015	17June2017	32.80 ± 2.80
Sample 12	20July2015	20July2017	49.01± 1.26
Sample 13	1Oct2015	1Oct2017	68.28 ± 2.67

น้ำผลไม้/น้ำผัก	วันผลิต	วันหมดอายุ	BPA \pm SD (ng/mL)
Sample 14	29June2015	28June2017	n/d
Sample 15	24Feb2015	24Feb2017	3.10 \pm 0.38
Sample 16	-	11Oct2016	n/d
Sample 17	-	21April2016	n/d
Sample 18	-	14Oct2016	n/d
Sample 19	-	31May2016	n/d
Sample 20	1Oct2015	1Oct2016	n/d
Sample 21	-	8Feb2016	n/d

n/d, ตรวจไม่พบ BPA ในตัวอย่างน้ำผลไม้/น้ำผัก

จากตารางที่ 14 ได้วิเคราะห์ปริมาณ BPA ของน้ำผลไม้/น้ำผักที่จำหน่ายในประเทศไทย โดยพบปริมาณ BPA ทั้งหมด 7 ตัวอย่างจาก 21 ตัวอย่างของผลิตภัณฑ์น้ำผลไม้/น้ำผัก ปริมาณ BPA ปนเปื้อนสูงที่สุดพบใน Sample 13 ปริมาณ 68.28 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และปริมาณ BPA ปนเปื้อนต่ำสุดพบใน Sample 15 ปริมาณ 3.1 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร แต่ไม่พบ BPA ปนเปื้อนในน้ำผลไม้/น้ำผัก หรือปนเปื้อนในระดับที่ต่ำกว่าขีดจำกัดของการวัดปริมาณ %LLOQ จำนวนทั้งสิ้น 14 ตัวอย่าง

เมื่อทำการวิเคราะห์ปริมาณ BPA ในน้ำผลไม้/น้ำผัก หลังจากตัวอย่างน้ำผลไม้ผ่านกระบวนการสกัดด้วย SPE แล้วทำการวิเคราะห์ %recovery เพื่อดูเปอร์เซ็นต์การได้กลับคืนมาของ internal standard (BPA-d16) และ %CV ซึ่งบ่งบอกถึงประสิทธิภาพของการสกัดสาร และหา %CV เพื่อดูความเที่ยงตรงของการวิเคราะห์ ดังแสดงในตารางที่ 15

ตารางที่ 15 % recovery ภายหลังจากการสกัดด้วยวิธี SPE และ %CV

Sample	Average recoveries \pm SD, ^a %	%CV
Sample 1	91.70 \pm 4.53	6.50
Sample 2	91.94 \pm 5.98	10.33
Sample 3	91.15 \pm 4.36	4.78
Sample 4	99.99 \pm 10.76	10.76
Sample 5	105.52 \pm 8.95	8.48

Sample	Average recoveries \pm SD, ^a %	%CV
Sample 6	101.88 \pm 9.43	9.25
Sample 7	94.0 \pm 3.28	3.47
Sample 8	92.36 \pm 7.54	8.17
Sample 9	95.92 \pm 1.52	1.58
Sample 10	102.89 \pm 10.32	10.03
Sample 11	106.34 \pm 4.91	4.62
Sample 12	105.26 \pm 10.47	9.94
Sample 13	97.03 \pm 3.76	3.87
Sample 14	106.56 \pm 3.77	3.54
Sample 15	104.75 \pm 7.57	7.22
Sample 16	86.38 \pm 1.54	1.78
Sample 17	89.33 \pm 5.15	5.77
Sample 18	82.73 \pm 4.74	5.73
Sample 19	108.79 \pm 4.46	4.10
Sample 20	99.15 \pm 9.46	9.54
Sample 21	88.82 \pm 1.54	1.73

^aSD คำนวณจากการวิเคราะห์ซ้ำ 6 ครั้ง

จากตารางที่ 15 %recovery ที่ได้จากการสกัด SPE ของน้ำผลไม้/น้ำผัก 13 ยี่ห้อ จำนวน 21 ตัวอย่าง มีค่าสูงอยู่ในช่วง 82-108 % และ %CV อยู่ในช่วง 1.58-10.76%

เมื่อทดสอบใช้ solvent 2 ชนิด เพื่อใช้ในการชะ BPA ออกจากคอลัมน์ ได้แก่ solvent A (100% ACN) และ solvent C ได้ %recovery ที่ต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 16

ตารางที่ 16 เปรียบเทียบระหว่าง สารละลายที่ใช้ชะ BPA (solvent A (100% ACN) และ solvent C (ACN, 2% HAC)) สำหรับการสกัด BPA จากน้ำผลไม้/น้ำผัก

Sample	วันผลิต	วัน หมดอายุ	วันวิเคราะห์	สารละลาย	BPA ± SD (ng/mL)	Average recoveries ± SD, ^a %
Sample 1	23April 2015	23April 2017	29Feb2016	Solvent C	0.07 ± 0.03	94.90 ± 3.35
Sample 2	18June 2015	18June 2017	29Feb2016	Solvent C	n/d	91.94 ± 5.98
Sample 1	23April 2015	23April 2017	29Feb2016	Solvent A	n/d	45.36 ± 1.24
Sample 2	18June 2015	18June 2017	29Feb2016	Solvent A	n/d	51.97 ± 1.86
Sample 12	20July 2015	20July 2017	29Feb2016	Solvent C	49.01 ± 1.26	96.48 ± 6.94
Sample 13	1Oct 2015	1Oct 2017	29Feb2016	Solvent C	68.28 ± 2.67	97.03 ± 3.76
Sample 12	20July 2015	20July 2017	29Feb2016	Solvent A	33.06 ± 0.46	36.45 ± 0.75
Sample 13	1Oct 2015	1Oct 2017	29Feb2016	Solvent A	44.46 ± 0.58	47.31 ± 0.96

เมื่อเปรียบเทียบระหว่างระบบที่ใช้ solvent A และ solvent C เป็นตัวชะในขั้นตอนสกัด BPA ด้วย SPE พบว่าเมื่อใช้ solvent C จะได้ %recovery สูงกว่าการใช้ solvent A โดยเมื่อใช้ solvent C ในส่วนของ sample 1 และ sample 2 มี %recovery ที่สูงอยู่ในช่วง 91-94% และสำหรับ sample 12 และ sample 13 มี %recovery 96-97% แต่เมื่อใช้ solvent A กับทั้ง sample 1, sample 2 และ sample 12, sample 13 พบว่าได้ %recovery น้อย โดยมี % recovery 36-51%

ผลการวิจัย แสดงให้เห็นว่าขั้นตอนของ SPE ที่พัฒนาขึ้น มีความจำเพาะและมีประสิทธิภาพ ในการแยก flavonoids จากตัวอย่างน้ำผลไม้/น้ำผัก ทั้งความเหมาะสมของชนิด ความเข้มข้น และ ปริมาตรของสารที่ใช้ชะไปบน SPE cartridges เนื่องจาก flavonoids ได้ถูกกำจัดออกไปด้วย 2% acetic acid:ACN (48:52) ซึ่งวิธีนี้ให้ %recovery สูง (พิจารณาจาก BPA-d16 หรือ IS ที่ใส่ไปใน ตัวอย่าง) เมื่อวิเคราะห์ด้วย LC-MS/MS นอกจากนี้ ยังได้ทำการทดสอบ ระหว่างวิธีที่ใช้ solvent A และ solvent C เป็นตัวชะในขั้นตอนสกัดสาร BPA ในขั้นตอน SPE พบว่าเมื่อใช้ solvent C จะได้ %recovery ที่สูงในช่วง 91-97% สูงกว่าการใช้ solvent A ที่มีค่า recovery เพียง 36-51%

เทคนิคที่ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณ BPA คือ LC-MS/MS โดยใช้ MRM mode โดยใช้ C18 column และใช้การชะแบบ isocratic elution (ACN:1 mM ammonium acetate, 80:20) โดยมี retention time ของทั้ง BPA และ BPA-d16 ที่ 0.73 นาที โดย precursor-product transitions สำหรับ BPA คือ 227 > 133 m/z และสำหรับ BPA-d16 คือ 241 > 142 m/z การที่สามารถวิเคราะห์หาปริมาณ BPA ในตัวอย่างน้ำผลไม้/น้ำผักได้ในเวลาที่น้อยกว่า 1 นาทีนั้น เนื่องจากสารประกอบอื่นๆ ที่รบกวนได้กำจัดออกไปด้วยกระบวนการ SPE แล้ว ทำให้วิธีที่พัฒนาขึ้น นี้สามารถวิเคราะห์ตัวอย่างได้เป็นจำนวนมาก โดยใช้เวลาน้อย ซึ่งต่างจากงานวิจัยอื่นๆ ที่ต้องใช้ gradient elution ซึ่งต้องใช้เวลายาวอย่างน้อยประมาณ 10 นาทีต่อตัวอย่าง ดังเช่น ในปี 2011 Noonan และคณะ ได้ทำการหาปริมาณ BPA ในอาหารกระป๋องจากท้องตลาดประเทศสหรัฐอเมริกา ซึ่งไม่ผ่านการสกัดตัวอย่างด้วย SPE จากนั้นจึงทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค LC-MS/MS โดยใช้ mobile phase คือ water/acetonitrile และใช้ chromatographic condition แบบ binary gradient elution (23) ทำให้ใช้เวลามากขึ้นต่อการวิเคราะห์ต่อหนึ่งตัวอย่าง

วิธีที่พัฒนาขึ้นนี้ นอกจากจะเหมาะสำหรับวิเคราะห์ BPA ในน้ำผลไม้/น้ำผักด้วย LC-MS/MS แล้ว จะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งสำหรับการวิเคราะห์ BPA ด้วย RP-HPLC/fluorescence system เนื่องจาก RP-HPLC/fluorescence ไม่สามารถแยกสารประกอบที่มีโครงสร้างใกล้เคียงกัน

สำหรับวิธีที่ได้พัฒนาขึ้นได้ใช้ในการหาปริมาณ BPA ในน้ำผลไม้/น้ำผักที่เป็นผลิตภัณฑ์ที่ วางขายจากร้านค้าในเขตกรุงเทพมหานคร ประเทศไทย พบว่าตรวจพบปริมาณ BPA จากผลิตภัณฑ์ น้ำผักผลไม้จำนวน 7 ตัวอย่างจาก 21 ตัวอย่าง แต่ไม่พบ BPA ใน 14 ตัวอย่าง

สำหรับการเปรียบเทียบปริมาณ BPA ในน้ำผลไม้/น้ำผักจากประเทศต่างๆที่เป็นประเทศ ผลิต พบว่า ปริมาณ BPA พบสูงที่สุดในประเทศไทย นอกจากนี้ประเทศต่างๆก็ได้มีการศึกษา BPA ในผลิตภัณฑ์บรรจุอาหาร เช่น ในประเทศแคนาดาและประเทศกรีกมีการตรวจวิเคราะห์ BPA ใน soft drink พบ BPA ในช่วง 0.032 ถึง 4.5 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร (93) และ 0.4 ถึง 10.2 นาโนกรัม ต่อมิลลิลิตร (112) ตามลำดับ ประเทศเบลเยียม หาปริมาณ BPA ในกระป๋องผักพบในช่วง 0.02 ถึง 8.1 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร (113)

อย่างไรก็ตามระดับของ BPA ที่ตรวจพบในน้ำผลไม้/น้ำผักยังต่ำกว่าค่าที่ EC directive in an amending document relating to plastic materials and articles intended to come into contact with foodstuffs กำหนดไว้ที่ 0.6 mg BPA/kg ในอาหาร ถ้าหากผู้ร่วมโครงการวิจัยที่มีน้ำหนักน้อยที่สุด (47 กิโลกรัม) มาพิจารณา เมื่อดื่มน้ำผลไม้ 1 กระป๋อง ที่มี BPA ปริมาณสูงสุด (68.28 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร, 250 มิลลิลิตร) ยังคงปลอดภัยเนื่องจากค่าที่ได้เท่ากับ 0.36 $\mu\text{g}/\text{kg}$ BW/day ซึ่งน้อยกว่าค่า TDI ที่กำหนดโดย EFSA (4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ of BW/day) และ Health Canada (25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ of BW/day)



4.2 การพัฒนากระบวนการสกัด BPA-G ในปัสสาวะ ด้วย salting-out assisted liquid/liquid extraction (SALLE) เพื่อใช้ในการตรวจด้วยเทคนิค LC-MS/MS

ผู้วิจัยได้คัดเลือกผู้ร่วมโครงการวิจัย จำนวน 20 คน เพื่อนำปัสสาวะมาหาปริมาณ BPA-G ด้วยวิธี salting-out assisted liquid/liquid extraction ที่พัฒนาขึ้น โดยมีรายละเอียดต่างๆ ของผู้ร่วมโครงการวิจัย ดังแสดงในตารางที่ 17 ผู้ร่วมวิจัยทุกคนมีสภาวะการทำงานของไตปกติ โดยตรวจค่า ALT อยู่ในช่วงปกติ 0-40 ยูนิตต่อลิตร และการทำงานของไตปกติ โดยตรวจด้วย urine test strip เพื่อดูระดับสารที่ขับออกมาทางปัสสาวะ เช่น กลูโคส โปรตีน เป็นต้น เพื่อจะได้ไม่มีผลกระทบต่อกระบวนการเมทาบอลิซึมและขับสาร BPA ออกจากร่างกาย

ตารางที่ 17 รายละเอียดต่างๆของผู้ร่วมโครงการวิจัย

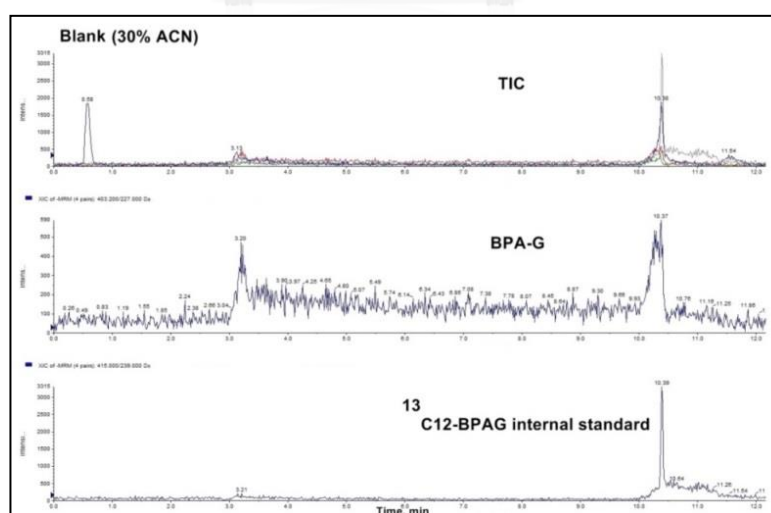
ลำดับ	ชื่อ	เพศ	อายุ	น้ำหนัก (kg)	ค่า ALT (U/L)	ผล urine test strip
1.	A	หญิง	26	48	23	ปกติ
2.	B	หญิง	25	46	8.1	ปกติ
3.	C	หญิง	26	43	11	ปกติ
4.	D	หญิง	27	43	11	ปกติ
5.	E	หญิง	25	47	8	ปกติ
6.	F	หญิง	27	54	9	ปกติ
7.	G	หญิง	25	47	6	ปกติ
8.	H	หญิง	25	55	6	ปกติ
9.	I	หญิง	26	53	7	ปกติ
10.	J	หญิง	25	51	11	ปกติ
11.	K	ชาย	25	64	11	ปกติ
12.	L	ชาย	24	58	20	ปกติ
13.	M	ชาย	24	67	15.9	ปกติ
14.	N	ชาย	24	60	21	ปกติ

