

# การทวนสอบความใช้ได้ของ วิธีทดสอบบิสฟีนอลเอในขวดพลาสติก สำหรับเครื่องดื่มของเด็กทารกโดยใช้เทคนิค

High Performance Liquid Chromatography

สมภพ ลาภวิบูลย์สุข\*

## 📄 บทคัดย่อ

การทวนสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบบิสฟีนอลเอในขวดพลาสติกสำหรับเครื่องดื่มของเด็กทารกโดยใช้เทคนิค High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ตามวิธีมาตรฐาน European Standard EN 14350-2: 2004 ในตัวอย่างขวดพลาสติกหรือขวดนมที่ใช้สำหรับบรรจุนมหรือน้ำผลไม้สำหรับเด็กทารก การทวนสอบนี้ใช้สารละลายตัวแทนอาหาร (food simulants) คือน้ำกลั่นและกรดอะซิติกความเข้มข้นร้อยละ 3 (น้ำหนักต่อปริมาตร) การทดสอบความสัมพันธ์เชิงเส้น (linearity) ได้กราฟมาตรฐานมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient,  $R^2$ ) เท่ากับ 0.9999 ของทั้งน้ำกลั่นและกรดอะซิติก และพบว่าขีดจำกัดในการตรวจพบ (limit of detection, LOD) เท่ากับ 1.09 และ 0.41 ไมโครกรัมต่อลิตร และขีดจำกัดในการวัดปริมาณ (limit of quantitation, LOQ) เท่ากับ 4.00 และ 2.00 ไมโครกรัมต่อลิตร สำหรับน้ำกลั่นและกรดอะซิติก ตามลำดับ การทดสอบความถูกต้อง (accuracy) พิจารณาจากความแม่นยำ (trueness) และความเที่ยง (precision) ในการทดสอบตัวอย่างที่มีการเติมสารละลายมาตรฐานบิสฟีนอลเอที่ระดับความเข้มข้นของขีดจำกัดในการวัดปริมาณ ได้ร้อยละค่ากลับคืน (%recovery) อยู่ในช่วงร้อยละ 99.7-105.3 และ 91.5-108.5 และพบว่า การทวนซ้ำ (repeatability) แสดงด้วยค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของการทวนซ้ำ (relative standard deviation of repeatability, %RSD<sub>r</sub>) เท่ากับร้อยละ 1.85 และ 4.88 สำหรับน้ำกลั่นและกรดอะซิติก ตามลำดับ

จากผลการทดลองนี้พบว่าวิธีการทดสอบนี้เป็นวิธีที่เหมาะสมต่อการทดสอบบิสฟีนอลเอในขวดพลาสติกสำหรับเครื่องดื่มของเด็กทารกโดยใช้เทคนิค HPLC

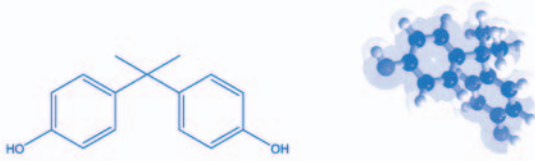
## 📄 Abstract

The verification of bisphenol A (BPA) analysis in drinking equipments was achieved by high performance liquid chromatography (HPLC) according to European Standard EN 14350-2: 2004. Distilled water and 3% (w/v) acetic acid were used as food simulants for this verification. The linearity shown as correlation coefficients ( $R^2$ ) of calibration curve was 0.9999 for distilled water and 3% (w/v) acetic acid. The limit of detection (LOD) was 1.09 and 0.41  $\mu\text{g/L}$  and the limit of quantitation (LOQ) was 4.00 and 2.00  $\mu\text{g/L}$  for distilled water and acetic acid, respectively. The accuracy was considered by trueness and precision. These values were performed by spiking the known concentration of BPA in sample blank. The percentages of recovery were 99.7-105.3 and 91.5-108.5 and %RSD<sub>r</sub> were 1.85% and 4.88% for distilled water and acetic acid, respectively. These results have shown that this HPLC method is suitable for BPA analysis in drinking equipments.

