วารสารวิชาการสาธารณสุข
ปีที่ 28 ฉบับที่ 1 มกราคม - กุมภาพันธ์ 2562

Journal of Health Science
Vol. 28 No. 1, January - February 2019

นิพนธ์ต้นฉบับ ***Original article***

สารรบกวนการทำงานของต่อมไร้ท่อในน้ำ ตะกอน และปลา ในแม่น้ำน่าน จังหวัดพิษณุโลก

เสาวนีย์ ดีมูล ปร.ด.*
จรูญ สารินทร์ ปร.ด.**
กนกทิพย์ จักษุ วท.ม.***
Guang-GuoYing Ph.D.***
ชาญยุทธ กฤตสุนันท์กุล ปร.ด.**
สริน ศรีปรางค์ ปร.ด.**
** สำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 2 จังหวัดพิษณุโลก*
*** มหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก*
**** State Key Laboratory of Organic Geochemistry, Guangzhou Institute of Geochemistry, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou, China*

วันรับ:	20 ธ.ค. 2559
วันแก้ไข:	4 ก.ค. 2561
วันตอบรับ:	11 ก.ค. 2561

บทคัดย่อ สารรบกวนการทำงานของต่อมไร้ท่อ (endocrine disrupting chemicals หรือ EDCs) เป็นสารเคมีที่มาจากธรรมชาติ เช่น ฮอร์โมนเอสโตรเจน และสารเคมีสังเคราะห์ เช่น สารเคมีในยา หรือในผลิตภัณฑ์ดูแลส่วนบุคคล (pharmaceutical and personal care products หรือ PPCPs) EDCs สามารถทำให้เกิดผลกระทบต่อมนุษย์และสัตว์ได้ โดย EDCs เลียนแบบฮอร์โมนของร่างกายซึ่งไปรบกวนการทำงานของระบบต่อมไร้ท่อ เช่น ทำให้เกิดความผิดปกติของระบบสืบพันธุ์และพัฒนาการของร่างกาย ดังนั้นจึงทำการศึกษาโดยมีวัตถุประสงค์เพื่อวิเคราะห์ความเข้มข้นของ EDCs และทดสอบ estrogenic activities ในตัวอย่างน้ำ ตะกอนแม่น้ำ และปลา จากแม่น้ำน่าน จังหวัดพิษณุโลก โดยทำการเก็บตัวอย่างในแม่น้ำน่าน 12 จุด แบ่งเป็น 3 โซน (โซนก่อนไหลเข้าเมือง โซนในเมืองบริเวณท่อน้ำทิ้ง โซนไหลออกจากเมือง) EDCs ที่ทดสอบคือ octylphenol (OP), nonylphenol (NP), bisphenol A (BPA) และ estrone (E1) วิเคราะห์ความเข้มข้นของสารโดย GC-MS และทดสอบ estrogenic activities ด้วยวิธี yeast estrogen screen (YES) bioassay จากการศึกษาพบความเข้มข้นของ OP, NP, BPA, และ E1 ในตัวอย่างน้ำอยู่ในช่วง 1-10 ng/L, 244-1062 ng/L, 43-1421 ng/L และตรวจไม่พบจนถึง 10 ng/L ตามลำดับ ในตัวอย่างตะกอนไม่พบ OP และพบความเข้มข้นของ NP, BPA, และ E1 อยู่ในช่วง 6-57 ng/g, 5-8 ng/g และ 1-11 ng/g ตามลำดับ สำหรับตัวอย่างปลา OP, NP, BPA, และ E1 พบในช่วง 62-600 ng/g, 5624-57281 ng/g, 9-52 ng/g และ 6-122 ng/g ตามลำดับ Estrogenic activities ในตัวอย่างน้ำอยู่ในช่วง 0-0.98 ng/L ตัวอย่างตะกอนอยู่ในช่วง 0-0.17 ng/g และตัวอย่างปลาอยู่ในช่วง 0.09-1.24 ng/g แม้ว่าความเข้มข้นของ EDCs ในแม่น้ำน่านจะอยู่ในระดับต่ำ อย่างไรก็ตามความเสี่ยงที่จะเป็นอันตรายต่อสิ่งมีชีวิตนั้นส่วนใหญ่อยู่ในระดับปานกลาง การศึกษาครั้งนี้เป็นครั้งแรกของการรายงานการตรวจพบ EDCs ในแม่น้ำน่าน จังหวัดพิษณุโลก ซึ่งผลการศึกษาแสดงให้เห็นถึงการปนเปื้อนของ EDCs ในแม่น้ำน่าน

***คำสำคัญ*: ฤทธิ์การเป็นเอสโตรเจน (estrogenic activity), สารรบกวนการทำงานของต่อมไร้ท่อ, น้ำ, ตะกอน, ปลา, การประเมินความเสี่ยง**

บทนำ

ระบบต่อมไร้ท่อ (endocrine system) มีบทบาทสำคัญในการสร้างสารเคมีที่เรียกว่าฮอร์โมน (hormone) ซึ่งทำหน้าที่ควบคุมการทำงานของร่างกายในมนุษย์และสัตว์ หากการทำงานของต่อมไร้ท่อผิดปกติ จะส่งผลต่อการเจริญเติบโต และการทำงานของร่างกายเสียสมดุลไป[1] ซึ่งในปัจจุบันสารเคมีธรรมชาติและสารสังเคราะห์หลายชนิดมีผลต่อการทำงานของต่อมไร้ท่อ จึงเรียกสารเหล่านี้ว่าสารรบกวนการทำงานของต่อมไร้ท่อ (endocrine disrupting chemicals: EDCs) โดยการเลียนแบบฮอร์โมนของร่างกาย ทำให้เกิดผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตทั้งในระบบสืบพันธุ์และการเจริญเติบโตของร่างกายผิดปกติไป[2] จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า EDCs สามารถรบกวนการพัฒนาของตัวอ่อนหรือทารกในครรภ์ ทำให้ระบบสืบพันธุ์และการเจริญเติบโตในทารกมีแนวโน้มผิดปกติเพิ่มมากขึ้น และจากการศึกษาพบว่าเพศชายที่มีความเสี่ยงต่อการรับสัมผัส EDCs อสุจิมีคุณภาพลดลงและระดับฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนลดลง รวมไปถึงอัตราการเป็นมะเร็งต่อมลูกหมากและไทรอยด์ในประชากรชายเพิ่มขึ้นใน[3] นอกจากนี้ยังพบผลกระทบต่อการพัฒนาระบบสืบพันธุ์ การเจริญพันธุ์ และการมีประจำเดือนในเพศหญิงอีกด้วย[4] แหล่งปนเปื้อนของ EDCs ในสิ่งแวดล้อมที่สำคัญคือ น้ำเสียจากชุมชน โรงงานอุตสาหกรรม หรือการเกษตร โดย EDCs ส่วนใหญ่ที่พบว่ามีการปนเปื้อนอยู่ในสิ่งแวดล้อม เช่น ฮอร์โมนธรรมชาติ (estrogen) ฮอร์โมนสังเคราะห์ในยาคุมกำเนิด (17α-ethinylestradiol (EE2) สารในพลาสติก เช่น phthalates, bisphenol A (BPA) สารลดแรงตึงผิวในผลิตภัณฑ์ทำความสะอาด เช่น nonylphenol (NP) และ octylphenol (OP) นอกจากนี้ยังพบในสารเคมีกำจัดศัตรูพืชและวัชพืชอีกด้วย[5-7]