ลำดับ	ชื่อ	เพศ	อายุ	น้ำหนัก (kg)	ค่า ALT (U/L)	ผล urine test strip
15.	O	ชาย	28	73	25	ปกติ
16.	P	ชาย	24	75	31	ปกติ
17.	Q	ชาย	24	72	8	ปกติ
18.	R	ชาย	23	81	15	ปกติ
19.	S	ชาย	20	68	16	ปกติ
20.	T	ชาย	26	51	10.2	ปกติ

4.2.1 การหาปริมาณ BPA-G ในปัสสาวะด้วยเทคนิค Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS)

การวิเคราะห์ปริมาณ BPA-G ด้วยเทคนิค Liquid Chromatography Tandem Mass spectrometry (LC-MS/MS) ของบริษัท AB SCIEX รุ่น QTRAP 5500 ใช้คอลัมน์ชนิด C18 ขนาด 50 x 2.1 มิลลิเมตร (Phenomenex) โดยปรับอุณหภูมิเป็น 30 องศาเซลเซียส และ flow rate เป็น 200 ไมโครลิตรต่อนาที จากนั้นใช้การชะสารแบบ gradient elution

เมื่อวิเคราะห์ปริมาณ BPA-G จะวิเคราะห์จาก blank (30% ACN) ควบคุมไปด้วยทุกครั้ง แสดงเป็นโครมาโทแกรม ดังนี้



ภาพที่ 40 โครมาโทแกรมของ Blank (30% ACN)

4.2.2 ผลการวิเคราะห์สารมาตรฐาน BPA-G ด้วยเทคนิค Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS)

4.2.2.1 ผลของ %recovery โดยใช้ SALLE method

ก่อนการเตรียมตัวอย่าง ทำการทดสอบ %recovery จากการใช้ SALLE method โดยเปรียบเทียบระหว่างการเติมสารมาตรฐาน BPA-G และ internal standard ก่อนการสกัดและหลังการสกัด โดยได้ผล ดังแสดงในตารางที่ 18

ตารางที่ 18 ข้อมูลของ ของ %recovery ที่ได้จากการวิเคราะห์จากตัวอย่างปัสสาวะด้วย SALLE method

BPA-G	Nominal value (ng/mL)	Area ratio	Average measured value	%CV	%Recovery
Low ^a	5	0.278	5.11	11.30	102.45
Low ^b	5	0.271	5.02	4.26	
High ^a	50	3.55	50.43	6.52	88.98
High ^b	50	3.98	56.3	1.67	

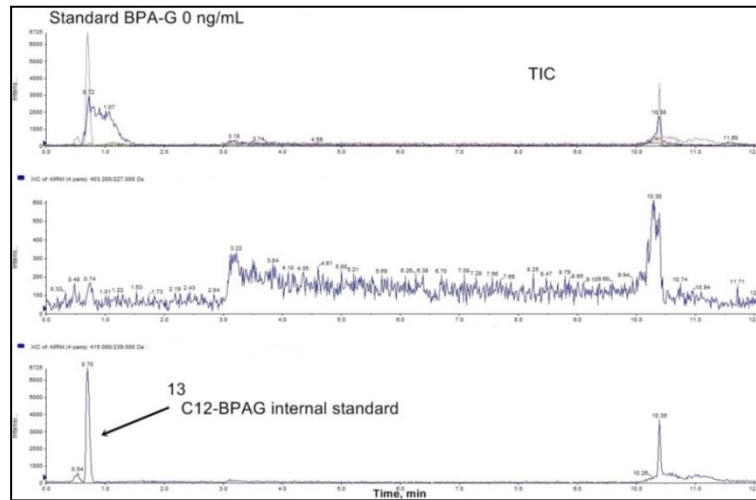
a: เติมสารมาตรฐานก่อนการสกัด

b: เติมสารมาตรฐานหลังการสกัด

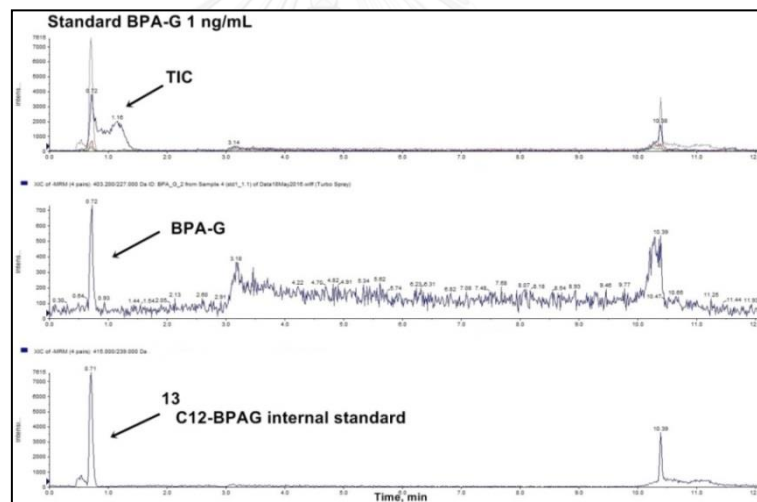
จากตาราง พบว่าสารมาตรฐานค่าต่ำและค่าสูงมี %recovery 102.45% และ 88.98% ตามลำดับ

4.2.2.2 ผลการวิเคราะห์สารมาตรฐาน BPA-G

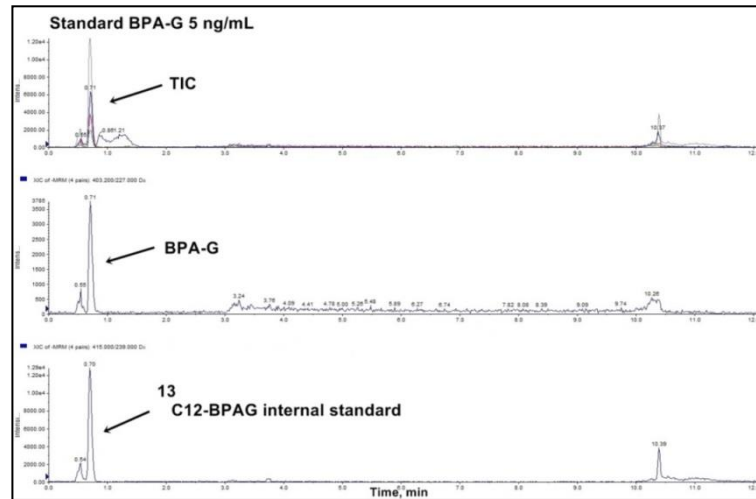
ในการวิเคราะห์สารมาตรฐาน BPA-G ที่เตรียมใน synthetic urine ที่มีความเข้มข้นต่างๆ คือ 0, 1, 5, 10, 15, 20, 30, 50 และ 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมี ¹³C₁₂-BPAG ความเข้มข้น 20 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร เป็น internal standard โดยผลการทดลองจากเครื่อง LC-MS/MS แสดงเป็นโครมาโทแกรม ดังนี้



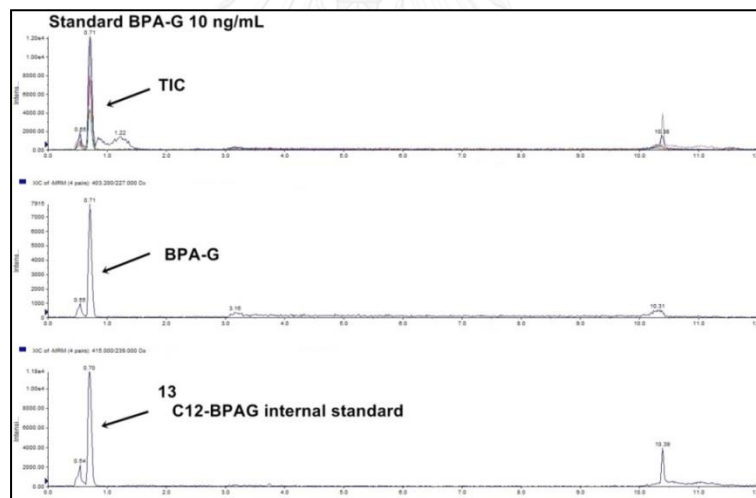
ภาพที่ 41 โครมาโทแกรมของสารมาตรฐาน BPA-G ความเข้มข้น 0 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร



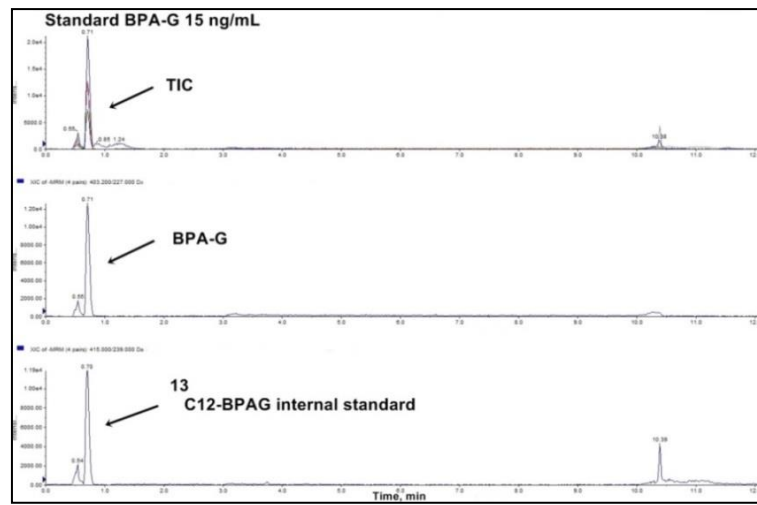
ภาพที่ 42 โครมาโทแกรมของสารมาตรฐาน BPA-G ความเข้มข้น 1 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร



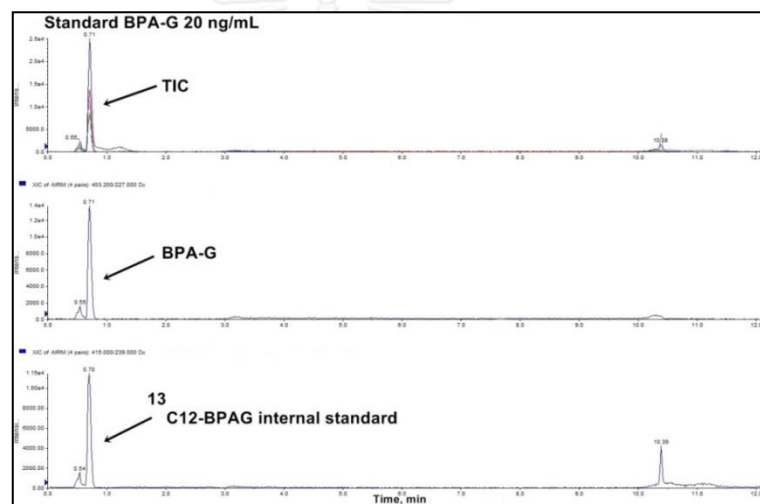
ภาพที่ 43 โครมาโทแกรมของสารมาตรฐาน BPA-G ความเข้มข้น 5 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร



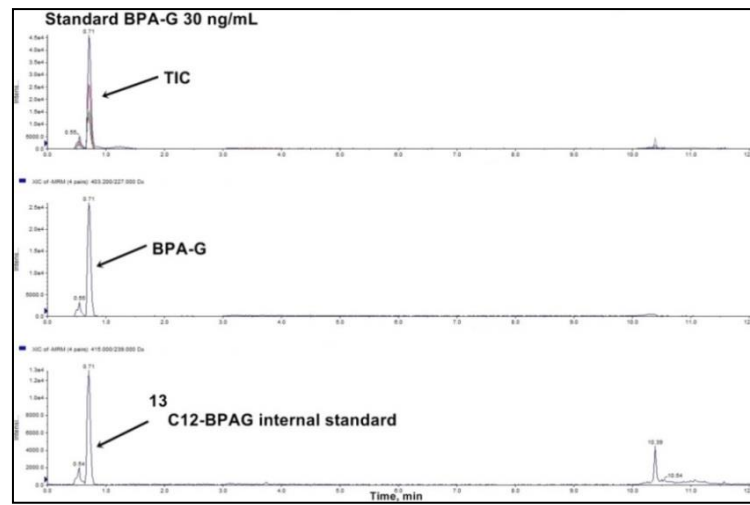
ภาพที่ 44 โครมาโทแกรมของสารมาตรฐาน BPA-G ความเข้มข้น 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร



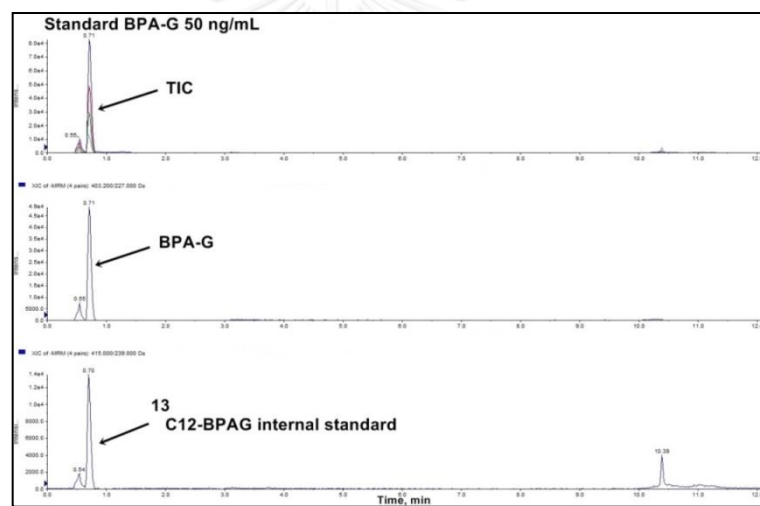
ภาพที่ 45 โครมาโทแกรมของสารมาตรฐาน BPA-G ความเข้มข้น 15 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร



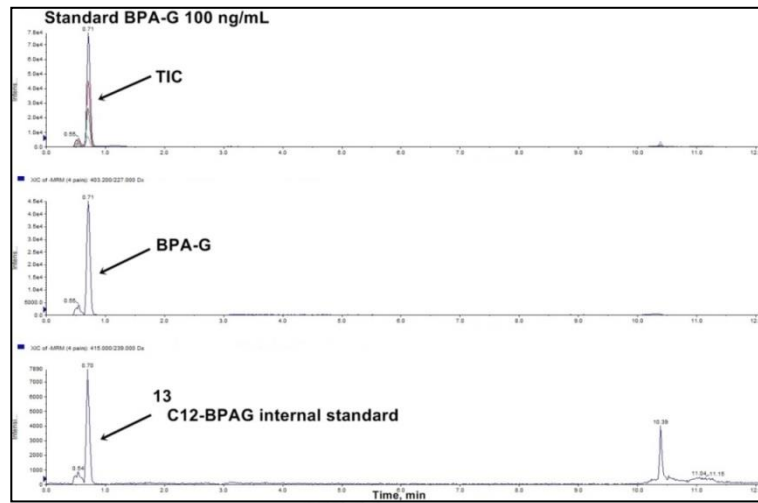
ภาพที่ 46 โครมาโทแกรมของสารมาตรฐาน BPA-G ความเข้มข้น 20 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร



ภาพที่ 47 โครมาโทแกรมของสารมาตรฐาน BPA-G ความเข้มข้น 30 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร



ภาพที่ 48 โครมาโทแกรมของสารมาตรฐาน BPA-G ความเข้มข้น 50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร



ภาพที่ 49 โครมาโทแกรมของสารมาตรฐาน BPA-G ความเข้มข้น 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร

จาก โครมาโทแกรมที่ได้จากการวิเคราะห์สารมาตรฐาน BPA-G ที่ความเข้มข้น 0, 1, 5, 10, 15, 20, 30, 50 และ 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ทั้งสามครั้ง โดยข้อมูลของ retention time, peak area และ peak area ratio ที่ได้จากการวิเคราะห์ ดังแสดงในตารางที่ 19

ตารางที่ 19 ข้อมูลของ retention time, peak area และ peak area ratio ที่ได้จากการวิเคราะห์

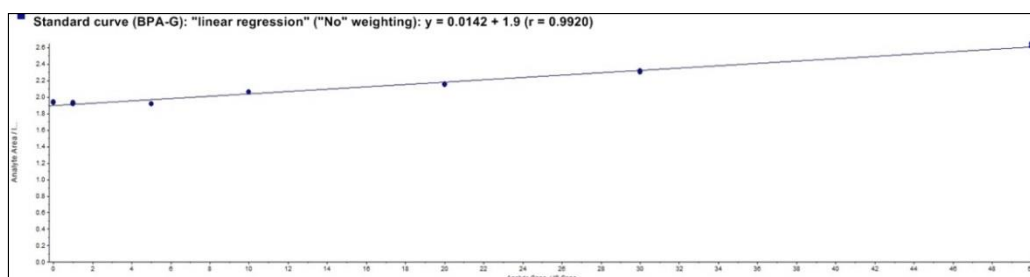
BPA Concentration	Retention Time	Peak Area	Peak Area Ratio
0 ng/mL			
BPA-G ₁	-	422	0.014
¹³ C ₁₂ -BPAG ₁	0.70	29200	
BPA-G ₂	-	697	0.024
¹³ C ₁₂ -BPAG ₂	0.70	29000	
1 ng/mL			
BPA-G ₁	0.72	3360	0.06
¹³ C ₁₂ -BPAG ₁	0.71	55400	
BPA-G ₂	0.71	0.060708	0.06
¹³ C ₁₂ -BPAG ₂	0.70	53700	
5 ng/mL			
BPA-G ₁	0.71	16900	0.29
¹³ C ₁₂ -BPAG ₁	0.70	57200	
BPA-G ₂	0.71	16400	0.28
¹³ C ₁₂ -BPAG ₂	0.70	58000	
10 ng/mL			
BPA-G ₁	0.71	32000	0.56
¹³ C ₁₂ -BPAG ₁	0.70	57100	
BPA-G ₂	0.71	32400	0.57
¹³ C ₁₂ -BPAG ₂	0.70	56200	
15 ng/mL			
BPA-G ₁	0.71	55100	0.97
¹³ C ₁₂ -BPAG ₁	0.70	56400	
BPA-G ₂	0.71	55800	0.94
¹³ C ₁₂ -BPAG ₂	0.70	59000	

BPA Concentration	Retention Time	Peak Area	Peak Area Ratio
20 ng/mL			
BPA-G ₁	0.71	56600	1.11
¹³ C ₁₂ -BPAG ₁	0.70	50700	
BPA-G ₂	0.71	59300	1.16
¹³ C ₁₂ -BPAG ₂	0.70	51100	
30 ng/mL			
BPA-G ₁	0.71	106000	2.01
¹³ C ₁₂ -BPAG ₁	0.71	52700	
BPA-G ₂	0.71	108000	1.96
¹³ C ₁₂ -BPAG ₂	0.70	55000	
50 ng/mL			
BPA-G ₁	0.71	201000	3.53
¹³ C ₁₂ -BPAG ₁	0.70	56800	
BPA-G ₂	0.71	197000	3.49
¹³ C ₁₂ -BPAG ₂	0.70	56300	
100 ng/mL			
BPA-G ₁	0.71	156000	6.39
¹³ C ₁₂ -BPAG ₁	0.70	24400	
BPA-G ₂	0.71	160000	6.61
¹³ C ₁₂ -BPAG ₂	0.71	24200	

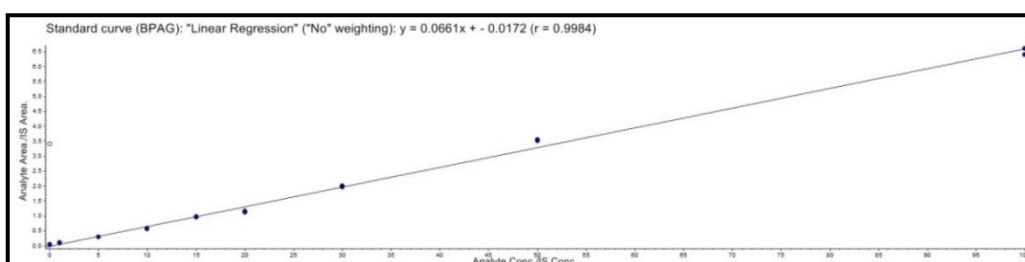
จากข้อมูลที่ได้นำมาสร้างกราฟมาตรฐาน โดยใช้โปรแกรม Analyst software® (AB SCIEX) ซึ่ง plot ระหว่างแกน y คือ peak area ratio (area BPA-G/area ¹³C₁₂-BPAG) และแกน x คือ สารมาตรฐาน BPA-G ทุกความเข้มข้น

สำหรับวิธีที่ 1 การหาปริมาณ BPA-G จากกราฟมาตรฐานแบบ matrix matched calibration curve โดยการ spike standard ลงใน human urine ที่สารมาตรฐานความเข้มข้น 0, 1, 5, 10, 20, 30 และ 50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อสร้างกราฟมาตรฐานดังแสดงในภาพที่ 50

วิธีที่ 2 การหาปริมาณ BPA-G จากกราฟมาตรฐานแบบ matrix matched calibration curve โดยวิธีการ spike standard ลงใน synthetic urine ซึ่งไม่มีการปนเปื้อนของ BPA-G ที่สารมาตรฐานความเข้มข้น 0, 1, 5, 10, 15, 20, 30, 50 และ 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อสร้างกราฟมาตรฐาน ดังแสดงในภาพที่ 51



ภาพที่ 50 กราฟมาตรฐานที่เตรียมจาก human urine

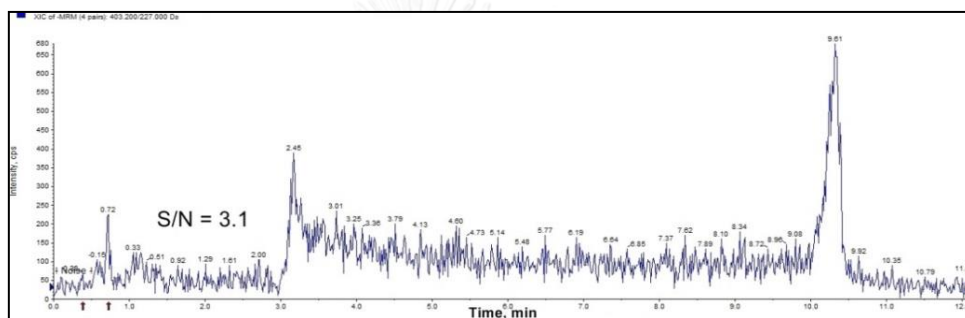


ภาพที่ 51 กราฟมาตรฐานที่เตรียมจาก synthetic urine

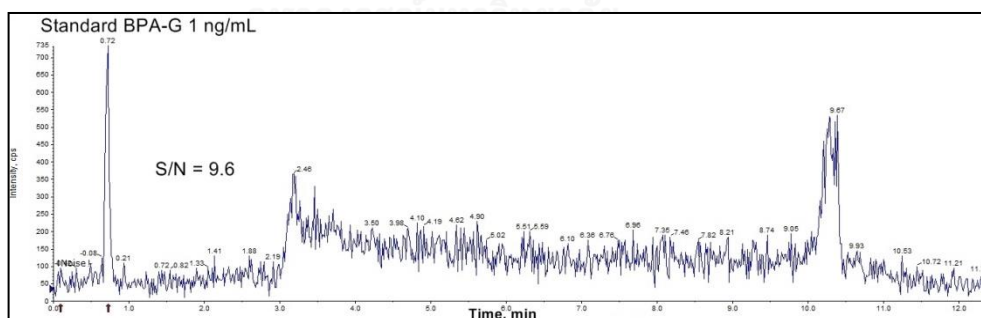
สำหรับคำนวณปริมาณ BPA-G ในตัวอย่างปัสสาวะ

การวิเคราะห์หาปริมาณ BPA-G ในปัสสาวะ สามารถหาปริมาณได้จากกราฟมาตรฐานแบบ matrix matched calibration curve โดยวิธีที่ 1 เตรียมจาก human urine นิยมใช้ในงานวิจัยที่ต้องการวิเคราะห์เปรียบเทียบหาปริมาณของ BPA-G ในปัสสาวะ ก่อนการได้รับ BPA เข้าสู่ร่างกาย เทียบกับหลังการได้รับ BPA ในบุคคลเดียวกัน โดยต้องเตรียมกราฟมาตรฐานโดยใช้ urine ของแต่ละบุคคล (51) ซึ่งการเตรียมกราฟมาตรฐานด้วยวิธีดังกล่าว ทำให้เสียเวลาในการเตรียมตัวอย่าง และเวลาในการวิเคราะห์เป็นอย่างมาก ผู้วิจัยจึงพัฒนาวิธีเตรียมกราฟมาตรฐานที่ใช้ synthetic urine (วิธีที่ 2) แทน human urine เพราะ synthetic urine ไม่มีการปนเปื้อนของ BPA-G ซึ่งต่างจาก human urine ที่ไม่อาจหลีกเลี่ยงการปนเปื้อนของ BPA-G เนื่องจากบุคคลไม่สามารถหลีกเลี่ยงการได้รับ BPA จากสิ่งแวดล้อมในชีวิตประจำวันได้ นอกจากนี้ การเตรียมกราฟมาตรฐานด้วยวิธี human urine ยังไม่อาจนำมาใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณ BPA-G จากปัสสาวะของบุคคล ณ เวลาใดเวลาหนึ่งอีกด้วย อย่างไรก็ตาม การสร้างกราฟมาตรฐานแบบ matrix matched calibration curve เพื่อหาปริมาณ BPA-G ทั้งจาก human urine และ synthetic urine เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพ และเหมาะสม สำหรับนำไปใช้ในงานวิจัยที่เกี่ยวข้องต่อไปได้

เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกราฟมาตรฐานที่เตรียมจาก human urine และกราฟมาตรฐานที่เตรียมจาก synthetic urine พบว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นทั้ง 2 วิธี มีความเหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ BPA-G จากปัสสาวะ วิธีที่ 1 กราฟมาตรฐาน BPA-G มีความเป็นเส้นตรง ด้วยค่า $r^2 > 0.992$ พบว่า Lower limit of detection (LLOD) หรือปริมาณ BPA-G ที่ต่ำที่สุดที่จะวิเคราะห์ได้เท่ากับ 0.26 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งพิจารณาจาก S/N (signal to noise ratio) มากกว่าหรือเท่ากับสาม และ Lower limit of quantification (LLOQ) เท่ากับ 0.87 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งพิจารณาจาก S/N (signal to noise ratio) มากกว่าหรือเท่ากับ 10 และวิธีที่ 2 มีความเป็นเส้นตรง ด้วยค่า $r^2 > 0.998$ และพบว่า LLOD เท่ากับ 0.4 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และสำหรับ LLOQ เท่ากับ 1 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับตัวอย่างของ LLOD และ LLOQ ดังแสดงในภาพที่ 52 และ ภาพที่ 53



ภาพที่ 52 signal to noise ratio ของสารมาตรฐาน BPA-G ความเข้มข้น 0.4 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร (วิเคราะห์จาก method blank)



ภาพที่ 53 signal to noise ratio ของสารมาตรฐาน BPA-G ความเข้มข้น 1 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร

สำหรับวิธีที่ 1 จากข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์สารมาตรฐาน BPA-G แล้วหาค่า intraday precision และค่า interday precision ของค่าต่ำ (5 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร) ค่ากลาง (20 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร) และค่าสูง (50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร) เพื่อดูความเที่ยงตรงของการวิเคราะห์ แสดงในตารางที่ 20

ตารางที่ 20 ค่า nominal value, average measured value และ %CV ที่ได้จากการวิเคราะห์สารมาตรฐานที่ความเข้มข้น 5, 20, และ 50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร

		Intraday (n = 2)			Interday (n = 2)		
BPA	Nominal value (ng/mL)	Average measured value (ng/mL)	Accuracy	% CV	Average measured value (ng/mL)	Accuracy	% CV
Low	5 ng/mL	3.9	78.7	1.1	3.8	76.6	4.6
Medium	20 ng/mL	17.2	85.8	1.1	16.4	81.7	4.8
High	50 ng/mL	52.3	104.5	0.4	52.8	105.5	4.1

สำหรับวิธีที่ 2 จากข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์สารมาตรฐาน BPA-G แล้วหาค่า intraday precision และค่า interday precision ของค่าต่ำ (5 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร) ค่ากลาง (30 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร) และค่าสูง (50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร) เพื่อดูความเที่ยงตรงของการวิเคราะห์ แสดงในตารางที่ 21