\* นักวิทยาศาสตร์ชำนาญการ โครงการวิทยาศาสตร์ชีวภาพ

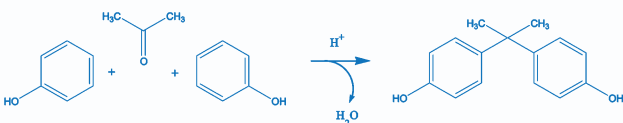


บิสฟีนอลเอ (Bisphenol A) หรือ BPA มีชื่อทางเคมีว่า 2,2-bis(4-hydroxyphenyl)propane หรือ p,p'-isopropylidenebisphenol และมีชื่อ IUPAC ว่า 4,4'-(propane-2,2-diyl)diphenol มีลักษณะเป็นเกล็ดหรือผงสีขาวจนถึงน้ำตาลอ่อน สูตรโมเลกุลคือ  $C_{15}H_{16}O_2$  มีน้ำหนักโมเลกุล 228.29 กรัมต่อโมล มีจุดหลอมเหลวที่ 158-159 องศาเซลเซียส และจุดเดือดที่ 220 องศาเซลเซียส ต่อ 4 มิลลิเมตรปรอท และมีสูตรโครงสร้างดังภาพที่ 1



ภาพที่ 1 สูตรโครงสร้างของบิสฟีนอลเอ

บิสฟีนอลเอถูกสังเคราะห์ขึ้นจากการรวมตัวของอะซีโตนกับฟีนอลสองโมเลกุล โดยเกิดปฏิกิริยาทางเคมีกับกรด เช่น กรดไฮโดรคลอริก (HCl) หรือซัลโฟเนตโพลีสไตรีนเรซิน (sulfonated polystyrene resin) โดยนักเคมีชาวรัสเซียชื่อ AP Dianin เป็นครั้งแรกในปีพุทธศักราช 2434 ดังภาพที่ 2



ภาพที่ 2 ปฏิกิริยาการเกิดบิสฟีนอลเอ

ขวดพลาสติกหรือขวดนมที่ใช้สำหรับบรรจุนมหรือน้ำผลไม้สำหรับเด็กทารก ส่วนใหญ่ผลิตจากเทอร์โมพลาสติกชนิดพอลิคาร์บอเนตซึ่งมีข้อดีคือมีลักษณะใสทนความร้อนได้ดี และสามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้หลายครั้ง แต่มีข้อเสียคือ บิสฟีนอลเอจัดเป็นสารรบกวนการควบคุมระดับฮอร์โมนในสิ่งมีชีวิตและจัดอยู่ในกลุ่มสารก่อมะเร็ง ซึ่งบิสฟีนอลเอที่ใช้เป็นมอนอเมอร์ในการผลิตเทอร์โมพลาสติกชนิดพอลิคาร์บอเนตนั้นสามารถ

เคลื่อนย้ายมาปนเปื้อนกับอาหารและเครื่องดื่มซึ่งจะก่อให้เกิดอันตรายต่อสุขภาพได้ โดยเมื่อวันที่ 17 ตุลาคม 2551 รัฐบาลแคนาดาได้ประกาศให้บิสฟีนอลเอเป็นสารเคมีอันตรายต้องห้าม และได้เคยมีประกาศเมื่อวันที่ 19 เมษายน 2551 ห้ามจำหน่ายขวดนมเด็กที่มีบิสฟีนอลเอ และเมื่อเดือนพฤศจิกายน 2553 สหภาพยุโรปได้ประกาศห้ามใช้ขวดนมที่ปนเปื้อนบิสฟีนอลเอโดยห้ามจำหน่ายและนำเข้าขวดนมดังกล่าว ซึ่งจะมีผลบังคับใช้ตั้งแต่วันที่ 1 มิถุนายน 2554 เป็นต้นไป