หลักฐานจากการศึกษาแสดงให้เห็นว่า EDCs ปนเปื้อนในแหล่งน้ำธรรมชาติ มาจากน้ำทิ้งจากโรงบำบัดน้ำเสียหรือน้ำเสียจากชุมชนทั้งที่ผ่านการบำบัดและไม่ได้รับการบำบัดที่ถูกปล่อยลงสู่แหล่งน้ำธรรมชาติ สามารถตรวจพบสารเคมีเหล่านี้ในน้ำและตะกอนตั้งแต่ระดับนาโนกรัมจนถึงไมโครกรัม[8-11] ถึงแม้ว่าการศึกษาเกี่ยวกับผลกระทบของ EDCs ในมนุษย์จะเป็นไปได้ยากแต่ก็มีการศึกษาในสิ่งมีชีวิต เช่น ปลาที่อาศัยอยู่ใกล้แหล่งน้ำทิ้งจากโรงบำบัดน้ำเสีย พบว่าปลาเพศผู้มีพฤติกรรมการผสมพันธุ์เปลี่ยนไปโดยใช้เวลาเกี้ยวพาราสีเพศเมียเพิ่มมากขึ้น รูปร่างสัณฐานของครีบก็เปลี่ยนแปลงไป[12] นอกจากนี้ยังตรวจในปลาเพศผู้พบสาร vitellogenin หรือ VTG ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการสร้างไข่แดงของปลาเพศเมีย ซึ่งมีโอกาสเสี่ยงต่อการข้ามเพศ[13,14] หลักฐานทางวิชาการอีกหลายๆ รายงานพบการข้ามเพศในปลาเพศผู้ที่อาศัยอยู่ในแหล่งน้ำธรรมชาติ ซึ่งรองรับน้ำทิ้งจากโรงบำบัดน้ำเสียหรือน้ำทิ้งจากชุมชน โดยตรวจพบการปนเปื้อนของ EDCs ในแหล่งน้ำนั้นด้วย[15-18] นอกจากนี้พบว่าระดับความเข้มข้นของ EDCs ที่ปนเปื้อนในแหล่งน้ำธรรมชาติในปริมาณต่ำ ก็สามารถส่งผลกระทบในปลาได้ เช่น 17α-ethinylestradiol (EE2) ในยาเม็ดคุมกำเนิดความเข้มข้นเพียง 0.1 ng/L สามารถเหนี่ยวนำให้ปลาเพศผู้สร้าง vitellogenin (VTG) ได้ และที่ความเข้มข้น 0.1-15 ng/L สามารถส่งผลต่อการพัฒนาและการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ระบบสืบพันธุ์[19] การศึกษาเกี่ยวกับ EDCs จากน้ำเสียที่ปนเปื้อนสู่แหล่งน้ำธรรมชาติและการสะสมในปลานั้นได้มีการศึกษาอย่างมากมายหลายประเทศ เช่น สหรัฐอเมริกา บราซิล สเปน แคนาดา ออสเตรเลีย เกาหลีใต้ จีน ญี่ปุ่น[20-30] สำหรับในประเทศไทยการศึกษาเกี่ยว EDCs มีน้อยมาก การตรวจสอบคุณภาพน้ำของแหล่งน้ำธรรมชาตินั้นมีการตรวจสอบติดตามอยู่สม่ำเสมอ โดยจะตรวจวัดพารามิเตอร์ตามมาตรฐานแหล่งน้ำผิวดิน ตามดัชนีของกรมควบคุมมลพิษ[31] แต่ EDCs ยังไม่ถูกรวมเป็นพารามิเตอร์ที่ต้องตรวจติดตาม

แม่น้ำน่าน เป็นแม่น้ำสายหลักที่มีความสำคัญในเขตภาคเหนือตอนล่าง ไหลผ่านเขตชุมชนตั้งแต่จังหวัดน่าน อุตรดิตถ์ และไหลผ่านกลางเมืองพิษณุโลก ซึ่งจังหวัดพิษณุโลกเป็นจังหวัดที่มีความสำคัญอย่างมากในเขตภาคเหนือตอนล่างนี้ โดยเป็นศูนย์รวมทางด้านเศรษฐกิจ สังคม การศึกษา การเกษตรกรรม และการคมนาคม แม่น้ำน่าน

ยังเป็นทรัพยากรที่สำคัญใช้ในการผลิตน้ำเพื่อการอุปโภคและบริโภค รวมถึงใช้ในการประมงสำหรับในพื้นที่จังหวัดพิษณุโลก นอกจากนี้แม่น้ำน่านยังได้รับมลพิษจากน้ำทิ้งในเขตชุมชนเมืองที่ไม่ได้รับการบำบัด เนื่องจากระบบท่อส่งน้ำเสียไปยังบ่อบำบัดยังไม่สามารถรวบรวมน้ำเสียทั้งหมดได้ ดังนั้นจึงมีน้ำเสียจากชุมชนส่วนหนึ่งถูกปล่อยลงสู่แม่น้ำน่านในเขตเมือง ซึ่งเป็นแหล่งชุมชนหนาแน่น โดยในน้ำเสียนี้มีการปนเปื้อนของสารต่างๆ รวมถึง EDCs ด้วย จากการศึกษาของกนกทิพย์ จักษุ[32] พบว่า น้ำเสียจากท่อระบายน้ำก่อนลงสู่แม่น้ำน่านในเขตเมือง ตรวจพบ OP, NP, BPA และ E1 มีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 1.73-384 ng/L, 864-1440 ng/L, 1440-2070 ng/L, และตรวจไม่พบถึง 20.0 ng/L ตามลำดับ ซึ่งแสดงให้เห็นว่ามีการปนเปื้อนของ EDCs ในน้ำเสียที่ถูกปล่อยลงสู่แม่น้ำน่าน เนื่องจากการศึกษาการปนเปื้อนของ EDCs ในแหล่งน้ำธรรมชาติในประเทศไทยมีน้อยมาก ดังนั้นเพื่อให้มีความเข้าใจต่อสภาพการปนเปื้อนของ EDCs และความเสี่ยงที่จะเกิดผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตในแม่น้ำน่าน จึงต้องมีการศึกษาการปนเปื้อนของ EDCs ในแม่น้ำน่าน จังหวัดพิษณุโลก

การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อวิเคราะห์ปริมาณความเข้มข้นของ EDCs ในตัวอย่างน้ำ ตะกอน และปลา โดยวิธีการวิเคราะห์ทางเคมี (Chemical analysis) และทดสอบค่า estrogenic activity ที่จะเกิดผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตโดยวิธีทางชีวภาพ (YES bioassay) โดยสารเคมีเป้าหมายที่จะตรวจวัดคือ octylphenol (OP), nonylphenol (NP), bisphenol A (BPA), estrone (E1), estradiol (E2) และ 17α-ethynylestradiol (EE2) ผลการศึกษาที่ได้สามารถบอกถึงสภาวะการปนเปื้อนของ EDCs ในแม่น้ำน่านซึ่งสามารถใช้ประโยชน์เป็นข้อมูลเพื่อกำกับติดตามและลดปริมาณการปนเปื้อนของ EDCs ในแม่น้ำน่านได้

วิธีการศึกษา

วัสดุอุปกรณ์

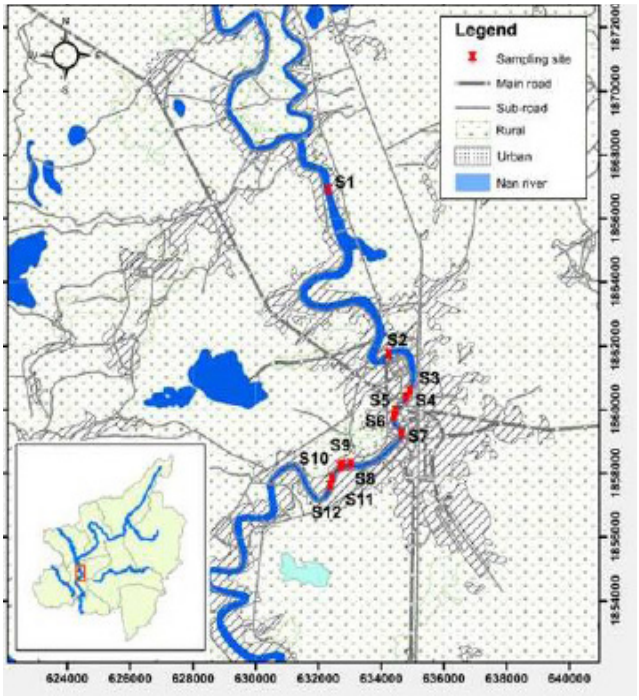
สารเคมีที่ใช้ในการศึกษา คือ purify standard ของ OP, NP, BPA, E1, E2, และ EE2 จาก Supelco, Dr Ehrenstorfer GmbH (Germany), และ Riedel-de-Haën (Germany). Internal standard ได้แก่ 4-n-NP, BPA-d16, E1-d4, E2-d4 และ EE2-c2 จาก Dr Ehrenstorfer GmbH (Germany), Supelco (USA), Cambridge Isotope Laboratories (USA), Riedel-de-Haën (Germany) Pentafluorobenzoyl chloride (PFBOCl, purity >99%) จาก Aldrich สารละลายต่างๆ ที่ใช้ในการวิเคราะห์ได้แก่ methanol, ethyl acetate, n-hexane, dichloromethane, toluene, pyridine, และ trimethylamine (TEA) เกรด HPLC จาก Merck Corporation

เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ ได้แก่ Gas chromatography-mass spectrometry (Agilent gas chromatograph 6890N (USA) เชื่อมกับ Agilent 5975B mass spectrometer, SPE cartridges ที่ใช้คือ Oasis HLB cartridges (6 cc, 500 มิลลิกรัม of sorbent) จาก Waters Corporation (USA) กระดาษกรอง Glass fiber filters (GF/F) ขนาดรูพรุนเท่ากับ 0.7 ไมโครเมตร จาก Whatman (England)

พื้นที่ศึกษาและการเก็บตัวอย่าง

การศึกษานี้ทำการเก็บตัวอย่างจากแม่น้ำน่านที่ไหลผ่านเขตเมืองในจังหวัดพิษณุโลก โดยกำหนดจุดเก็บ

ภาพที่ 1 พื้นที่เก็บตัวอย่าง



ตัวอย่างเป็น 12 จุด (ภาพที่ 1) แบ่งเป็น 3 โซน ได้แก่ โซนต้นน้ำก่อนไหลเข้าเมือง จำนวน 2 จุด คือ S1 และ S2 โซนในเมือง จำนวน 5 จุด ได้แก่ S3, S4, S5, S6, และ S7 และโซนปลายน้ำหลังไหลผ่านเมือง จำนวน 5 จุด คือ S8, S9, S10, S11 และ S12 สำหรับตัวอย่างปลาทำการเก็บตัวอย่าง 5 จุด ได้แก่ S2, S3, S4, S6, และ S8 วิธีการเก็บตัวอย่างน้ำทำตามการศึกษาของ Zhao JL และคณะ[33]

ตัวอย่างน้ำเก็บจากแม่น้ำน่านใส่ในขวดแก้วสีชาปริมาตร 1 ลิตร หลังจากนั้นเติม methanol 50 mL และ 4 M H_2SO_4 เพื่อปรับ pH ให้เท่ากับ 3 ทำการกรองตัวอย่างน้ำด้วยกระดาษกรองขนาดรูพรุน 0.7 μm Whatman GF/F glass fiber membrane ตัวอย่างตะกอนเก็บโดยใช้เครื่องเก็บตะกอนใต้ท้องน้ำ (Grab sampler) ณ จุดเดียว เวลาเดียวกับการเก็บตัวอย่างน้ำ จากนั้นนำไปทำให้แห้งโดยแช่เยือกแข็ง (freeze-dry) และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -40^{o}C จนกระทั่งนำไปวิเคราะห์[33] ตัวอย่างปลานำไปแล่เพื่อแยกหนังออก และนำเนื้อปลาไปปั่นจากนั้นนำไปทำให้แห้งโดยแช่เยือกแข็ง (freeze-dry) และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ-40^{o}C จนกระทั่งนำไปวิเคราะห์[34]