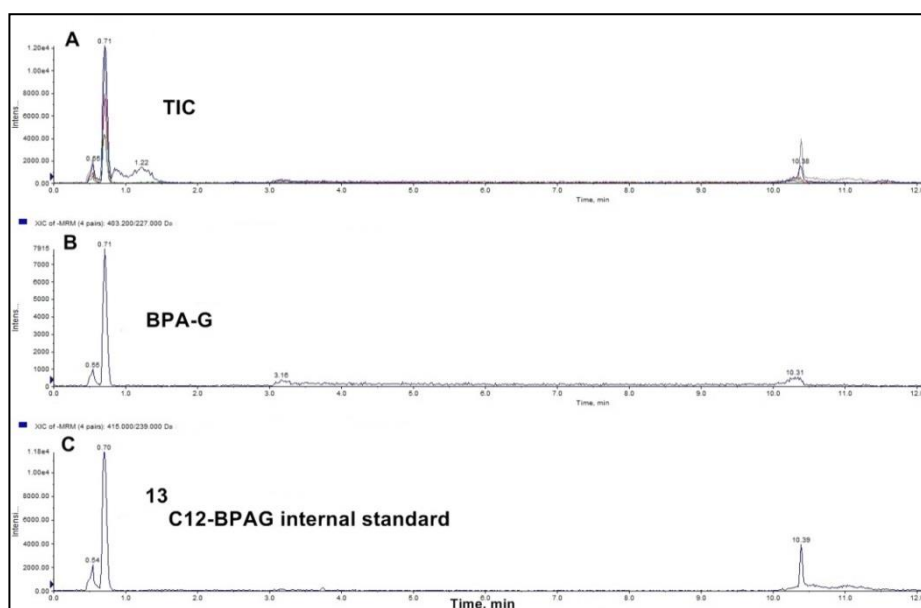
ตารางที่ 21 ค่า nominal value, average measured value และ %CV ที่ได้จากการวิเคราะห์สารมาตรฐานที่ความเข้มข้น 5, 30, และ 50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร

		Intraday (n = 4)			Interday (n = 2)		
BPA	Nominal value (ng/mL)	Average measured value (ng/mL)	Accuracy	% CV	Average measured value (ng/mL)	Accuracy	% CV
Low	5 ng/mL	4.63	92.57	4.99	4.51	90.18	7.3
Medium	30 ng/mL	30.42	101.25	4.84	27.66	92.12	6.86
High	50 ng/mL	53.9	107.75	1.95	51.65	103.27	1.84

จากผลของ %CV ของทั้ง 2 วิธี พบว่าค่าที่ได้อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ เนื่องจาก %CV มีค่าไม่เกิน 15% (20)

4.2.3 ผลการวิเคราะห์สิ่งตัวอย่างปัสสาวะด้วยเทคนิคเทคนิค Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS)

หลังจากวิเคราะห์สารมาตรฐาน BPA-G แล้ว จึงทำการวิเคราะห์ BPA-G จากตัวอย่างปัสสาวะที่เตรียมจากการสกัดโดย SALLE method ด้วยเครื่อง LC-MS/MS ผลการทดลองที่ได้แสดงเป็นตัวอย่างโครมาโทแกรม ดังนี้



ภาพที่ 54 โครมาโทแกรมของตัวอย่างปัสสาวะที่ spike ด้วย $^{13}\text{C}_{12}$ -BPAG ความเข้มข้น 20 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร

(A) Total ion chromatogram, (B) โครมาโทแกรมของ BPA-G ที่ตรวจพบในตัวอย่างปัสสาวะ และ (C) โครมาโทแกรม $^{13}\text{C}_{12}$ -BPAG ความเข้มข้น 20 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร

เมื่อนำวิธีที่หาปริมาณ BPA-G จากกราฟมาตรฐานที่สร้างจาก synthetic urine ซึ่งไม่มีการปนเปื้อนของ BPA-G ที่พัฒนาขึ้น ไปใช้หาปริมาณ BPA-G ในปัสสาวะของผู้ร่วมโครงการวิจัย พบปริมาณ BPA-G ดังแสดงในตารางที่ 22

ตารางที่ 22 ปริมาณ BPA-G ที่พบในปัสสาวะของผู้ร่วมโครงการวิจัย

No.	เพศ	ก่อนดื่มน้ำผลไม้ ($\mu\text{g/g creatinine}$)
1.	หญิง	57.03 ± 0.08
2.	หญิง	769.62 ± 1.00
3.	หญิง	6.26 ± 0.005
4.	หญิง	33.30 ± 0.01
5.	หญิง	6.12 ± 0.04
6.	ชาย	54.81 ± 0.17
7.	ชาย	7.24 ± 0.10
8.	ชาย	15.96 ± 0.009
9.	ชาย	6.24 ± 0.005
10.	ชาย	11.93 ± 0.018
11.	หญิง	12.90 ± 0.002
12.	หญิง	276.30 ± 1.00
13.	หญิง	40.16 ± 0.05
14.	หญิง	18.14 ± 0.01
15.	หญิง	8.66 ± 0.01
16.	ชาย	5.13 ± 0.01

No.	เพศ	ก่อนดื่มน้ำผลไม้ ($\mu\text{g/g creatinine}$)
17.	ชาย	8.00 ± 0.01
18.	ชาย	6.15 ± 0.05
19.	ชาย	5.67 ± 0.002
20	ชาย	27.43 ± 0.09



สำหรับการประเมินความเสี่ยงของการได้รับ BPA เข้าสู่ร่างกาย พิจารณาจาก Total BPA ซึ่งมี 2 วิธี โดยวิธีที่ 1 คือ การหาปริมาณ BPA-G โดยตรง รวมกับปริมาณ free BPA และวิธีที่ 2 คือ การหาปริมาณ BPA-G จากการนำปัสสาวะไปย่อยด้วย β -Glucuronidase รวมกับปริมาณ free BPA ซึ่งวิธีที่ 2 ต้องผ่านกระบวนการเตรียมตัวอย่างหลายขั้นตอน ได้แก่ ขั้นตอน enzymatic hydrolysis ขั้นตอนการสกัด ขั้นตอน clean up ซึ่งจะทำให้เกิดการปนเปื้อนของ BPA ได้ (16)

การศึกษานี้ได้ทำการพัฒนาวิธีสกัด BPA-G ด้วย salting-out assisted liquid/liquid extraction (SALLE) ที่เป็นวิธีที่ใช้ organic salt เพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดการแยกระหว่างชั้นที่เป็น organic solvent (ACN) ที่อยู่ใน aqueous solution ทำให้แยก (partitioning) BPA-G ซึ่งเป็นสารที่มีขั้วไปอยู่ใน organic phase โดยวิธีที่พัฒนาขึ้นใช้เวลาที่น้อยกว่าและประหยัดกว่า conventional method เช่น LLE และ SPE นอกจากนี้วิธี SALLE ที่พัฒนาขึ้นยังมีประสิทธิภาพและเหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ BPA-G เนื่องจากให้ % recovery สูง (88.98%, 102.45%)

ก่อนหน้านี้ได้มีการศึกษาด้วย SALLE ใน สาร cannabinoid ในปัสสาวะ โดย Yanes และคณะ ซึ่งพบว่าได้ %recovery อยู่ในช่วง 82.1%-104.6% (114) ซึ่งใกล้เคียงกับ %recovery ที่ได้จากการพัฒนาวิธีสกัด BPA-G ในปัสสาวะจากการศึกษาในครั้งนี้ แต่ในการศึกษาของ Venisse และคณะ ซึ่งศึกษาปริมาณ BPA ในปัสสาวะด้วย SALLE เป็นครั้งแรก ได้ %recovery เพียง 33-45% (20) นอกจากนี้ยังมีการใช้ SALLE ในการสกัดสารชนิดอื่น ๆ อีก เช่น การหาปริมาณของ benzimidazole fungicides พบว่าได้ %recovery อยู่ในช่วง 60.4%-99.1% ซึ่งพบว่าประสิทธิภาพของ SALLE ขึ้นกับชนิดของ solvent ที่ใช้ ปริมาตร pH และเวลาที่ใช้ในการ vortex (114)

เมื่อนำวิธี SALLE ที่พัฒนาขึ้นไปหาปริมาณ BPA-G ในปัสสาวะของผู้ร่วมโครงการวิจัย จำนวน 20 คน พบว่าปริมาณ BPA-G ในปัสสาวะสูงที่สุด เท่ากับ 769.62 $\mu\text{g/g}$ creatinine และต่ำที่สุด เท่ากับ 5.13 $\mu\text{g/g}$ creatinine

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย

การพัฒนากระบวนการสกัด BPA จากน้ำผลไม้/น้ำผักสำเร็จรูป ด้วย solid phase extraction (SPE) โดยการใช้สารละลาย acetic acid/acetonitrile ในการสกัด ก่อนจะนำไปวิเคราะห์หาปริมาณ BPA ด้วยเทคนิค LC-MS/MS นั้น acetic acid/acetonitrile ทำหน้าที่เป็นตัวชะสารฟลาโวนอยด์ซึ่งมีโครงสร้างคล้ายคลึงกับ BPA ออกจากน้ำผลไม้/น้ำผัก ทำให้วิธีที่พัฒนาขึ้นนี้มีความจำเพาะและช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค LC-MS/MS ทำให้ใช้เวลาในการวิเคราะห์น้อยกว่า 1 นาที เมื่อเทียบกับวิธีที่ใช้อยู่เดิม คือการใช้ acetonitrile ในการสกัด กราฟมาตรฐาน BPA มีความเป็นเส้นตรง ด้วยค่า $r^2 > 0.997$ และวิธีการวิเคราะห์ที่ให้ค่า Lower limit of detection (LLOD) เท่ากับ 0.05 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และ Lower limit of quantification (LLOQ) เท่ากับ 0.25 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนการทดสอบ blank จาก 30% ACN พบว่าไม่มีการปนเปื้อนจาก BPA จากกระบวนการเตรียมตัวอย่าง สำหรับค่าเฉลี่ยของ recovery ที่ได้จากการสกัด BPA ในน้ำผลไม้/น้ำผักจากการวิเคราะห์ 6 ซ้ำในแต่ละตัวอย่างโดยดูจากปริมาณ BPA-d16 พบว่า %recovery อยู่ในช่วง 82.73-108.79% สำหรับความสามารถในการทำซ้ำ (reproducibility) โดยดูจาก %CV อยู่ในช่วง 1.58-10.76% ส่วนความเที่ยงตรงเมื่อวิเคราะห์ในวันเดียวกัน (intraday precisions) และต่างวันกัน (interday precisions) อยู่ในช่วงที่ยอมรับได้คือ 0.41-2.19% และ 3.62-5.75% ตามลำดับ ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความแม่นยำและความเที่ยงตรงของวิธีที่พัฒนาขึ้น และจากการนำวิธีที่พัฒนาขึ้นใหม่นี้ ไปใช้ตรวจวิเคราะห์หาปริมาณ BPA ปนเปื้อนในน้ำผลไม้/น้ำผักสำเร็จรูปที่วางจำหน่ายในซูเปอร์มาร์เก็ต กรุงเทพฯ พบปริมาณ BPA ปนเปื้อนสูงสุด 68.28 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร โดยงานวิจัยนี้เป็นงานวิจัยแรก ที่ทำการตรวจวัดปริมาณ BPA ในน้ำผลไม้/น้ำผักในประเทศไทย ทั้งๆ ที่ผู้บริโภคมีแนวโน้มที่จะบริโภคน้ำผลไม้/น้ำผักเพื่อสุขภาพเพิ่มขึ้นในทุกๆปี

วิธีการเตรียมตัวอย่างสำหรับหาปริมาณ BPA ในน้ำผลไม้/น้ำผักที่พัฒนาขึ้น นอกจากจะเหมาะสำหรับวิเคราะห์ด้วยเทคนิค LC-MS/MS แล้ว ยังสามารถนำไปประยุกต์ใช้สำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณ BPA ด้วย RP-HPLC/fluorescence system ได้อีกด้วย เนื่องจาก RP-HPLC/fluorescence ไม่สามารถแยกสารประกอบที่มีโครงสร้างใกล้เคียงกัน จึงต้องการวิธีการสกัด BPA จากน้ำผลไม้/น้ำผัก ที่มีความจำเพาะในการสกัดสารรบกวนในน้ำผลไม้/น้ำผัก เช่น ฟลาโวนอยด์ ออกก่อนที่จะนำไปวิเคราะห์ต่อยด้วย HPLC

สำหรับการพัฒนากระบวนการสกัด BPA-G ในปัสสาวะ ด้วยวิธี salting-out assisted liquid/liquid extraction (SALLE) เพื่อใช้ในการตรวจด้วยเทคนิค LC-MS/MS ผู้วิจัยได้พัฒนาวิธีใน

การหาปริมาณ BPA-G ในปัสสาวะ 2 วิธี คือ วิธีที่ 1 การหาปริมาณ BPA-G จากกราฟมาตรฐานแบบ matrix matched calibration curve โดยวิธีการ spike standard ลงใน human urine และวิธีที่ 2 การหาปริมาณ BPA-G จากกราฟมาตรฐานแบบ matrix matched calibration curve โดยวิธีการ spike standard ลงใน synthetic urine ซึ่งไม่มีการปนเปื้อนของ BPA-G พบว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นทั้ง 2 วิธี มีความเหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ BPA-G จากปัสสาวะ

วิธีที่ 1 กราฟมาตรฐาน BPA-G มีความเป็นเส้นตรง ด้วยค่า $r^2 > 0.992$ และวิธีการวิเคราะห์มีค่า Lower limit of detection (LLOD) เท่ากับ 0.26 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และ Lower limit of quantification (LLOQ) เท่ากับ 0.87 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนค่าความเที่ยงตรงของวิธีที่ใช้ เมื่อวิเคราะห์ภายในวันเดียวกันและต่างวันกันอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ เนื่องจากอยู่ในช่วง 0.4-1.1% และ 4.1-4.6% ตามลำดับ และวิธีที่ 2 กราฟมาตรฐาน BPA-G มีความเป็นเส้นตรง ด้วยค่า $r^2 > 0.998$ และวิธีการวิเคราะห์มีค่า LLOD เท่ากับ 0.4 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และ LLOQ เท่ากับ 1 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนค่าความเที่ยงตรงของวิธีที่ใช้ เมื่อวิเคราะห์ภายในวันเดียวกันและต่างวันกันอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ โดยอยู่ในช่วง 1.95-4.99% และ 1.84-7.3% ตามลำดับ ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความแม่นยำและความเที่ยงตรงของวิธีที่พัฒนาขึ้น ส่วนการทดสอบ method blank พบว่าไม่มีการปนเปื้อนของ BPA-G จากกระบวนการเตรียมตัวอย่าง สำหรับค่าเฉลี่ยของ %recovery ที่ได้จากการสกัด BPA-G ในตัวอย่างปัสสาวะ โดยเปรียบเทียบระหว่างการเติมสารมาตรฐาน BPA-G และ internal standard ก่อนการสกัดและหลังการสกัด พบว่าสารมาตรฐานค่าต่ำ (5 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร) และค่าสูง (50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร) มี %recovery คือ 102.45% และ 88.98% ตามลำดับ เมื่อนำวิธีที่หาปริมาณ BPA-G จากกราฟมาตรฐานที่สร้างจาก synthetic urine ซึ่งไม่มีการปนเปื้อนของ BPA-G ที่พัฒนาขึ้น ไปใช้หาปริมาณ BPA-G ในปัสสาวะของผู้ร่วมโครงการวิจัย พบว่าปริมาณ BPA-G ในปัสสาวะสูงที่สุด เท่ากับ 769.62 $\mu\text{g/g}$ creatinine และต่ำที่สุด เท่ากับ 5.13 $\mu\text{g/g}$ creatinine