ดังนั้นเพื่อความปลอดภัยของผู้บริโภคและสนับสนุนผู้ประกอบการต่อการแข่งขันในตลาดการค้าโลก ศูนย์เชี่ยวชาญด้านวัสดุสัมผัสอาหารของอาเซียน โครงการวิทยาศาสตร์ชีวภาพ กรมวิทยาศาสตร์บริการ จึงได้ใช้วิธีมาตรฐาน European Standard EN 14350-2:2004 ในการทดสอบบิสฟีนอลเอในขวดพลาสติกสำหรับเครื่องดื่มของเด็กทารกโดยใช้เทคนิค High Performance Liquid Chromatography (HPLC) สำหรับแยกชนิดและหาปริมาณสารในสถานะของเหลวด้วยเครื่องตรวจวัดชนิดฟลูออเรสเซนส์ (fluorescence detector) ซึ่งวิธีมาตรฐานนี้ใช้น้ำกลั่น (distilled water) และใช้กรดอะซิติก (acetic acid) ความเข้มข้นร้อยละ 3 (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นสารละลายตัวแทนอาหาร (food simulants) สำหรับนมและน้ำผลไม้ตามลำดับ ดังนั้นจึงต้องมีการทวนสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบบิสฟีนอลเอก่อนให้บริการทดสอบ โดยการตรวจสอบความสัมพันธ์เชิงเส้น (linearity) จากการหาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient,  $R^2$ ) ขีดจำกัดในการตรวจพบ (limit of detection, LOD) ขีดจำกัดในการวัดปริมาณ (limit of quantitation, LOQ) และความถูกต้อง (accuracy) ซึ่งความถูกต้องพิจารณาจากความแม่นยำ (trueness) และความเที่ยง (precision) โดยที่ความแม่นยำประเมินจากค่าความลำเอียง (bias) ที่แสดงในรูปของร้อยละค่ากลับคืน (%recovery) และความเที่ยงประเมินจากการทวนซ้ำ (repeatability) ที่แสดงด้วย



ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทวนซ้ำ (relative standard deviation of repeatability, %RSD<sub>r</sub>) เพื่อยืนยันความเป็นไปตามข้อกำหนดที่ระบุวิธีทดสอบที่กำหนดโดยโคเด็กซ์ (Codex)

## วิธีมาตรฐาน

### 1. เครื่อง HPLC

สภาวะ

คอลัมน์: สแตนเลสสตีล ขนาด 250 × 4.6 มิลลิเมตร บรรจุด้วย C18-coated spherical silicagel ขนาดอนุภาค 5 ไมโครเมตร (load of 9 % carbon and end-capped) (Hypersil ODS 5 ไมโครเมตร)

อุณหภูมิคอลัมน์: 25 องศาเซลเซียส

วัฏภาคเคลื่อนที่: เมทานอล : น้ำ (70 : 30)

อัตราการไหล (flow rate): 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที

ปริมาตรที่ฉีด: 40 ไมโครลิตร

เครื่องตรวจวัด: Fluorescence detector; excitation wavelength Ex = 275 nm emission wavelength Em = 313 nm

เวลาที่สารเคลื่อนที่: ประมาณ 6.8 นาที

### 2. สารเคมี

2.1 สารละลายมาตรฐานบิสฟีนอลเอ ความบริสุทธิ์ร้อยละ 99.6

2.2 น้ำกลั่น

2.3 เมทานอล (เกรด HPLC)

2.4 กรดอะซิติกความเข้มข้นร้อยละ 3 (น้ำหนักต่อปริมาตร)

3. การทวนสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบบิสฟีนอลเอ

3.1 ศึกษาช่วงความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานบิสฟีนอลเอความเข้มข้นระหว่าง 0 ถึง 50 ไมโครกรัม/ลิตร โดยการตรวจสอบความสัมพันธ์เชิงเส้นจากการหาค่า R<sup>2</sup>

3.2 ศึกษาหาค่า LOD และ LOQ โดยวิเคราะห์ 10 ซ้ำ และคำนวณหาส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) เพื่อหาค่า LOD และ LOQ

โดยคำนวณจาก LOD = 3SD

LOQ = 10SD

3.3 ศึกษาเพื่อยืนยันค่า LOQ โดยวิเคราะห์ 10 ซ้ำ และคำนวณหาความถูกต้อง โดยความถูกต้องพิจารณาจาก ความแม่นยำและความเที่ยงโดยที่ความแม่นยำประเมินจากค่าความลำเอียงที่แสดงในรูปของร้อยละ ค่ากลับคืนและความเที่ยงประเมินจากการทวนซ้ำที่แสดงด้วย %RSD<sub>r</sub>