การสกัดตัวอย่าง (Sample extraction)

วิธีการสกัดตัวอย่างทำตามขั้นตอนของ Zhao JL และคณะ[33] โดยใช้วิธีสกัดด้วยเฟสของแข็ง (Solid Phase Extraction, SPE) ใช้ตัวอย่าง 5 ซ้ำ (replicate) ต่อ 1 จุดเก็บตัวอย่าง โดย 3 ซ้ำเป็นการวิเคราะห์ทางเคมี (GC-MS) และอีก 2 ซ้ำเป็นการทดสอบทางชีวภาพ (YES Bioassay) สำหรับตัวอย่างน้ำที่นำไปวิเคราะห์ทางเคมีต้องเติม Internal standards (IS) 100 μL ลงไป ในขวดตัวอย่าง 3 ขวด และตัวอย่างอีก 2 ขวดไม่ต้องเติม IS เพื่อทดสอบทางชีวภาพ (Bioassay) ทำการปรับสภาพ SPE cartridges ให้พร้อมทำงานโดยเติม methanol 10 mL ตามด้วยน้ำกลั่น 10 mL จากนั้นนำตัวอย่างน้ำที่ผ่านการกรองแล้วผ่านเข้า SPE cartridges จนหมด หลังจาก cartridges แห้งแล้วทำการชะ (elute) โดยเติม methanol 7 mL ตามด้วย dichloromethane 5 mL ให้ลงหลอดทดลอง ทำการระเหยตัวอย่างโดยการเป่าด้วยไนโตรเจนและปรับปริมาตรด้วยการเติม methanol 1 mL จากนั้นกรองตัวอย่างที่ได้ด้วย membrane filter ใส่ใน amber glass vial ขนาด 2 mL เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -18 °C จนกระทั่งนำไปวิเคราะห์

สำหรับตัวอย่างตะกอน ใช้ตะกอนปริมาณ 2 กรัม ใส่ใน glass vial ขนาด 20 mL พร้อมฝาเกลียว จำนวน 5 หลอด โดย 3 หลอดเติม IS 100 μL สำหรับวิเคราะห์ด้วย GC-MS และอีก 2 หลอดไม่เติม IS สำหรับวิเคราะห์ทางชีวภาพ ทำการสกัดตะกอนโดยวิธี Sonication โดยย่อดังนี้ เติม ethyl acetate 10 mL ลงในหลอดตัวอย่าง จากนั้นนำไปใส่ใน Ultrasonic bath 15 นาที และนำไปปั่นแยกตะกอนด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วรอบสูง (centrifuge) ที่ 3500 rpm เป็นเวลา 10 นาที แล้วเก็บสารละลายส่วนบนใส่ใน pyriform flask ขนาด 100 mL ทำการสกัดซ้ำอีกสองครั้ง โดยใช้ ethyl acetate 10 mL และ 5 mL ตามลำดับ จากนั้นเตรียมความพร้อม SPE cartridges (200 มิลลิกรัม of sorbent) โดยใช้ methanol 10 mL และน้ำกลั่น 10 mL ตามลำดับ นำตัวอย่างที่สกัดได้ผ่านเข้า cartridges ทำการชะสารตัวอย่างด้วยการเติม n-hexane 6 mL ethyl acetate 6 mL และ methanol 6 mL ตามลำดับ จากนั้นทำการระเหยสารตัวอย่างโดยการเป่าไนโตรเจนแล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1 mLด้วย methanol จากนั้นกรองตัวอย่างที่ได้ด้วย membrane filter ใส่ใน amber glass vial ขนาด 2 mL เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -18 °C จนกระทั่งนำไปวิเคราะห์

สำหรับตัวอย่างปลา เตรียมตัวอย่าง 5 ซ้ำ (replicate) เช่นกันเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ทางเคมี (GC-MS) 3 ซ้ำ และการวิเคราะห์ทางชีวภาพ จำนวน 2 ซ้ำ โดยใช้ตัวอย่างปลาจำนวน 2 กรัมใส่ในหลอด glass vial ฝาเกลียวขนาด 20 mL เติม IS 100 μL ลงในหลอดตัวอย่าง จำนวน 3 หลอด อีก 2 หลอดไม่ต้องเติม จากนั้นทำการสกัดสารโดยการเติมบัฟเฟอร์ CH_3COOH-CH_3COONa ปริมาณ 15 mL ลงในแต่ละหลอด แล้วนำไปใส่ใน ultrasonic bath 10 นาที และนำไปปั่นแยกตะกอนด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วรอบสูง ที่ 4500 rpm เป็นเวลา 15 นาทีที่ 20 °C แล้วเก็บสารละลายส่วนบนใส่ใน flat bottom flask ขนาด 250 mL ทำการสกัดเช่นเดิมอีกสองครั้ง จากนั้นทำสารตัวอย่างให้

บริสุทธิ์โดยผ่านสารตัวอย่างเข้า tandem 500 mg/500 mg SAX/PSA cartridge ต่อเข้ากับ HBL cartridge (200 mg sorbent) เมื่อ cartridge แห้ง ทำการชะสารตัวอย่างด้วย dichloromethane 2 mL ethyl acetate 2 mL และ methanol 5 mL ตามลำดับ ทำการระเหยสารละลายโดยการเป่าด้วยไนโตเจน และปรับปริมาตรด้วย methanol 1 mL จากนั้นกรองตัวอย่างที่ได้ด้วย membrane filter ใส่ใน amber glass vial ขนาด 2 mL เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -18 °C จนกระทั่งนำไปวิเคราะห์

การตรวจหาสารอนุพันธ์ (derivatization)