เมื่อพิจารณาจาก ค่าความเป็นเส้นตรง intraday precision, interday precision และ %recovery จากการสกัดด้วยวิธี SALLE แสดงให้เห็นว่า วิธีที่พัฒนาขึ้นมีประสิทธิภาพ นอกจากนี้ยังเป็นวิธีที่สะดวกรวดเร็ว มีความจำเพาะ ช่วยลดเวลาในการเตรียมตัวอย่าง และลดค่าใช้จ่ายเมื่อเปรียบเทียบกับ conventional method เช่น LLE และ SPE ดังนั้นวิธี SALLE ที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถนำไปใช้หาปริมาณ BPA-G ในปัสสาวะของมนุษย์ และสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในงานวิจัยที่เกี่ยวข้องต่อไปได้

รายการอ้างอิง

1. Cooper JE, Kendig EL, Belcher SM. Assessment of bisphenol A released from reusable plastic, aluminium and stainless steel water bottles. *Chemosphere*. 2011;85(6):943-7.
2. Doerge DR, Twaddle NC, Vanlandingham M, Brown RP, Fisher JW. Distribution of bisphenol A into tissues of adult, neonatal, and fetal Sprague–Dawley rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2011;255(3):261-70.
3. Völkel W, Kiranoglu M, Fromme H. Determination of free and total bisphenol A in urine of infants. *Environmental research*. 2011;111(1):143-8.
4. Xiao S, Diao H, Smith MA, Song X, Ye X. Preimplantation exposure to bisphenol A (BPA) affects embryo transport, preimplantation embryo development, and uterine receptivity in mice. *Reproductive Toxicology*. 2011;32(4):434-41.
5. Taylor JA, Richter CA, Ruhlen RL, vom Saal FS. Estrogenic environmental chemicals and drugs: mechanisms for effects on the developing male urogenital system. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2011;127(1):83-95.
6. vom Saal FS, Nagel SC, Coe BL, Angle BM, Taylor JA. The estrogenic endocrine disrupting chemical bisphenol A (BPA) and obesity. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2012;354(1–2):74-84.
7. Teng C, Goodwin B, Shockley K, Xia M, Huang R, Norris J, et al. Bisphenol A affects androgen receptor function via multiple mechanisms. *Chemico-Biological Interactions*. 2013;203(3):556-64.
8. Geens T, Aerts D, Berthot C, Bourguignon J-P, Goeyens L, Lecomte P, et al. A review of dietary and non-dietary exposure to bisphenol-A. *Food and Chemical Toxicology*. 2012;50(10):3725-40.
9. Doerge DR, Twaddle NC, Woodling KA, Fisher JW. Pharmacokinetics of bisphenol A in neonatal and adult rhesus monkeys. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2010;248(1):1-11.

10. Jasarevic E, Williams SA, Vandas GM, Ellersieck MR, Liao C, Kannan K, et al. Sex and dose-dependent effects of developmental exposure to bisphenol A on anxiety and spatial learning in deer mice (*Peromyscus maniculatus bairdii*) offspring. *Horm Behav.* 2013;63(1):180-9.
11. Nakamura D, Yanagiba Y, Duan Z, Ito Y, Okamura A, Asaeda N, et al. Bisphenol A may cause testosterone reduction by adversely affecting both testis and pituitary systems similar to estradiol. *Toxicol Lett.* 2010;194(1-2):16-25.
12. Krishnan K, Gagne M, Nong A, Aylward LL, Hays SM. Biomonitoring Equivalents for bisphenol A (BPA). *Regul Toxicol Pharmacol.* 2010;58(1):18-24.
13. Brock JW, Yoshimura Y, Barr JR, Maggio VL, Graiser SR, Nakazawa H, et al. Measurement of bisphenol A levels in human urine. *Journal of Exposure Analysis & Environmental Epidemiology.* 2001;11(4).
14. Michałowicz J. Bisphenol A—Sources, toxicity and biotransformation. *Environmental toxicology and pharmacology.* 2014;37(2):738-58.
15. Hauck ZZ, Huang K, Li G, van Breemen RB. Determination of bisphenol A-glucuronide in human urine using ultrahigh-pressure liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid communications in mass spectrometry : RCM.* 2016;30(3):400-6.
16. Harthé C, Rinaldi S, Achaintre D, de Ravel MR, Mappus E, Pugeat M, et al. Bisphenol A-glucuronide measurement in urine samples. *Talanta.* 2012;100:410-3.
17. Inoue K, Kato K, Yoshimura Y, Makino T, Nakazawa H. Determination of bisphenol A in human serum by high-performance liquid chromatography with multi-electrode electrochemical detection. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications.* 2000;749(1):17-23.
18. Kuo H-W, Ding W-H. Trace determination of bisphenol A and phytoestrogens in infant formula powders by gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A.* 2004;1027(1–2):67-74.
19. Braunrath R, Cichna M. Sample preparation including sol-gel immunoaffinity chromatography for determination of bisphenol A in canned beverages, fruits and vegetables. *J Chromatogr A.* 2005;1062(2):189-98.

20. Venisse N, Grignon C, Brunet B, Thévenot S, Bacle A, Migeot V, et al. Reliable quantification of bisphenol A and its chlorinated derivatives in human urine using UPLC–MS/MS method. *Talanta*. 2014;125:284-92.
21. Lang la GTSSA, et al. Association of urinary bisphenol a concentration with medical disorders and laboratory abnormalities in adults. *JAMA*. 2008;300(11):1303-10.
22. Yi B, Kim C, Yang M. Biological monitoring of bisphenol A with HPLC/FLD and LC/MS/MS assays. *Journal of Chromatography B*. 2010;878(27):2606-10.
23. Noonan GO, Ackerman LK, Begley TH. Concentration of bisphenol A in highly consumed canned foods on the US market. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2011;59(13):7178-85.
24. Wetherill YB, Akingbemi BT, Kanno J, McLachlan JA, Nadal A, Sonnenschein C, et al. In vitro molecular mechanisms of bisphenol A action. *Reproductive Toxicology*. 2007;24(2):178-98.
25. European Food Safety Authority. Results of the monitoring of dioxin levels in food and feed. *EFSA*. 2010;8(3):1-36.
26. Birnbaum LS, Staskal DF. Brominated flame retardants: cause for concern? *Environmental health perspectives*. 2004;112(1):9.
27. Rudel RA, Perovich LJ. Endocrine disrupting chemicals in indoor and outdoor air. *Atmospheric Environment*. 2009;43(1):170-81.
28. Costa L. The neurotoxicity of organochlorine and pyrethroid pesticides. *Handbook of clinical neurology*. 2014;131:135-48.
29. Lee P-C, Lee W. In vivo estrogenic action of nonylphenol in immature female rats. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*. 1996;57(3):341-8.
30. Lee HJ, Chattopadhyay S, Gong E-Y, Ahn RS, Lee K. Antiandrogenic effects of bisphenol A and nonylphenol on the function of androgen receptor. *Toxicological Sciences*. 2003;75(1):40-6.
31. Segner H, Carroll K, Fenske M, Janssen C, Maack G, Pascoe D, et al. Identification of endocrine-disrupting effects in aquatic vertebrates and invertebrates: report from the European IDEA project. *Ecotoxicology and environmental safety*. 2003;54(3):302-14.

32. Selected item from the FDA drug bulletin-november 1971: diethylstilbestrol contraindicated in pregnancy. *California medicine*. 1972;116(2):85-6.
33. Geens T, Goeyens L, Covaci A. Are potential sources for human exposure to bisphenol-A overlooked? *Int J Hyg Environ Health*. 2011;214(5):339-47.
34. EU Risk Assessment: Updated Risk Assessment Report on Bisphenol A. Publications Office of the European Union, Luxembourg: European Union, 2008.
35. Staples CA, Dome PB, Klecka GM, Oblock ST, Harris LR. A review of the environmental fate, effects, and exposures of bisphenol A. *Chemosphere*. 1998;36(10):2149-73.
36. Dodds E, Lawson W. Synthetic estrogenic agents without the phenanthrene nucleus. *Nature*. 1936;137(3476):996.
37. Calafat AM, Ye X, Wong L-Y, Reidy JA, Needham LL. Exposure of the US population to bisphenol A and 4-tertiary-octylphenol: 2003–2004. *Environmental health perspectives*. 2008;116(1):39.
38. Rubin BS. Bisphenol A: an endocrine disruptor with widespread exposure and multiple effects. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2011;127(1):27-34.
39. Laurentino S, Pinto P, Correia S, Cavaco JE, Canário AVM, S S. Structural variants of sex steroid hormone receptors in the testis: from molecular biology to physiological roles. *OA Biotechnology*. 2012 1(2):4.
40. Schug TT, Janesick A, Blumberg B, Heindel JJ. Endocrine disrupting chemicals and disease susceptibility. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2011;127(3):204-15.
41. Kelly MJ, Lagrange AH, Wagner EJ, Rønnekleiv OK. Rapid effects of estrogen to modulate G protein-coupled receptors via activation of protein kinase A and protein kinase C pathways. *Steroids*. 1999;64(1):64-75.
42. Prossnitz ER, Maggiolini M. Mechanisms of estrogen signaling and gene expression via GPR30. *Molecular and cellular endocrinology*. 2009;308(1):32-8.
43. NILSSON S, MAKELA S, TREUTER E, TUJAGUE M, THOMSEN J, ANDERSSON G, et al. Mechanisms of Estrogen Action. *PHYSIOLOGICAL REVIEWS*. 2001;81(4):1535-65.

44. Hwang H-M, Park E-K, Young TM, Hammock BD. Occurrence of endocrine-disrupting chemicals in indoor dust. *Science of the total environment*. 2008;404(1):26-35.
45. Vandenberg LN, Maffini MV, Sonnenschein C, Rubin BS, Soto AM. Bisphenol-A and the great divide: a review of controversies in the field of endocrine disruption. *Endocrine Reviews*. 2009;30(1):75-95.
46. Doerge DR, Twaddle NC, Woodling KA, Fisher JW. Pharmacokinetics of bisphenol A in neonatal and adult rhesus monkeys. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2010;248(1):1-11.
47. Jasarevic E, Williams SA, Vandas GM, Ellersieck MR, Liao C, Kannan K, et al. Sex and dose-dependent effects of developmental exposure to bisphenol A on anxiety and spatial learning in deer mice (*Peromyscus maniculatus bairdii*) offspring. *Horm Behav*. 2013;63(1):180-9.
48. Gould JC, Leonard LS, Maness SC, Wagner BL, Conner K, Zacharewski T, et al. Bisphenol A interacts with the estrogen receptor in a distinct manner from estradiol. *Molecular and cellular endocrinology*. 1998;142(1):203-14.
49. Kuiper GG, Lemmen JG, Carlsson B, Corton JC, Safe SH, van der Saag PT, et al. Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor β . *Endocrinology*. 1998;139(10):4252-63.
50. Welshons WV, Nagel SC, vom Saal FS. Large effects from small exposures. III. Endocrine mechanisms mediating effects of bisphenol A at levels of human exposure. *Endocrinology*. 2006;147(6):s56-s69.
51. Volkel W, Colnot T, Csanady GA, Filser JG, Dekant W. Metabolism and kinetics of bisphenol a in humans at low doses following oral administration. *Chem Res Toxicol*. 2002;15(10):1281-7.
52. Sultan C, Balaguer P, Terouanne B, Georget V, Paris F, Jeandel C, et al. Environmental xenoestrogens, antiandrogens and disorders of male sexual differentiation. *Molecular and cellular endocrinology*. 2001;178(1):99-105.
53. Bouskine A, Nebout M, Brücker-Davis F, Benahmed M, Fenichel P. Low doses of bisphenol A promote human seminoma cell proliferation by activating PKA and

PKG via a membrane G-protein-coupled estrogen receptor. *Environmental health perspectives*. 2009;117(7):1053-8.

54. Newby JA, Vyvyan Howard C. Environmental influences in cancer aetiology. *Journal of Nutritional and Environmental Medicine*. 2005;15(2-3):56-114.

55. Hong H, Yang L, Stallcup MR. Hormone-independent transcriptional activation and coactivator binding by novel orphan nuclear receptor ERR3. *Journal of Biological Chemistry*. 1999;274(32):22618-26.

56. Okada H, Tokunaga T, Liu X, Takayanagi S, Matsushima A, Shimohigashi Y. Direct evidence revealing structural elements essential for the high binding ability of bisphenol A to human estrogen-related receptor- γ . *Environmental health perspectives*. 2008:32-8.

57. Song H, Zhang T, Yang P, Li M, Yang Y, Wang Y, et al. Low doses of bisphenol A stimulate the proliferation of breast cancer cells via ERK1/2/ERR γ signals. *Toxicology in Vitro*. 2015;30(1):521-8.

58. Moriyama K, Tagami T, Akamizu T, Usui T, Saijo M, Kanamoto N, et al. Thyroid hormone action is disrupted by bisphenol A as an antagonist. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2002;87(11):5185-90.

59. Prasanth G, Divya L, Sadasivan C. Bisphenol-A can bind to human glucocorticoid receptor as an agonist: an in silico study. *Journal of applied toxicology*. 2010;30(8):769-74.

60. Boucher J, Boudreau A, Atlas E. Bisphenol A induces differentiation of human preadipocytes in the absence of glucocorticoid and is inhibited by an estrogen-receptor antagonist. *Nutrition & diabetes*. 2014;4(1):e102.

61. Lu NZ, Wardell SE, Burnstein KL, Defranco D, Fuller PJ, Giguere V, et al. International Union of Pharmacology. LXV. The pharmacology and classification of the nuclear receptor superfamily: glucocorticoid, mineralocorticoid, progesterone, and androgen receptors. *Pharmacological reviews*. 2006;58(4):782-97.

62. Sun H, Xu L-C, Chen J-F, Song L, Wang X-R. Effect of bisphenol A, tetrachlorobisphenol A and pentachlorophenol on the transcriptional activities of

androgen receptor-mediated reporter gene. *Food and Chemical Toxicology*. 2006;44(11):1916-21.

63. Qiu L-L, Wang X, Zhang X-h, Zhang Z, Gu J, Liu L, et al. Decreased androgen receptor expression may contribute to spermatogenesis failure in rats exposed to low concentration of bisphenol A. *Toxicology Letters*. 2013;219(2):116-24.

64. Phiel KL, Henderson RA, Adelman SJ, Elloso MM. Differential estrogen receptor gene expression in human peripheral blood mononuclear cell populations. *Immunology letters*. 2005;97(1):107-13.

65. Korn-Lubetzki I, Kahana E, Cooper G, Abramsky O. Activity of multiple sclerosis during pregnancy and puerperium. *Annals of neurology*. 1984;16(2):229-31.

66. Kim JY, Jeong HG. Down-regulation of inducible nitric oxide synthase and tumor necrosis factor-alpha expression by bisphenol A via nuclear factor-kappaB inactivation in macrophages. *Cancer letters*. 2003;196(1):69-76.

67. Frericks M, Meissner M, Esser C. Microarray analysis of the AHR system: tissue-specific flexibility in signal and target genes. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2007;220(3):320-32.