%recovery = [(C1-C2) x 100] / C3

โดย C1 คือ ความเข้มข้นของสารใน spiked matrix blank

C2 คือ ความเข้มข้นของ matrix blank

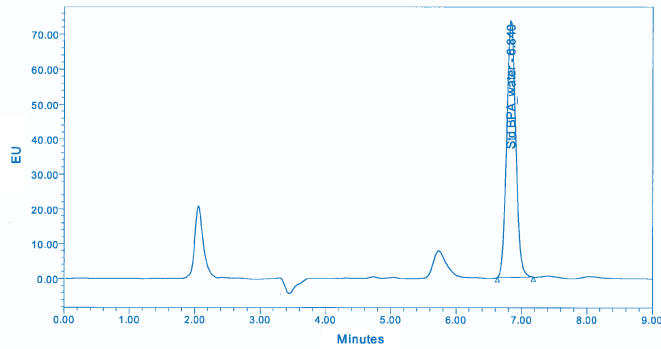
C3 คือ ความเข้มข้นของ analyte ที่เติม

% RSD<sub>r</sub> = (SD × 100) / Mean

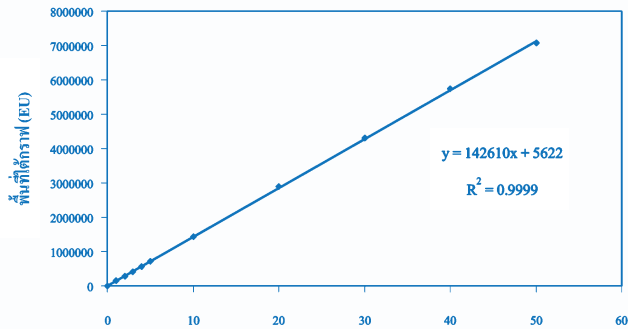
## วิธีมาตรฐาน

1. จากการทดสอบหาปริมาณช่วงความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานบิสฟีนอลเอเพื่อหาความสัมพันธ์เชิงเส้นจากการหาค่า R<sup>2</sup> ได้โครมาโทแกรมดังภาพที่ 3 กับกราฟมาตรฐานดังภาพที่ 4 ของน้ำกลั่น และโครมาโทแกรมดังภาพที่ 5 กับกราฟมาตรฐานดังภาพที่ 6 ของกรดอะซิติกความเข้มข้นร้อยละ 3 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ที่เป็นสารละลายตัวแทนอาหารสำหรับนมและน้ำผลไม้ตามลำดับ



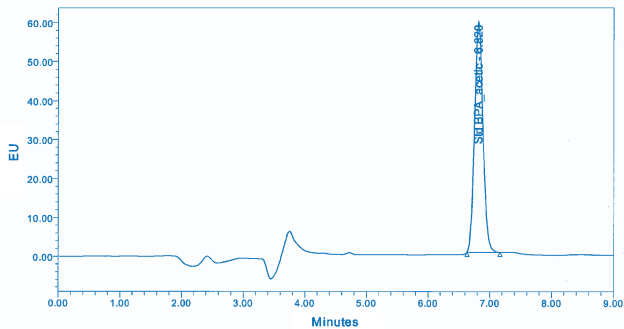


ภาพที่ 3 โครมาโทแกรมของบิสฟีนอลเอในน้ำกลั่น

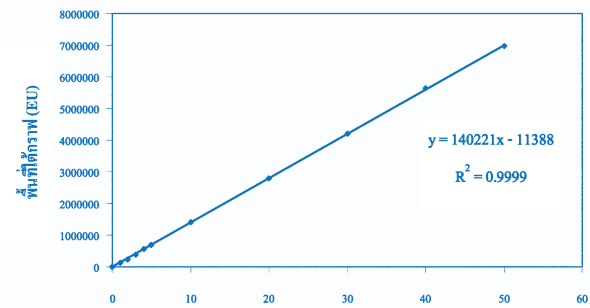


ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานบิสฟีนอลเอ (ไมโครกรัมต่อลิตร)

ภาพที่ 4 กราฟแสดงความสัมพันธ์เชิงเส้นของสารละลายมาตรฐานบิสฟีนอลเอในน้ำกลั่นกับพื้นที่ใต้กราฟ



ภาพที่ 5 โครมาโทแกรมของบิสฟีนอลเอในกรดอะซิติกความเข้มข้นร้อยละ 3 (น้ำหนักต่อปริมาตร)



ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานบิสฟีนอลเอ (ไมโครกรัมต่อลิตร)

ภาพที่ 6 กราฟแสดงความสัมพันธ์เชิงเส้นของสารละลายมาตรฐานบิสฟีนอลเอในกรดอะซิติกความเข้มข้นร้อยละ 3 (น้ำหนักต่อปริมาตร) กับพื้นที่ใต้กราฟ