ขั้นตอนของการตรวจหาสารอนุพันธ์อ้างอิงวิธีการของ Zhao JL และคณะ[33] สรุปโดยย่อดังนี้ นำตัวอย่างที่สกัดได้ปริมาณ 100 μL ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 10 mLที่มีฝาเกลียว จากนั้นระเหยตัวอย่างด้วยการเป่าด้วยไนโตรเจน แล้วเติมสารละลาย 1 M $NaHCO_3$ จำนวน 2 mL และสารละลาย 1 M NaOH จำนวน 1 mL ผสมสารละลายเข้าด้วยกันโดยใช้เครื่อง Vertex mixer ประมาณ 10 วินาที จากนั้นเติม n-hexane 2 mL ตามด้วย 10% pyridine in toluene 50 μL และ 2 % PFBOCl in toluene 50 μL ตามลำดับ แล้วทำการปิดฝาหลอดทดลองให้แน่น ทำการเขย่าหลอดทดลองอย่างแรงด้วยมือเป็นเวลา 1 นาที ทิ้งให้สารละลายแยกชั้นที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที แยกสารละลายส่วนบนใส่ลงใน glass centrifugal tube ขนาด 5 mL หลังจากนั้นเติม n-hexane 10 mL ลงในหลอดทดลองเดิมและเขย่าอย่างแรงด้วยมือ เป็นเวลา 1 นาที แล้วเทสารละลายส่วนบนลงไปรวมกับครั้งแรกใน glass centrifugal tube หลังจากนั้นระเหยสารละลายที่ได้โดยการเป่าด้วยไนโตรเจนแล้วปรับปริมาตรด้วย n-hexane 100 μL และใส่ลงใน vial ขนาด 2 mL ที่มีการสอด insert vial ขนาด 250 μL ที่บรรจุอยู่ใน จากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วย GC-MS เพื่อหาปริมาณ EDCs

การวิเคราะห์ทางเคมีและทางชีวภาพ (chemical analysis and YES bioassay)

การวิเคราะห์ปริมาณของ EDCs โดยใช้วิธี gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) ได้ทำตามขั้นตอนของ Wang L และคณะ[8] เครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์คือ Agilent gas chromatograph 6890N (Agilent, USA) ที่ต่อเชื่อมเข้ากับ Agilent 5975B mass spectrometer และ capillary column ที่ใช้ในการแยกสารตัวอย่างคือ An HP-5MS GC capillary column (30 m, 0.25 mmi.d., 0.25 mm film thickness) โดยใช้ก๊าซฮีเลี่ยม (Helium) เป็นก๊าซพา (carrier) ที่อัตราไหลคงที่ 1 mLต่อนาที ฉีดตัวอย่างปริมาตร 2 μL เข้าสู่ port บน column โดยเลือก splitless mode อุณหภูมิในการฉีด 300 ^{O}C สำหรับอุณหภูมิตู้อบ column อุณหภูมิเริ่มต้นที่ 80 ^{O}C คงที่ 1 นาที และเพิ่มอุณหภูมิในขั้น (ramp) แรกที่ 10 ^{O}C /นาทีจนถึง 220 ^{O}C ขั้นที่ 2 ที่ 4 ^{O}C /นาที จนถึง 260 ^{O}C ขั้นที่ 3 ที่ 5 ^{O}C /นาที จนถึง 300 ^{O}C จากนั้นอุณหภูมิเพิ่มถึง 310 ^{O}C ที่ 20 ^{O}C / นาที และคงไว้ที่ 310 ^{O}C เป็นเวลา 15 นาที และอุณหภูมิของ mass spectrometry คงไว้ที่ 310 ^{O}C ผลการวิเคราะห์ของสารตัวอย่างแต่ละชนิดขึ้นอยู่กับ retention time และยืนยันด้วยไอออนของสารชนิดนั้นๆ

การวิเคราะห์ทางชีวภาพใช้วิธี YES bioassay อ้างอิงจากวิธีการของ Zhao JL และคณะ[35] สรุปโดยสังเขป ดังนี้ ทำการเจือจางตัวอย่างลดลง 2 เท่าไปเรื่อยๆ ด้วย ethanol ในเพลท 96 หลุม (96 well plate) จากนั้นนำสารละลายที่ได้ถ่ายลงสู่เพลทที่ 2 ปล่อยให้สารละลายในเพลทแห้งแล้วให้เติม yeast solution ปริมาตร 200 μL ที่มีส่วนผสมของอาหารเลี้ยงเชื้อและ red-β-D-galactopyranoside (CPRG) ลงในแต่ละหลุมของเพลท จากนั้นห่อหุ้มเพลทด้วยฟรอยด์แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 32 ^{O}C ระหว่างชั่วโมงที่ 24 และ 72 ให้ทำการเขย่าเพลทเป็นเวลา 2 นาที แล้วนำบ่มต่อ หลังจากครบ 72 ชั่วโมงนำเพลทมาอ่านค่าดูดกลืนแสงที่ 540 nm และ 620 nm โดยใช้เครื่องอ่านเพลท ค่าที่ได้นี้จะแสดงในรูปของ estradiol equivalent (EEQs) ที่บ่งบอกถึงความสามารถในการแสดงเป็นเอสโตรเจนของสารตัวอย่างแต่ละชนิด

Risk assessment

การประเมินความเสี่ยงของการเกิดผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่ในแหล่งที่มี EDCs ปนเปื้อนจะแสดงใน

ระดับ risk quotient หรือ RQ โดยคำนวณจากอัตราส่วนของค่า EEQ ที่ได้จากการทดสอบทางชีวภาพ (YES bioassay) และค่า Predicted no effect concentration (PNEC) เป็นความเข้มข้นของสารเคมีที่จะไม่เกิดผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตซึ่งได้จากการทดลอง โดยในการศึกษานี้ใช้ค่า PNEC เท่ากับ 1.5 ng/L ตามการศึกษาของ Zhao และคณะ[35] ระดับของความเสี่ยงต่อสิ่งมีชีวิต (RQ) ที่ได้จากการคำนวณนั้น ถ้าต่ำกว่า 0.1 (RQ<0.1) หมายถึงมีความเสี่ยงในระดับต่ำ ถ้า RQ มากกว่าหรือเท่ากับ 0.1 แต่น้อยกว่า 1 (0.1≤RQ<1) หมายถึงมีความเสี่ยงในระดับปานกลาง และถ้า RQ มากกว่า 1 (RQ>1) หมายถึงมีความเสี่ยงในระดับสูง

ผลการศึกษา

1. ความเข้มข้นของสาร EDCs ในแม่น้ำน่าน

จากการวิเคราะห์สารเคมีเป้าหมายทั้ง 6 ชนิด (OP, NP, BPA, EE2, E1 และ E2)ในตัวอย่างน้ำแม่น้ำน่าน พบสารเคมีเพียง 4 ชนิดคือ OP, NP, BPA, และ E1 โดยสารทั้งหมดตรวจพบในตัวอย่างน้ำทั้ง 12 จุด (S1-S12) ซึ่งพบว่า NP และ BPA มีความเข้มข้นสูงกว่า OP และ E1 ความเข้มข้นของ OP, NP, BPA และ E1 อยู่ในช่วง 0.9-10.0 ng/L, 244-1060 ng/L, 43.4-1420 ng/L, และ 1.6-9.7 ng/L ตามลำดับ (ภาพที่ 2)