68. Bonefeld-Jorgensen EC, Long M, Hofmeister MV, Vinggaard AM. Endocrine-disrupting potential of bisphenol A, bisphenol A dimethacrylate, 4-n-nonylphenol, and 4-n-octylphenol in vitro: new data and a brief review. *Environ Health Perspect*. 2007;115 Suppl 1:69-76.

69. Qin XY, Zaha H, Nagano R, Yoshinaga J, Yonemoto J, Sone H. Xenoestrogens down-regulate aryl-hydrocarbon receptor nuclear translocator 2 mRNA expression in human breast cancer cells via an estrogen receptor alpha-dependent mechanism. *Toxicol Lett*. 2011;206(2):152-7.

70. Rogers JA, Metz L, Yong VW. Review: Endocrine disrupting chemicals and immune responses: a focus on bisphenol-A and its potential mechanisms. *Mol Immunol*. 2013;53(4):421-30.

71. Feng S, Jacobsen SE, Reik W. Epigenetic reprogramming in plant and animal development. *Science*. 2010;330(6004):622-7.

72. Kundakovic M, Champagne FA. Epigenetic perspective on the developmental effects of bisphenol A. *Brain, behavior, and immunity*. 2011;25(6):1084-93.

73. Sakamoto H, Yokota H, Kibe R, Sayama Y, Yuasa A. Excretion of bisphenol A-glucuronide into the small intestine and deconjugation in the cecum of the rat. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*. 2002;1573(2):171-6.
74. Pottenger LH, Domoradzki JY, Markham DA, Hansen SC, Cagen SZ, Waechter JM, Jr. The relative bioavailability and metabolism of bisphenol A in rats is dependent upon the route of administration. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*. 2000;54(1):3-18.
75. Tominaga T, Negishi T, Hirooka H, Miyachi A, Inoue A, Hayasaka I, et al. Toxicokinetics of bisphenol A in rats, monkeys and chimpanzees by the LC-MS/MS method. *Toxicology*. 2006;226(2-3):208-17.
76. Fisher JW, Twaddle NC, Vanlandingham M, Doerge DR. Pharmacokinetic modeling: prediction and evaluation of route dependent dosimetry of bisphenol A in monkeys with extrapolation to humans. *Toxicology and applied pharmacology*. 2011;257(1):122-36.
77. Yang X, Doerge DR, Teeguarden JG, Fisher JW. Development of a physiologically based pharmacokinetic model for assessment of human exposure to bisphenol A. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2015;289(3):442-56.
78. Morrissey RE, George JD, Price CJ, Tyl RW, Marr MC, Kimmel CA. The developmental toxicity of bisphenol A in rats and mice. *Toxicological Sciences*. 1987;8(4):571-82.
79. Khurana S, Ranmal S, Ben-Jonathan N. Exposure of newborn male and female rats to environmental estrogens: delayed and sustained hyperprolactinemia and alterations in estrogen receptor expression. *Endocrinology*. 2000;141(12):4512-7.
80. Brisken C. Endocrine disruptors and breast cancer. *CHIMIA International Journal for Chemistry*. 2008;62(5):406-9.
81. Smith CC, Taylor HS. Xenoestrogen exposure imprints expression of genes (Hoxa10) required for normal uterine development. *The FASEB Journal*. 2007;21(1):239-46.
82. Howdeshell KL, Hotchkiss AK, Thayer KA, Vandenberg JG, vom Saal FS. Environmental toxins: Exposure to bisphenol A advances puberty. *Nature*. 1999;401(6755):763-4.

83. Nagel SC, vom Saal FS, Thayer KA, Dhar MG, Boechler M, Welshons WV. Relative binding affinity-serum modified access (RBA-SMA) assay predicts the relative in vivo bioactivity of the xenoestrogens bisphenol A and octylphenol. *Environ Health Perspect.* 1997;105(1):70-6.
84. Edginton AN, Ritter L. Predicting plasma concentrations of bisphenol A in children younger than 2 years of age after typical feeding schedules, using a physiologically based toxicokinetic model. *Environmental health perspectives.* 2009;117(4):645.
85. Nachman RM, Fox SD, Golden WC, Sibinga E, Veenstra TD, Groopman JD, et al. Urinary Free Bisphenol A and Bisphenol A-Glucuronide Concentrations in Newborns. *The Journal of pediatrics.* 2013.
86. Richter CA, Birnbaum LS, Farabollini F, Newbold RR, Rubin BS, Talsness CE, et al. In vivo effects of bisphenol A in laboratory rodent studies. *Reproductive Toxicology.* 2007;24(2):199-224.
87. Ünüvar T, Büyükgebiz A. Fetal and neonatal endocrine disruptors. *Journal of clinical research in pediatric endocrinology.* 2012;4(2):51.
88. Guida M, Troisi J, Ciccone C, Granozio G, Cosimato C, Sardo ADS, et al. Bisphenol A and congenital developmental defects in humans. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis.* 2015;774:33-9.
89. Machtinger R, Combelles CM, Missmer SA, Correia KF, Williams P, Hauser R, et al. Bisphenol-A and human oocyte maturation in vitro. *Human reproduction.* 2013;28(10):2735-45.
90. EFSA (European Food Safety Authority). Scientific Opinion on the risks to public health related to the presence of bisphenol A (BPA) in foodstuffs. 2015;13(1):3978.
91. EC (European Commission). Commission directive of 1 March 2004 amending directive 2002/72/EC relating to plastic materials and articles intended to come into contact with foodstuffs. *Off J Eur Commun.* 2004: L71, 8–21.
92. Cao XL, Dufresne G, Belisle S, Clement G, Falicki M, Beraldin F, et al. Levels of bisphenol A in canned liquid infant formula products in Canada and dietary intake estimates. *J Agric Food Chem.* 2008;56(17):7919-24.

93. Cao XL, Corriveau J, Popovic S. Levels of bisphenol A in canned soft drink products in Canadian markets. *J Agric Food Chem*. 2009;57(4):1307-11.
94. Goodson A, Summerfield W, Cooper I. Survey of bisphenol A and bisphenol F in canned foods. *Food Addit Contam*. 2002;19(8):796-802.
95. Sungur Ş, Koroğlu M, Özkan A. Determination of bisphenol a migrating from canned food and beverages in markets. *Food Chemistry*. 2014;142:87-91.
96. Howdeshell KL, Peterman PH, Judy BM, Taylor JA, Orazio CE, Ruhlen RL, et al. Bisphenol A is released from used polycarbonate animal cages into water at room temperature. *Environmental health perspectives*. 2003;111(9):1180.
97. Le HH, Carlson EM, Chua JP, Belcher SM. Bisphenol A is released from polycarbonate drinking bottles and mimics the neurotoxic actions of estrogen in developing cerebellar neurons. *Toxicology Letters*. 2008;176(2):149-56.
98. Kang J-H, Kondo F, Katayama Y. Human exposure to bisphenol A. *Toxicology*. 2006;226(2):79-89.
99. Vandenberg LN, Chahoud I, Heindel JJ, Padmanabhan V, Paumgartten FJ, Schoenfelder G. Urinary, circulating, and tissue biomonitoring studies indicate widespread exposure to bisphenol A. *Environ Health Perspect*. 2010;118(8):1055-70.
100. Ye X, Kuklennyik Z, Needham LL, Calafat AM. Measuring environmental phenols and chlorinated organic chemicals in breast milk using automated on-line column-switching-high performance liquid chromatography-isotope dilution tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*. 2006;831(1-2):110-5.
101. Kuruto-Niwa R, Tateoka Y, Usuki Y, Nozawa R. Measurement of bisphenol A concentrations in human colostrum. *Chemosphere*. 2007;66(6):1160-4.
102. Calafat A. Background paper on BPA biomonitoring and biomarker studies. World Health Organization. 2011.
103. Zhang Z, Alomirah H, Cho HS, Li YF, Liao C, Minh TB, et al. Urinary bisphenol A concentrations and their implications for human exposure in several Asian countries. *Environ Sci Technol*. 2011;45(16):7044-50.
104. He Y, Miao M, Herrinton LJ, Wu C, Yuan W, Zhou Z, et al. Bisphenol A levels in blood and urine in a Chinese population and the personal factors affecting the levels. *Environ Res*. 2009;109(5):629-33.

105. Mao L, Sun C, Zhang H, Li Y, Wu D. Determination of environmental estrogens in human urine by high performance liquid chromatography after fluorescent derivatization with p-nitrobenzoyl chloride. *Analytica chimica acta*. 2004;522(2):241-6.
106. Carwile JL, Ye X, Zhou X, Calafat AM, Michels KB. Canned soup consumption and urinary bisphenol A: a randomized crossover trial. *Jama*. 2011;306(20):2218-20.
107. Carwile JL, Luu HT, Bassett LS, Driscoll DA, Yuan C, Chang JY, et al. Polycarbonate bottle use and urinary bisphenol A concentrations. *Environ Health Perspect*. 2009;117(9):1368-72.
108. Poole CF. New trends in solid-phase extraction. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2003;22(6):362-73.
109. Żwir-Ferenc A, Biziuk M. Solid phase extraction technique—trends, opportunities and applications. *Polish Journal of Environmental Studies*. 2006;15(5):677-90.
110. Wen Y, Li J, Yang F, Zhang W, Li W, Liao C, et al. Salting-out assisted liquid-liquid extraction with the aid of experimental design for determination of benzimidazole fungicides in high salinity samples by high-performance liquid chromatography. *Talanta*. 2013;106:119-26.
111. Bélanger JM, Paré JJ, Sigouin M. High performance liquid chromatography (HPLC): Principles and applications. *Techniques and Instrumentation in Analytical Chemistry*. 1997;18:37-59.
112. Tzatzarakis M, Karzi V, Vakonaki E, Barbounis E, Tsitsimpikou C, Vardavas A, et al. Bisphenol A in beverages and canned foods of the Greek market. *Toxicology Letters*. 2015;238(2):S81.
113. Geens T, Apelbaum TZ, Goeyens L, Neels H, Covaci A. Intake of bisphenol A from canned beverages and foods on the Belgian market. *Food additives & contaminants Part A, Chemistry, analysis, control, exposure & risk assessment*. 2010;27(11):1627-37.
114. Yanes EG, Lovett DP. High-throughput bioanalytical method for analysis of synthetic cannabinoid metabolites in urine using salting-out sample preparation and LC-MS/MS. *Journal of Chromatography B*. 2012;909:42-50.



ภาคผนวก ก

การเตรียมสารละลายที่ใช้ในการทดลอง

1. Synthetic urine

ในการเตรียม synthetic urine 500 ml ให้ผสมสารเคมีตามลำดับ ดังนี้

1. Deionized water 250 ml
2. Potassium Chloride 1.9 g
3. Sodium Chloride 4.25 g
4. Urea 12.25 g
5. Citric acid 0.515 g
6. Ascorbic acid 0.17 g
7. Potassium Phosphate 0.59 g
8. Creatinine 0.7 g
9. Sodium Hydroxide 0.32 g
10. Sodium Bicarbonate 0.235 g
11. Sulfuric Acid 0.28 ml

เมื่อผสมสารเคมีข้างต้นแล้ว ให้เติม Deionized water จนครบ 500 ml ใน volumetric flask ปริมาตร 500 ml ผสมให้เข้ากัน

2. 1 mM ammonium acetate

ชั่ง ammonium acetate 77 mg ละลายใน deionized water 1000 mL

3. 10 M ammonium acetate

ชั่ง ammonium acetate 7.7 g ละลายใน deionized water 10 mL

4. 10% MeOH

ตวง MeOH 10 mL ผสมกับ Deionized water 90 mL

5. 30% ACN

ตวง ACN 300 mL ผสมกับ Deionized water 700 mL

ภาคผนวก ข
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย

สัญลักษณ์ คำย่อ และคำอธิบาย

คำย่อ	อธิบาย
BPA	Bisphenol A
BPA-G	Bisphenol A β -D glucuronide
$^{13}\text{C}_{12}$ -BPAG	Bisphenol A $^{13}\text{C}_{12}$ β -D glucuronide
LC-MS/MS	Liquid chromatography-tandem mass spectrometry
GC-MS	Gas chromatography- mass spectrometry
HPLC	High-performance liquid chromatography
SPE	Solid phase extraction
ACN	Acetonitrile
n/d	Non-detectable
LLOD	Lower limit of detection
LLOQ	Lower limit of quantification
m/z	Mass to charge ratio
ESI	Electrospray ionization
BW	Body weight
PVC	Polyvinyl chloride
PET	Polyethylene terephthalate
SALLE	Salting-out assisted liquid/liquid extraction
μL	Microliter
mL	Milliliter

ng/mL	Nanogram per milliliter
IS	Internal standard
MRM	Multiple reaction monitoring
DP	Declustering potential
EP	Entrance potential
CE	Collision energy
CXP	Collision cell exit potential
TIC	Total ion chromatogram
TDI	Tolerable daily intake
EFSA	European Food Safety Authority
EU	The European Union



ภาคผนวก ค
เอกสารจริยธรรมในมนุษย์



บันทึกข้อความ

ส่วนงาน คณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในคน กลุ่มสหสถาบัน ชุดที่ 1 โทร.0-2218-8147
ที่ จว 519/58 วันที่ 7 กรกฎาคม 2558
เรื่อง แจ้งผลผ่านการพิจารณาจริยธรรมการวิจัย

เรียน คณบดีคณะสหเวชศาสตร์

สิ่งที่ส่งมาด้วย เอกสารแจ้งผ่านการรับรองผลการพิจารณา

ตามที่นิติ/บุคลากรในสังกัดของท่านได้เสนอโครงการวิจัยเพื่อขอรับการพิจารณาจริยธรรมการวิจัย กลุ่มสหสถาบัน ชุดที่ 1 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย นั้น ในการนี้ กรรมการผู้ทบทวนหลักได้เห็นสมควรให้ผ่านการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยได้ ดังนี้

โครงการวิจัยที่ 095/58 เรื่อง การหาปริมาณสารบิสฟีนอลเอในปัสสาวะของผู้บริโภคน้ำผลไม้กระป๋องด้วยเทคนิคลิควิด โครมาโทกราฟีแทนเค็มแมสสเปกโตรเมทรี (DETERMINATION OF URINE BISPHENOL A IN CANNED FRUIT JUICE CONSUMER USING LIQUID CHROMATOGRAPHY TANDEM MASS SPECTROMETRY) ของ นางสาวขวัญชนก สารีกิจ โดยมีข้อสังเกต ดังนี้

หน้า 20 การวิเคราะห์ผล ควรเขียนโปรแกรมที่ใช้ให้ชัดเจน เป็นต้นว่า โปรแกรม SPSS Version... โดยใช้สถิติ ANOVA

จึงเรียนมาเพื่อโปรดทราบ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นันทิร ชัยชนะวงศาโรจน์)

กรรมการและเลขานุการ

คณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในคน
กลุ่มสหสถาบัน ชุดที่ 1 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เรียน คณบดี
เพื่อทราบ - เห็นการวิจัย
นี้ขอแจ้งดำเนินการต่อไป

10 กค 58

10 กค 58

คณะสหเวชศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
เลขที่ 5699/58
วันที่ 10 กค 58 เวลา 14.10