2. จากการศึกษาหาค่า LOD และ LOQ โดยวิเคราะห์ 10 ซ้ำ และคำนวณหาค่า SD พบว่าค่า LOD เท่ากับ 1.09 และ 0.41 ไมโครกรัมต่อลิตร และ LOQ เท่ากับ 4.00 และ 2.00 ไมโครกรัมต่อลิตร สำหรับน้ำกลั่นและกรดอะซิติกความเข้มข้นร้อยละ 3 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ตามลำดับ ดังตารางที่ 1

**ตารางที่ 1** แสดงการหาค่า LOD และ LOQ ของการทดสอบหาบิสฟีนอลเอโดยเติมสารละลายมาตรฐานบิสฟีนอลเอที่ระดับความเข้มข้น 10.0 ไมโครกรัมต่อลิตร

ครั้งที่	ความเข้มข้นที่วัดได้ (ไมโครกรัมต่อลิตร)		ร้อยละค่ากลับคืน	
	น้ำกลั่น	กรดอะซิติก	น้ำกลั่น	กรดอะซิติก
1	9.36	9.63	93.6	96.3
2	9.14	9.72	91.4	97.2
3	9.15	9.90	91.5	99.0
4	9.27	9.62	92.7	96.2
5	9.72	9.76	97.2	97.6
6	9.98	9.59	99.8	95.9
7	8.91	9.70	89.1	97.0
8	9.52	9.54	95.2	95.4
9	8.93	9.69	89.3	96.9
10	9.78	9.39	97.8	93.9
<b>Mean</b>	9.38	9.65		
<b>SD</b>	0.36	0.14		
<b>LOD</b>	1.09	0.41		
<b>LOQ</b>	4.00	2.00		
<b>%RSD<sub>r</sub></b>	3.89	1.41		

3. จากการศึกษาเพื่อยืนยันค่า LOQ โดยวิเคราะห์ 10 ซ้ำ และคำนวณหาความถูกต้อง โดยความถูกต้องพิจารณาจากความแม่นยำและความเที่ยงโดยที่ความแม่นยำประเมินจากค่าความลำเอียงที่แสดงในรูปของร้อยละค่ากลับคืนและความเที่ยงประเมินจากการทวนซ้ำที่แสดงด้วย %RSD<sub>r</sub> พบว่าความถูกต้องในการทดสอบตัวอย่างที่มีการเติมสารละลายมาตรฐานบิสฟีนอลเอที่ระดับความเข้มข้นของ LOQ คือ 4.00 และ 2.00 ไมโครกรัมต่อลิตร ของน้ำกลั่นและกรดอะซิติกความเข้มข้นร้อยละ 3 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ตามลำดับ จะได้ร้อยละค่ากลับคืนอยู่ในช่วงร้อยละ 99.7-105.3 และ 91.5-108.5 และพบว่า %RSD<sub>r</sub> เท่ากับร้อยละ 1.85 และ 4.88 สำหรับน้ำกลั่นและกรดอะซิติกความเข้มข้นร้อยละ 3 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ตามลำดับ ดังตารางที่ 2



ตารางที่ 2 แสดงการหาค่าร้อยละค่ากลับคืนและการทวนซ้ำของการทดสอบหาบิสฟีนอลเอโดยเติมสารละลายมาตรฐานบิสฟีนอลเอที่ระดับความเข้มข้น 4.00 และ 2.00 ไมโครกรัมต่อลิตร

ครั้งที่	ความเข้มข้นที่วัดได้ (ไมโครกรัมต่อลิตร)		ร้อยละค่ากลับคืน	
	ความเข้มข้น 4.00 ไมโครกรัมต่อลิตร	ความเข้มข้น 2.00 ไมโครกรัมต่อลิตร	ความเข้มข้น 4.00 ไมโครกรัมต่อลิตร	ความเข้มข้น 2.00 ไมโครกรัมต่อลิตร
1	4.19	2.17	104.7	108.5
2	3.99	1.83	99.7	91.5
3	4.08	1.85	101.9	92.4
4	4.18	1.91	104.5	95.4
5	4.02	1.90	100.5	94.8
6	4.13	1.98	103.4	98.8
7	4.21	1.97	105.3	98.5
8	4.16	1.94	103.9	97.0
9	4.17	2.00	104.2	99.8
10	4.07	1.95	101.6	97.6
Mean	4.12	1.95		
SD	0.08	0.10		
%RSD <sub>r</sub>	1.85	4.88		