ในตัวอย่างตะกอนแม่น้ำตรวจพบสารเคมี 3 ชนิดคือ NP, BPA, และ E1 โดยความเข้มข้นของ NP, BPA, และ E1 อยู่ในช่วง 6.3-57.1, 5.1-7.6, และ 1.3-11.3 ng/g, ตามลำดับ (ภาพที่ 3)

สำหรับตัวอย่างปลาตรวจพบสารเคมี 4 ชนิดคือ OP, NP, BPA, และ E1 โดยมีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 12.4-601, 5620-38900, 9.0-51.9, and 5.6-122ng/g ตามลำดับ (ภาพที่ 4)

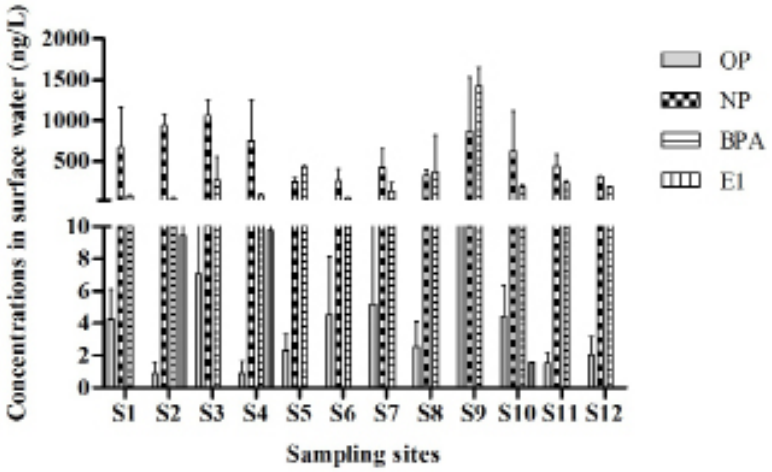
2. Estrogenic activity ในแม่น้ำน่าน

Estrogenic activity แสดงในค่า EEQ ซึ่งทำการวิเคราะห์โดยวิธีทางชีวภาพ (YES bioassay) จากตัวอย่างน้ำ ตะกอนแม่น้ำ และปลา ทั้ง 12 จุดเก็บตัวอย่าง พบว่าในตัวอย่างน้ำ EEQs อยู่ในช่วง 0-0.98 ng/L ตัวอย่างตะกอน EEQs อยู่ในช่วง 0-0.17 ng/g และตัวอย่างปลา EEQs อยู่ในช่วง 0.09-1.24 ng/g โดยส่วนใหญ่แล้วพบว่า EEQs มีค่าสูงในที่จุดเก็บตัวอย่างในเขตเมือง ซึ่งเป็นจุดที่มีรองรับน้ำเสียจากท่อน้ำทิ้งลงสู่แม่น้ำน่าน (ภาพที่ 5)

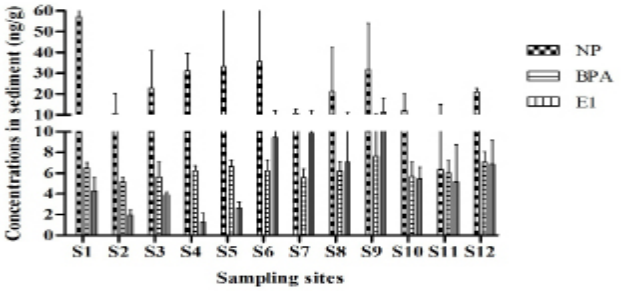
3. การประเมินความเสี่ยง (risk assessment)

การสัมผัส EDCs ของสิ่งมีชีวิตในแหล่งน้ำจะสามารถส่งผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตได้ โดย EDCs นั้นมีความสามารถแสดงเป็นเอสโตรเจน (Estrogenic activity) ซึ่งการเลียนแบบเอสโตรเจนนี้ทำให้ไปรบกวนการทำงานของฮอร์โมนในร่างกายของสิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่ในแหล่ง

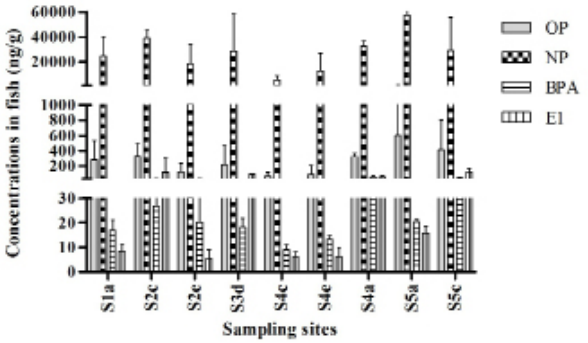
ภาพที่ 2 ความเข้มข้นของ EDCs ในตัวอย่างน้ำจากแม่น้ำน่าน