คณะสหเวชศาสตร์
งานบริการวิชาการและวิจัย
เลขที่รับ 166/58
วันที่ 13 กค 58 เวลา 10.30

AF 01-12



คณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในคน กลุ่มสหสถาบัน ชุดที่ 1 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
254 อาคารจามจุรี 1 ชั้น 2 ถนนพญาไท เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330
โทรศัพท์/โทรสาร: 0-2218-3202 E-mail: eccu@chula.ac.th

COA No. 137/2558

ใบรับรองโครงการวิจัย

โครงการวิจัยที่ 095/58 : การหาปริมาณสารบิสฟีนอลเอในปัสสาวะของผู้บริโภคน้ำผลไม้กระป๋อง
ด้วยเทคนิคลิควิด โครมาโทกราฟีแทนเดิมแมสสเปกโทรเมทรี

ผู้วิจัยหลัก : นางสาวขวัญชนก สาริกกิจ

หน่วยงาน : คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในคน กลุ่มสหสถาบัน ชุดที่ 1 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ได้พิจารณา โดยใช้หลัก ของ The International Conference on Harmonization – Good Clinical Practice
(ICH-GCP) อนุมัติให้ดำเนินการศึกษาวิจัยเรื่องดังกล่าวได้

ลงนาม.....
(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ปริศา ทิศนประดิษฐ์)
ประธาน

ลงนาม.....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นันทรี ชัยชนะวงศาโรจน์)
กรรมการและเลขานุการ

วันที่รับรอง : 3 กรกฎาคม 2558

วันหมดอายุ : 2 กรกฎาคม 2559

เอกสารที่คณะกรรมการรับรอง

- 1) โครงการวิจัย
- 2) ข้อมูลสำหรับกลุ่มประชากรหรือผู้มีส่วนร่วมในการวิจัยและใบยินยอมของกลุ่มประชากรหรือผู้มีส่วนร่วมในการวิจัย
- 3) ผู้วิจัย เลขที่โครงการวิจัย..... 095/58
- 4) แบบสอบถาม วันที่รับรอง..... - 3 ก.ค. 2558
- เงื่อนไข วันหมดอายุ..... - 2 ก.ค. 2559

เงื่อนไข

1. ข้าพเจ้ารับทราบว่าเป็นการคิดจริยธรรม หากดำเนินการเก็บข้อมูลการวิจัยก่อนได้รับการอนุมัติจากคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยฯ
2. หากใบรับรองโครงการวิจัยหมดอายุ การดำเนินการวิจัยต้องยุติ เมื่อต้องการต่ออายุต้องขออนุมัติใหม่ล่วงหน้าไม่ต่ำกว่า 1 เดือน หรือส่งรายงานความก้าวหน้าการวิจัย
3. ต้องดำเนินการวิจัยตามที่ระบุไว้ใน โครงการวิจัยอย่างเคร่งครัด
4. ใช้เอกสารข้อมูลสำหรับกลุ่มประชากรหรือผู้มีส่วนร่วมในการวิจัย ใบยินยอมของกลุ่มประชากรหรือผู้มีส่วนร่วมในการวิจัย และเอกสารเชิญเข้าร่วมวิจัย (ถ้ามี) เฉพาะที่ประทับตราคณะกรรมการเท่านั้น
5. หากเกิดเหตุการณ์ไม่พึงประสงค์ร้ายแรงในสถานที่เก็บข้อมูลที่ขออนุมัติจากคณะกรรมการ ต้องรายงานคณะกรรมการภายใน 5 วันทำการ
6. หากมีการเปลี่ยนแปลงการดำเนินการวิจัย ให้ส่งคณะกรรมการพิจารณารับรองก่อนดำเนินการ
7. โครงการวิจัยไม่เกิน 1 ปี ส่งแบบรายงานสิ้นสุดโครงการวิจัย (AF 03-12) และบทคัดย่อผลการวิจัยภายใน 30 วัน เมื่อโครงการวิจัยเสร็จสิ้น สำหรับโครงการวิจัยที่เป็นวิทยานิพนธ์ให้ส่งบทคัดย่อผลการวิจัย ภายใน 30 วัน เมื่อโครงการวิจัยเสร็จสิ้น

ข้อมูลสำหรับกลุ่มประชากรหรือผู้มีส่วนร่วมในการวิจัย

1. ชื่อโครงการวิจัย การหาปริมาณสารบิสฟีนอลเอในปัสสาวะของผู้บริโภคน้ำผลไม้กระป๋องด้วยเทคนิค
ลิควิด โครมาโทกราฟีแทนเดิมแมสสเปกโทรเมทรี
2. ชื่อผู้วิจัย นางสาววิญญานก สารกิจ ตำแหน่ง นักศึกษาระดับปริญญาโทในหลักสูตรชีวเคมีคลินิกและอนุ
ทางการแพทย์ ภาควิชาเคมีคลินิก คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3. สถานที่ติดต่อผู้วิจัย

(ที่ทำงาน) ภาควิชาเคมีคลินิก คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

154 อาคารจุฬาพัฒน์ 1 ถนนพระราม 1 แขวงวังใหม่ เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330

(ที่บ้าน) 151/303 ถนนบรมราชชนนี แขวงอรุณอมรินทร์ เขตบางกอกน้อย กทม

รหัสไปรษณีย์ 10700

โทรศัพท์ (ที่ทำงาน)

E-mail : may-ike@hotmail.com



เลขที่โครงการวิจัย 095/58
วันที่รับรอง - 3 ก.ค. 2558
วันหมดอายุ - 2 ก.ค. 2559
โทรศัพท์มือถือ 089-9963799

ขอเรียนเชิญท่านเข้าร่วมในการวิจัย ก่อนที่ท่านจะตัดสินใจเข้าร่วมในการวิจัย มีความจำเป็นที่ท่านควรทำความเข้าใจเกี่ยวกับงานวิจัยนี้ กรุณาใช้เวลาในการอ่านข้อมูลต่อไปนี้อย่างละเอียดรอบคอบ และสอบถามข้อมูลเพิ่มเติมหรือข้อมูลที่ไม่ชัดเจนได้ตลอดเวลา รายละเอียดโครงการวิจัยมีดังต่อไปนี้

Bisphenol A (BPA) เป็นสารเคมีที่พบได้ในชีวิตประจำวัน เช่น อาหารหรือเครื่องดื่มบรรจุกระป๋องบางชนิด ขวดพลาสติกบางประเภท ธนบัตร เป็นต้น ผลจากการได้รับสาร BPA ในปริมาณที่สูงจะส่งผลต่อระบบฮอร์โมนของร่างกาย ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อระบบสืบพันธุ์ และยังมีผลต่อการเกิดโรคมะเร็ง โรคอ้วน โรคเบาหวานชนิดที่ 2 เป็นต้น จากการที่ BPA สามารถปนเปื้อนสู่อาหารหรือเครื่องดื่มต่างๆ ที่ผู้คนบริโภคในแต่ละวันได้ โครงการวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ ดังนี้

1. เพื่อทดสอบหาปริมาณ BPA ในน้ำผลไม้กระป๋องยี่ห้อต่างๆ กัน 10 ยี่ห้อ และหาปริมาณ BPA ในปัสสาวะของอาสาสมัครที่บริโภคน้ำผลไม้กระป๋องที่มีปริมาณ BPA สูงที่สุดและต่ำที่สุด เพื่อประเมินการได้รับสาร BPA จากปัสสาวะ ก่อนและหลังจากการบริโภคน้ำผลไม้กระป๋องดังกล่าว แล้วทำการเปรียบเทียบปริมาณ BPA ในปัสสาวะ ระหว่างกลุ่มอาสาสมัครที่บริโภคน้ำผลไม้กระป๋องยี่ห้อที่มีปริมาณ BPA สูงที่สุด เปรียบเทียบกับปริมาณ BPA ในปัสสาวะของกลุ่มที่บริโภคน้ำผลไม้กระป๋องยี่ห้อที่มีปริมาณ BPA ต่ำที่สุด

2. กลุ่มตัวอย่าง ในการศึกษานี้ เป็นอาสาสมัครที่คัดเลือกจากนิสิตและเจ้าหน้าที่ คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่มีอายุระหว่าง 20-25 ปี จำนวน 20 คน โดยการเดินเข้าไปหา แล้วแจกแบบสอบถาม การสำรวจความเสี่ยงในการได้รับสาร BPA เลือกเฉพาะผู้ที่มีความเสี่ยงต่ำที่มีคะแนนการตอบแบบสอบถามที่ได้คะแนน 7-15 คะแนน โดยเกณฑ์การให้คะแนนอยู่ในแบบสอบถาม และทางผู้วิจัยจะคัดเลือกเฉพาะผู้ที่มีการทำงานระดับและได้เป็นปกติ โดยใช้เลือดปริมาณ 5 ซีซี (1 ซ็อนชา) การทำงานของตับ จะดูจากค่า ALT ในเลือด (น้อยกว่า 40 U/L) สำหรับการทำงานของไต จะดูจากค่า creatinine ใน

* คำอธิบาย หมายถึง ค่าอธิบาย ไม่ต้องระบุในเอกสาร

AF 04-07

เลือด (0.6-1.3 mg/dL) และใช้ urinary test strip เพื่อตรวจระดับสารที่ขับออกมาทางปัสสาวะ เช่น กลูโคส, โปรตีน เป็นต้น ในผู้ที่มีการทำงานของตับและไตเป็นปกติ จะไม่มีผลต่อกระบวนการเมแทบอลิซึมและขับสาร BPA ออกจากร่างกาย หลังจากนั้นแบ่งผู้ร่วมโครงการวิจัยเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มละ 10 คน โดยที่แต่ละกลุ่มมีผู้หญิงและผู้ชายจำนวนเท่ากัน ก่อนเริ่มทำการทดลองดื่มน้ำผลไม้กระป๋อง ให้ผู้ร่วมการทดลองเก็บปัสสาวะ โดยเก็บเป็น first morning urine อย่างน้อย 20 ซีซี (4 ซ้อนชา) เป็นเวลา 2 วัน จากนั้นให้ผู้ร่วมโครงการวิจัยบริโภคน้ำผลไม้กระป๋อง วันละ 250 mL ระหว่าง 12.00 -14.00 น. เป็นเวลา 5 วันติดต่อกัน และขอความร่วมมือจากผู้ร่วมโครงการวิจัย ให้เก็บปัสสาวะ อย่างน้อย 20 ซีซี (4 ซ้อนชา) ในช่วงเวลา 15.00 - 18.00 น. ณ คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในวันที่ 4 และ 5

เนื่องจากน้ำผลไม้กระป๋องที่นำมาใช้เพื่อศึกษา เป็นน้ำผลไม้กระป๋องที่มีจำหน่ายทั่วไปในท้องตลาดอยู่แล้ว ในกรณีที่ผู้เข้าร่วมโครงการวิจัย ดื่มน้ำผลไม้กระป๋องที่มี BPA สูง จะไม่ส่งผลกระทบต่อระบบต่างๆ ของร่างกาย เนื่องจากมีการคัดกรองผู้เข้าร่วมโครงการวิจัย ว่ามีการทำงานของตับและไตปกติ และ BPA สามารถขับออกจากร่างกายได้ ภายใน 6 ชั่วโมง

เกณฑ์การคัดเลือก

1. เพศชาย หรือหญิง อายุระหว่าง 20-25 ปี จำนวน 20 คน
2. ผู้ที่ตอบแบบสอบถามที่ได้คะแนน 7-15 คะแนน
3. สามารถช่วยเหลือตัวเองในการเก็บปัสสาวะได้
4. เป็นผู้ที่มีการทำงานของตับ และไตปกติ



อยู่ที่โครงการวิจัย..... 095/58
- 3 ก.ค. 2558
วันที่รับรอง.....
- 2 ก.ค. 2558
วันพฤหัสบดี.....

เกณฑ์ในการคัดออก

1. เก็บปัสสาวะไม่ได้ต่ำกว่าปริมาณที่กำหนด
2. ปัสสาวะที่มีสิ่งผิดปกติเจือปน หรือ พิจารณาแล้วว่าไม่สามารถนำมาตรวจวิเคราะห์ได้

4. กระบวนการวิจัย

4.1 ผู้วิจัยจะคัดเลือก กลุ่มประชากรหรือผู้มีส่วนร่วมในการวิจัย โดยการคัดกรองจากแบบสอบถาม ณ คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ผู้มีส่วนร่วมในการวิจัยจะได้รับทราบและทำความเข้าใจถึงความสำคัญของการตรวจวัดระดับของ BPA และวิธีการในการเก็บปัสสาวะและประโยชน์ที่ได้รับจากการเข้าร่วมโครงการ โดยใช้เวลาในการเก็บข้อมูลประมาณ 3-5 นาที

4.2 ผู้มีส่วนร่วมในการวิจัยยินยอมเข้าร่วมวิจัยด้วยความสมัครใจ มีสิทธิถอนตัวเมื่อใดก็ได้โดยไม่ต้องแจ้งเหตุผล ซึ่งจะไม่ผลกระทบบใดๆ ต่อผู้มีส่วนร่วมในการวิจัยทั้งสิ้น โดยผู้มีส่วนร่วมในการวิจัยยินยอมให้เก็บปัสสาวะ และเจาะเลือดจากหลอดเลือดดำ ปริมาตร 3 ซีซี (1 ซ้อนชา) เพียงครั้งเดียว สำหรับการเจาะเลือดนั้น อาจมีรอยเขียวช้ำได้บ้าง แต่ไม่มีอันตรายและงาหายได้เองใน 2-3 วัน

การเก็บปัสสาวะจะเก็บอย่างน้อย 20 ซีซี (4 ซ้อนชา) ต่อครั้ง โดยให้เก็บปัสสาวะช่วงกลาง ซึ่งผู้วิจัยจะให้อธิบายดังนี้คือ ให้ผู้เข้าร่วมวิจัยทำความสะอาดบริเวณที่ถ่ายปัสสาวะก่อน แล้วให้ปัสสาวะช่วงแรกทิ้งไปก่อน หลังจากนั้นนำกระปุกเก็บใส่ปัสสาวะมารอปัสสาวะช่วงตรงกลางให้ใส่คัดกรองที่เหลือให้ถ่ายทิ้งไป

* ตัวเอียง หมายถึง คำอธิบาย ไม่ต้องระบุในเอกสาร

AF 04-07

4.3 ผู้วิจัยจะส่งผลการตรวจปริมาณ BPA ในปัสสาวะให้อาสาสมัครทราบ โดยในรายที่มีผลการตรวจวิเคราะห์ผิดปกติ จะมีข้อมูลคำแนะนำเป็นรายบุคคล ซึ่งจะอธิบายเกี่ยวกับผลการทดสอบที่ผิดปกติ ปัจจัยที่อาจส่งผลให้ผลการตรวจวิเคราะห์ผิดปกติ เช่น รับประทานอาหารจากบรรจุภัณฑ์ที่เป็นพลาสติก หรือผลิตภัณฑ์อาหารกระป๋องบ่อๆ หรือสัมผัสกับบรรจุภัณฑ์ที่มี BPA เป็นส่วนผสม ทำให้พบระดับ BPA ที่สูงในปัสสาวะ เป็นต้น จากนั้นจะให้คำแนะนำอาสาสมัครเพิ่มเติม เกี่ยวกับปัจจัยต่างๆที่ทำให้ระดับ BPA สูง เพื่อเป็นแนวทางให้อาสาสมัครตัดสินใจที่จะลดหรือหลีกเลี่ยงความเสี่ยงดังกล่าว