### สรุปผลและการวิจารณ์ผล

จากการทวนสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบบิสฟีนอลเอตามวิธีมาตรฐาน European Standard EN 14350-2: 2004 โดยศึกษาพารามิเตอร์ต่างๆ ดังนี้คือ ความสัมพันธ์เชิงเส้นจากการหาค่า R<sup>2</sup>, LOD, LOQ และความถูกต้อง ซึ่งความถูกต้องพิจารณาจากความแม่นยำและความเที่ยง โดยที่ความแม่นยำประเมินจากค่าความลำเอียงที่แสดงในรูปของร้อยละค่ากลับคืนและความเที่ยงประเมินจากการทวนซ้ำที่แสดงด้วยค่า %RSD<sub>r</sub> พบว่าค่าต่างๆ อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ที่ระบุวิธีทดสอบที่กำหนดโดยโคเด็กซ์ ดังตารางที่ 3 ทั้งนี้วิธีมาตรฐาน European Standard EN 14350-2: 2004 ได้กำหนด การเคลื่อนย้ายของบิสฟีนอลเอ ต้องไม่เกิน 0.03 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หรือ 30.0 ไมโครกรัมต่อลิตร

ตารางที่ 3 แสดงค่าการยอมรับวิธีทดสอบที่กำหนดโดยโคเด็กซ์

Specific level (ML)	30 ไมโครกรัมต่อลิตร
LOD ( $\leq$ ไมโครกรัมต่อลิตร) = ML*1/5	6.0
LOQ ( $\leq$ ไมโครกรัมต่อลิตร) = ML*2/5	12.0
RSD <sub>r</sub> ( $\leq$ %) = Horwitz equation $(0.66*2C^{-0.1505})$	17.9
Recovery (%)	60 – 115



ดังนั้นการทดสอบบิสฟีนอลเอในขวดพลาสติกสำหรับเครื่องดื่มของเด็กทารกโดยใช้ HPLC จึงเป็นวิธีที่เหมาะสมสำหรับลูกค้าหรือผู้ประกอบการที่สนใจสามารถติดต่อเพื่อขอรับบริการทดสอบบิสฟีนอลเอได้ที่: โครงการวิทยาศาสตร์ชีวภาพ กรมวิทยาศาสตร์บริการ กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี โทรศัพท์: 02 201 7182-3 โทรสาร: 02 201 7181 E-mail: bsp@dss.go.th

## เอกสารอ้างอิง

- Bisphenol A. [Online]. [cite dated 11 July 2011]. Available from internet: <http://www.3dchem.com/molecules.asp?ID=458>
- European Standard. Child use and care articles. Drinking equipment. Part 2: Chemical requirements and tests. **EN 14350-2**. August, 2004, p.1-21.
- PC/BPA Industry Group of Plastics Europe. Fact sheet Regulatory Assessments: Authorities confirm safety of Bisphenol A-based consumer products. [Online]. [cite dated 11 July 2011] Available from internet: [http://www.bisphenol-a-europe.org/uploads/Lay\\_Regulatory%20Assessments\\_270510.pdf](http://www.bisphenol-a-europe.org/uploads/Lay_Regulatory%20Assessments_270510.pdf)
- U.S. Food and Drug Administration. Update on Bisphenol A for use in food contact applications: January 2010. [Online]. [cite dated 11 July 2011] Available from internet: <http://www.fda.gov/NewsEvents/PublicHealthFocus/ucm197739.htm>
- World Health Organization and Food and Agriculture Organization. **Codex Alimentarius Commission Procedural Manual**. Twentieth edition. Rome : FAO/WHO, 2010, p 63-66.
- คณะกรรมการด้านวิชาการของกรมวิทยาศาสตร์บริการ. แนวทางการจัดทำความสมเหตุสมผลของการวัด. กรมวิทยาศาสตร์บริการ. พฤษภาคม, 2554, หน้า 1-129.
- ทิพวรรณ นิ่งน้อย. **แนวปฏิบัติการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ทางเคมีโดยห้องปฏิบัติการเดียว**. กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. กรกฎาคม, 2549, หน้า 1-124.
- วิกิพีเดีย สารานุกรมเสรี. Bisphenol\_A. [ออนไลน์]. [อ้างถึงวันที่ 11 กรกฎาคม 2554] เข้าถึงได้จาก: [http://en.wikipedia.org/wiki/Bisphenol\\_A](http://en.wikipedia.org/wiki/Bisphenol_A)