ภาพที่ 3 ความเข้มข้นของ EDCs ในตัวอย่างตะกอนจากแม่น้ำน่าน

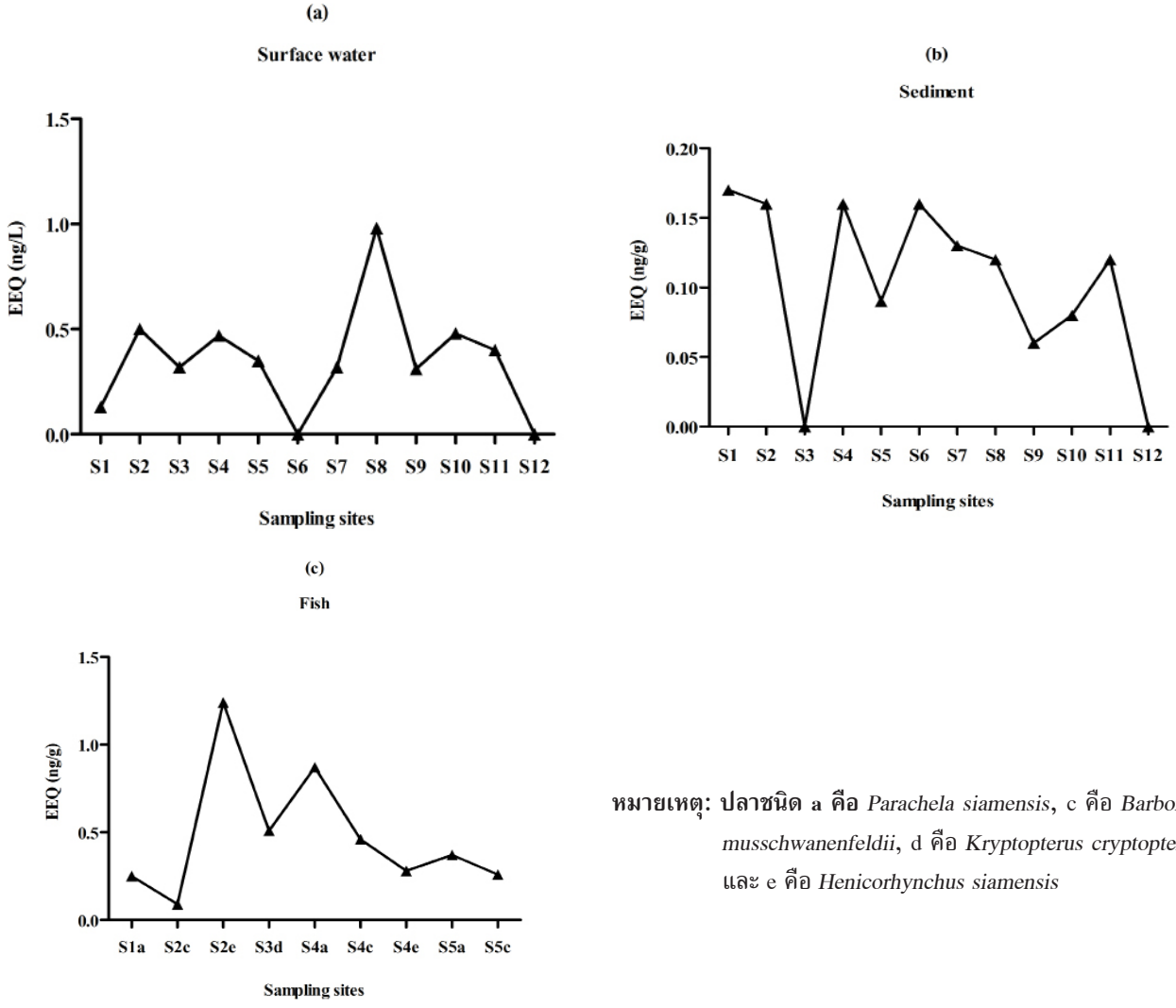


ภาพที่ 4 ความเข้มข้นของ EDCs ในตัวอย่างปลาจากแม่น้ำน่าน



หมายเหตุ: ปลาชนิด a คือ *Parachela siamensis*, c คือ *Barbonymusschwanenfeldii*, d คือ *Kryptopterus cryptopterus*, และ e คือ *Henicorhynchus siamensis*

ภาพที่ 5 Estrogenic activity (EEQs) จากการวิเคราะห์โดยวิธี YES bioassay ใน (a) ตัวอย่างน้ำ (b) ตะกอนแม่น้ำ และ(c) ตัวอย่างปลาจากแม่น้ำน่าน



หมายเหตุ: ปลาชนิด a คือ *Parachela siamensis*, c คือ *Barbonymusschwanenfeldii*, d คือ *Kryptopterus cryptopterus*, และ e คือ *Henicorhynchus siamensis*

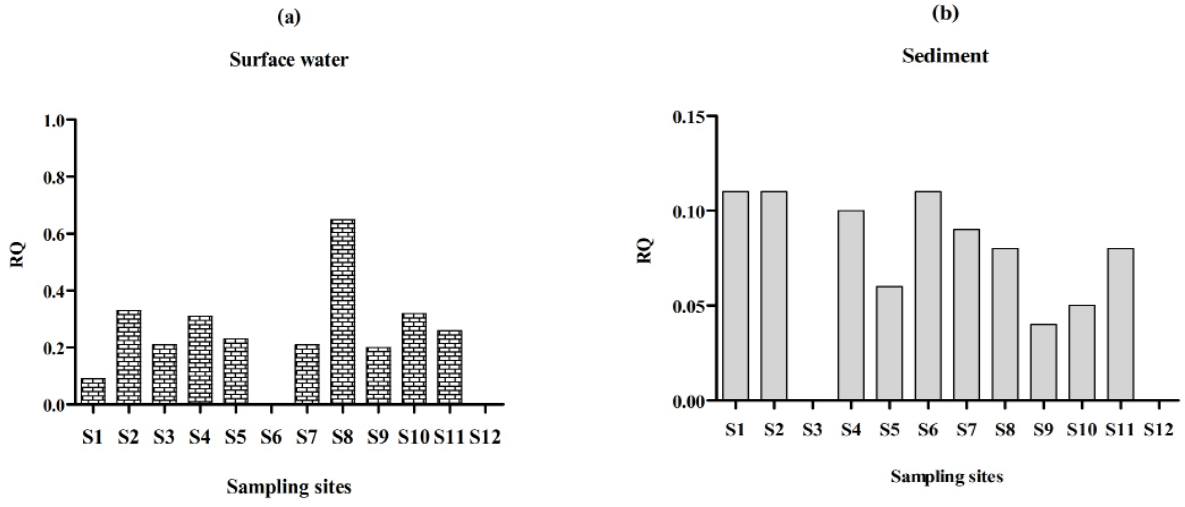
น้ำนั้น ดังนั้นการประเมินความเสี่ยงผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตในสิ่งแวดล้อม สามารถทำได้โดยการคำนวณ Risk Quotient (RQ) จากอัตราส่วนของ EEQ (จากการวิเคราะห์โดย YES bioassay) กับค่า Predicted no effect concentration (PNEC) และนำมาจัดระดับความเสี่ยง จากการศึกษานี้พบว่าตัวอย่างน้ำใน 12 จุดเก็บตัวอย่างมีค่า RQs อยู่ในระดับต่ำจำนวน 3 จุด คือ S1, S6 และ S12 แสดงว่ามีผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตในระดับต่ำ ค่า RQs อยู่ในระดับปานกลางจำนวน 9 จุด คือ S2- S5 และ S7-S11 แสดงว่ามีผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตในระดับปานกลาง สำหรับตัวอย่างตะกอนพบว่า RQs อยู่ในระดับต่ำจำนวน 5 จุด คือ S1, S2, S4, S6, และ S7 แสดงว่ามีผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตในระดับต่ำ และ RQs อยู่ในระดับปานกลาง จำนวน 7 จุด คือ S3, S5, และ S8-S12 แสดงว่ามีผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตในระดับปานกลาง ทั้งนี้ไม่พบความเสี่ยงต่อสิ่งมีชีวิตในระดับสูงทั้งในตัวอย่างน้ำและตะกอน (ภาพที่ 6)