4.4 เมื่อสิ้นสุดการทดลอง ตัวอย่างปัสสาวะที่เก็บทั้งหมดจะถูกทำลายทิ้งทันทีโดยไม่นำกลับไปใช้ในงานวิจัยอื่น

5. ในการวิจัยครั้งนี้ไม่มีการจ่ายค่าตอบแทนผู้มีส่วนร่วมในการวิจัย

6. ผลงานวิจัยจะนำเสนอเฉพาะผลการทดลองที่ผ่านการวิเคราะห์แล้ว โดยที่ข้อมูลส่วนตัวและข้อมูลอื่น ๆ ของท่านจะถูกเก็บไว้เป็นความลับเฉพาะ หากมีการเสนอผลการวิจัยจะเสนอเป็นภาพรวม ข้อมูลใดที่สามารถระบุถึงตัวท่านได้จะไม่ปรากฏในรายงาน

7. ผลงานวิจัยจะถูกส่งไปให้ผู้มีส่วนร่วมในการวิจัยได้รับทราบ หากผู้มีส่วนร่วมในการวิจัยต้องการรับทราบผลงานวิจัย โดยจะส่งผลการทดลองที่ผ่านการวิเคราะห์เทียบกับวิธีมาตรฐานแล้วเท่านั้น

8. ผลงานวิจัยนี้ทำให้เกิดองค์ความรู้เพื่อเป็นแนวทางในการลดหรือหลีกเลี่ยงการได้รับสาร BPA ที่จะทำให้เกิดความเสี่ยงต่อการเป็นโรคต่างๆ เช่น โรคเบาหวาน โรคอ้วน โรคเบาหวานชนิดที่ 2 เป็นต้น

9. หากท่านมีข้อสงสัยให้สอบถามเพิ่มเติมได้โดยสามารถติดต่อผู้วิจัยได้ตลอดเวลา และหากผู้วิจัยมีข้อมูลเพิ่มเติมที่เป็นประโยชน์หรือโทษเกี่ยวกับการวิจัย ผู้วิจัยจะแจ้งให้ท่านทราบอย่างรวดเร็ว

หากท่านไม่ได้รับการปฏิบัติตามข้อมูลดังกล่าวสามารถร้องเรียนได้ที่คณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในคน กลุ่มสหสถาบัน ชุดที่ 1 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ชั้น 4 อาคารเลขที่ 2 ซอยจุฬาลงกรณ์ 62 ถนนพญาไท เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330

โทรศัพท์ 0-2218-8147 โทรสาร 0-2218-8147 E-mail: eccu@chula.ac.th



เลขที่โครงการวิจัย..... 095/58
- 3 ก.ค. 2558
วันที่รับรอง.....
- 2 ก.ค. 2558
วันหมดอายุ.....

AF 05-07

หนังสือแสดงความยินยอมเข้าร่วมการวิจัย

ทำที่ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.....

เลขที่ ประชากรตัวอย่างหรือผู้มีส่วนร่วมในการวิจัย.....

ข้าพเจ้า ซึ่งได้ลงนามท้ายหนังสือนี้ ขอแสดงความยินยอมเข้าร่วมโครงการวิจัย

ชื่อโครงการวิจัย การหาปริมาณสารบิสฟีนอลเอในปัสสาวะของผู้บริโภคน้ำผลไม้กระป๋อง ด้วยเทคนิคคลิควิดโครมาโทกราฟีแทนแอสตอปโครเมตรี

ชื่อผู้วิจัย นางสาววิญชนก สารีกิจ

ที่อยู่ติดต่อ 154 อาคารจุฬาพัฒน์ 1 ถนนพระราม 1 แขวงวังใหม่ เขตปทุมวัน กทม. 10330 โทรศัพท์ 089-9963799

ข้าพเจ้า ได้รับทราบรายละเอียดเกี่ยวกับที่มาและวัตถุประสงค์ในการทำวิจัย รายละเอียดขั้นตอนต่างๆ ที่จะต้องปฏิบัติหรือได้รับการปฏิบัติ ความเสี่ยงอันตราย และประโยชน์ที่จะเกิดขึ้นจากการวิจัยเรื่องนี้ โดยได้อ่านรายละเอียดในเอกสารชี้แจงผู้เข้าร่วมการวิจัยโดยตลอด และได้รับคำอธิบายจากผู้วิจัย จนเข้าใจเป็นอย่างดีแล้ว

ข้าพเจ้าจึงสมัครใจเข้าร่วมในโครงการวิจัยนี้ ตามที่ระบุไว้ในเอกสารชี้แจงผู้เข้าร่วมการวิจัย โดยข้าพเจ้ายินยอมเก็บปัสสาวะแบบสุ่มโดยใช้ปัสสาวะช่วงกลาง (ให้ปัสสาวะช่วงแรกทิ้งไปก่อนค่อยเก็บ) จำนวน 4 ครั้ง ซึ่งก่อนเริ่มทำการทดลองจะให้น้ำผลไม้กระป๋อง ให้เก็บปัสสาวะ โดยเก็บเป็น first morning urine เป็นเวลา 2 วัน และหลังจากดื่มน้ำผลไม้กระป๋องวันละ 250 mL เป็นเวลา 5 วันติดต่อกัน แล้วเก็บปัสสาวะในวันที่ 4 และวันที่ 5 อย่างน้อย 20 ซีซี (4 ซ้อนชา) เพื่อนำปัสสาวะมาตรวจวัดระดับบิสฟีนอลเอ

ข้าพเจ้ามีสิทธิถอนตัวออกจากกรวิจัยเมื่อใดก็ได้ตามความประสงค์ โดยไม่ต้องแจ้งเหตุผล ซึ่งการถอนตัวออกจากกรวิจัยนั้น จะไม่มีผลกระทบต่อในทางใดๆ ต่อข้าพเจ้าทั้งสิ้น เช่น ผลกระทบต่อการศึกษา หรือ ผลต่อการเรียน เป็นต้น

ข้าพเจ้าได้รับคำรับรองว่า ผู้วิจัยจะปฏิบัติต่อข้าพเจ้าตามข้อมูลที่ระบุไว้ในเอกสารชี้แจงผู้เข้าร่วมการวิจัย และข้อมูลใดๆ ที่เกี่ยวข้องกับข้าพเจ้า ผู้วิจัยจะเก็บรักษาเป็นความลับ โดยจะนำเสนอข้อมูลการวิจัยเป็นภาพรวมเท่านั้น ไม่มีข้อมูลใดในการรายงานที่จะนำไปสู่การระบุตัวข้าพเจ้า

หากข้าพเจ้าไม่ได้รับการปฏิบัติตรงตามที่ได้ระบุไว้ในเอกสารชี้แจงผู้เข้าร่วมการวิจัย ข้าพเจ้าสามารถร้องเรียนได้ที่ คณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในคน กลุ่มสุขภาพบัน ๒ ชุดที่ 1 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ชั้น 4 อาคารสถาบัน 2 ซอยจุฬาลงกรณ์ 62 ถนนพญาไท เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330

โทรศัพท์ 089-9963799 โทรสาร 0-2218-8147 E-mail: eccu@chula.ac.th

ข้าพเจ้าได้ลงลายมือชื่อไว้เป็นสำคัญต่อหน้าพยาน ทั้งนี้ข้าพเจ้าได้รับสำเนาเอกสารชี้แจงผู้เข้าร่วมการวิจัย และสำเนาหนังสือแสดงความยินยอมไว้แล้ว

ลงชื่อ..... ลงชื่อ.....

(.....) (.....)

ผู้วิจัยหลัก

ผู้มีส่วนร่วมในการวิจัย



เลขที่โครงการวิจัย..... ลงชื่อ.....

วันที่..... 3 ก.ค. 2558 (.....)

วันหมดอายุ..... 2 ก.ค. 2559 (.....)

วันหมดอายุ..... 1/2 (.....)

* ตัวเอียง หมายถึง คำอธิบาย ไม่ต้องระบุในเอกสาร

ปรับปรุงเมื่อ 23 พฤษภาคม 2554

เลขที่ตัวอย่างปีศาจะ.....

แบบสอบถาม เรื่อง การสำรวจความเสี่ยงในการได้รับสารBPA

กรุณาตอบแบบสอบถามตามความเป็นจริง

เพศ หญิง ชาย อายุ.....ปี
 น้ำหนัก..... กิโลกรัม ส่วนสูง.....เซนติเมตร

1. ท่านมักจะรับประทานอาหารเหล่านี้หรือไม่ ใน 1 สัปดาห์ที่ผ่านมา (ตอบได้มากกว่า 1 ข้อ)

- | | |
|---|--|
| <input type="checkbox"/> ปลากระป๋อง | <input type="checkbox"/> น้ำอัดลมกระป๋อง |
| <input type="checkbox"/> น้ำผลไม้กระป๋อง | <input type="checkbox"/> นมบรรจุกระป๋อง |
| <input type="checkbox"/> ผลไม้บรรจุกระป๋อง | <input type="checkbox"/> เครื่องดื่มแอลกอฮอล์กระป๋อง |
| <input type="checkbox"/> อาหารหรือเครื่องดื่มชนิดอื่นๆที่บรรจุกระป๋อง (โปรดระบุ)..... | |

(ให้คะแนนข้อละ 1 คะแนน)

เลขที่โครงการวิจัย..... 095/58

วันที่รับรอง..... - 3 ก.ค. 2558

วันที่หมดอายุ..... - 2 ก.ค. 2559

2. ความถี่ในการบริโภคในข้อ 1

- | | |
|---|---|
| <input type="checkbox"/> น้อยกว่า 5 ครั้ง/สัปดาห์ | <input type="checkbox"/> 5 - 10 ครั้ง/สัปดาห์ |
| <input type="checkbox"/> 10 - 15 ครั้ง/สัปดาห์ | <input type="checkbox"/> มากกว่า 15 ครั้ง/สัปดาห์ |

(น้อยกว่า 5 ครั้ง/สัปดาห์ = 1 คะแนน, 5 - 10 ครั้ง/สัปดาห์ = 2 คะแนน, 10 - 15 ครั้ง/สัปดาห์ = 3 คะแนน, มากกว่า 15 ครั้ง/สัปดาห์ = 4 คะแนน)

3. ท่านมักจะบริโภคอาหารที่บรรจุด้วยผลิตภัณฑ์เหล่านี้หรือไม่ ใน 1 สัปดาห์ที่ผ่านมา

(ตอบได้มากกว่า 1 ข้อ)

- | | |
|--|--|
| <input type="checkbox"/> ถุงพลาสติก | <input type="checkbox"/> กล่องโฟม |
| <input type="checkbox"/> กล่องพลาสติก | <input type="checkbox"/> อาหารที่ห่อด้วยฟิล์มหรืออาหาร |
| <input type="checkbox"/> ภาชนะที่มีส่วนผสมของเมลามีน | <input type="checkbox"/> กระดาษห่อ Bakery หรือ Hamburger |

(เช่น ฉาน ชาม ถ้วย ฯลฯ)

(ให้คะแนนข้อละ 1 คะแนน)

4. ความถี่ในการบริโภคในข้อ 3

- | | |
|---|---|
| <input type="checkbox"/> น้อยกว่า 5 ครั้ง/สัปดาห์ | <input type="checkbox"/> 5 - 10 ครั้ง/สัปดาห์ |
|---|---|

- 10-15 ครั้ง/สัปดาห์ มากกว่า 15 ครั้ง/สัปดาห์
(น้อยกว่า 5 ครั้ง/สัปดาห์ = 1 คะแนน, 5-10 ครั้ง/สัปดาห์ = 2 คะแนน, 10-15 ครั้ง/สัปดาห์ = 3 คะแนน, มากกว่า 15 ครั้ง/สัปดาห์ = 4 คะแนน)

5. ท่านได้สัมผัสกับสิ่งเหล่านี้หรือไม่ ใน 1 สัปดาห์ที่ผ่านมา (ตอบได้มากกว่า 1 ข้อ)

- ไบโอสตรีจรับเงิน (ที่มีลักษณะเป็นกระดาษมัน เช่น ไบโอสตรีจ seven-eleven)
 ตัวชงกาแฟผง
 ตัวเครื่องบิน
 กระดาษหนังสือพิมพ์
(ให้คะแนนข้อละ 1 คะแนน)



เลขที่โครงการวิจัย..... 095/58
วันที่รับรอง..... 3 ก.ค. 2558
วันหมดอายุ..... 2 ก.ค. 2559

6. ความถี่ในการสัมผัสในข้อ 5

- น้อยกว่า 5 ครั้ง/สัปดาห์ 5-10 ครั้ง/สัปดาห์
 10-15 ครั้ง/สัปดาห์ มากกว่า 15 ครั้ง/สัปดาห์

(น้อยกว่า 5 ครั้ง/สัปดาห์ = 1 คะแนน, 5-10 ครั้ง/สัปดาห์ = 2 คะแนน, 10-15 ครั้ง/สัปดาห์ = 3 คะแนน, มากกว่า 15 ครั้ง/สัปดาห์ = 4 คะแนน)

7. ท่านมักจะมีพฤติกรรมเหล่านี้หรือไม่ ใน 1 สัปดาห์ที่ผ่านมา

- นำอาหารบรรจุภาชนะพลาสติกหรือห่อด้วยฟิล์มห่ออาหารเข้าไมโครเวฟ
 ใช้น้ำผลไม้กระป๋อง ผลไม้กระป๋อง หรืออาหารที่บรรจุกระป๋องอื่นๆ ในช่องแช่แข็งตู้เย็น

(ให้คะแนนข้อละ 1 คะแนน)

ผู้ที่มีคะแนนตอบแบบสอบถามได้ 7-15 คะแนน จัดอยู่ในกลุ่มความเสี่ยงต่ำต่อการได้รับสาร BPA และผู้ที่มีคะแนนตอบแบบสอบถามได้ 16-30 คะแนน จัดอยู่ในกลุ่มความเสี่ยงสูงต่อการได้รับสาร BPA
*ไม่แสดงให้อาสาสมัครเห็นการให้คะแนนในแต่ละข้อ

ที่มาของแบบสอบถาม : ปรับปรุงจาก Supplemental Material for Environmental Health Perspectives: Food Packaging and Bisphenol A and Bis(2-Ethylhexyl) Phthalate Exposure: Findings from a Dietary Intervention

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวขวัญชนก สาริกิจ สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคนิคการแพทย์) มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ เมื่อปี พ.ศ. 2554 และได้เข้าศึกษาต่อระดับบัณฑิตศึกษา หลักสูตรชีวเคมีคลินิกและอนุทางการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2555