วิจารณ์

1. ปริมาณ EDCs ในแม่น้ำน่าน

จากการตรวจพบ OP, NP, BPA, และ E1 ในแม่น้ำน่าน แสดงให้เห็นว่าแม่น้ำน่านมีการปนเปื้อนของ EDCs ซึ่งแหล่งปนเปื้อนหลักๆ มาจากน้ำทิ้งในเขตเมืองที่ปล่อยลงสู่แม่น้ำ การตรวจพบสาร OP และ NP ในแม่น้ำน่านนั้นอาจจะมาจากการใช้ผลิตภัณฑ์ทำความสะอาด เช่น สบู่ หรือน้ำยาทำความสะอาดต่างๆ จากบ้านพักอาศัย ร้านอาหาร สถานบริการ โรงแรมซึ่งมีอยู่จำนวนมากในเขตเมืองพิษณุโลก ในผลิตภัณฑ์ประเภทนี้จะใช้สาร alkylphenol polyethoxylates (APEs) เป็นสารลดแรงตึงผิว เมื่อย่อยสลายจะได้ OP และ NP ที่สามารถเลียนแบบฮอร์โมนเอสโตรเจนในร่างกาย[24] ขณะที่ BPA เป็นส่วนประกอบในพลาสติก เรซิน หรือเป็นส่วนประกอบในสารเคลือบร่องฟัน และในกระป๋องบรรจุอาหารหรือแม้แต่ในขวดนมเด็ก BPA สามารถหลุดออกมาปนเปื้อนในน้ำเสียและระบายลงสู่แหล่งน้ำธรรมชาติ [5] ส่วน E1 เป็นฮอร์โมนธรรมชาติถูกปล่อยออกมาจากสัตว์และมนุษย์ผ่านทางน้ำเสียจากชุมชนลงสู่แหล่งน้ำธรรมชาติ จากการศึกษานี้พบว่า EDCs ในตัวอย่างน้ำมีระดับความเข้มข้นสูงกว่าในตัวอย่างตะกอนแม่น้ำ เนื่องจากคุณสมบัติของสารที่สามารถละลายน้ำได้[36] และเนื่องจากแม่น้ำน่านเป็นแม่น้ำที่ไหลจากเหนือลงใต้ตลอดปี ดังนั้นการไหลของน้ำอาจส่งผลต่อการตกตะกอนของสารจึงทำให้ตรวจพบ EDCs ในน้ำมีระดับความเข้มข้นสูงกว่าในตะกอน เมื่อเปรียบเทียบกับประเทศ อื่นๆ แล้วพบว่าในการศึกษานี้ OP, NP และ E1 มีปริมาณต่ำกว่าการศึกษาในประเทศจีนที่ทำการศึกษาในแม่น้ำ Pearl[33] และสหรัฐอเมริกาที่ศึกษาในแม่น้ำ

ภาพที่ 6 Risk Quotients (RQs) ในตัวอย่างน้ำ (a) และตะกอนแม่น้ำ (b) จากแม่น้ำน่าน



Mississippi[37,38] ทั้งนี้เนื่องจากพื้นที่ศึกษาของประเทศจีนและสหรัฐอเมริกาเป็นแม่น้ำขนาดใหญ่ที่ไหลผ่านเขตเมืองใหญ่และรองรับน้ำเสียที่ไม่ได้บำบัดและผ่านการบำบัดแล้วจากโรงบำบัดน้ำเสียในปริมาณที่มากกว่า จึงอาจทำให้ EDCs ปนเปื้อนมากับน้ำเสียในปริมาณมาก สำหรับตัวอย่างตะกอนพบว่าในการศึกษานี้ปริมาณ EDCs อยู่ในระดับต่ำกว่าการศึกษาในแม่น้ำ Pearl ประเทศจีน[39] และ Venice Lagoon ประเทศอิตาลี[40] ทั้งนี้เนื่องจากแม่น้ำ Pearl เป็นแม่น้ำขนาดใหญ่ที่ไหลผ่านพื้นที่เขตเมืองและเขตอุตสาหกรรมที่หนาแน่นกว่ามาก จึงทำให้มีการปนเปื้อนของ EDCs ในปริมาณสูงและมีการปนเปื้อนมาเป็นเวลานาน สำหรับพื้นที่ศึกษาในประเทศอิตาลีนั้นเป็นแหล่งรองรับแม่น้ำสายต่างๆ ที่ไหลผ่านเขตเมือง จึงอาจทำให้มีการปนเปื้อน EDCs ในน้ำทิ้งที่ปล่อยลงสู่แม่น้ำประกอบกับ Venice Lagoon เป็นแหล่งน้ำนิ่งจึงทำให้ EDCs มีการตกตะกอนและถูกดูดซับอยู่ในตะกอนใต้น้ำได้ง่าย ดังนั้นจึงทำให้มีการตรวจพบ EDCs ในตะกอนแม่น้ำในประเทศจีนและอิตาลีมากกว่าในการศึกษานี้ สำหรับตัวอย่างปลาพบว่าในการศึกษานี้มีปริมาณ OP, NP และ E1 ในปลาสูงกว่าการศึกษาในแม่น้ำ Dongjiang ประเทศจีนยกเว้น BPA ซึ่งพบในระดับต่ำกว่า[34] ทั้งนี้อาจเป็นเพราะว่าการสะสม EDCs ในปลานั้นขึ้นอยู่กับชนิด อายุ และขนาดของปลาจึงทำให้ตรวจพบสารนี้ในปริมาณที่แตกต่างกัน

2. Estrogenic activity ในแม่น้ำน่าน

Estrogenic activity ซึ่งแสดงในค่า EEQ ในแหล่งน้ำบ่งบอกถึงความสามารถของ EDCs ที่จะแสดงเป็นเอสโตรเจน โดยเลียนแบบฮอร์โมนในร่างกายซึ่งทำให้ไปรบกวนการทำงานของต่อมไร้ท่อส่งผลเสียต่อสิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่ในแหล่งน้ำได้ จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าถ้าระดับของ EEQ ในแหล่งน้ำธรรมชาติมากกว่า 1 ng/L จะส่งผลให้การทำงานของระบบสืบพันธุ์ของสิ่งมีชีวิตผิดปกติ[41] ซึ่งในการศึกษานี้พบว่า ระดับ EEQs อยู่ในช่วงไม่เกิน 1 ng/L และเมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาในประเทศอื่นๆ พบว่า EEQs ในตัวอย่างน้ำและตะกอนมีระดับต่ำกว่าการศึกษาในประเทศจีน[26,42] และต่ำกว่าการศึกษาในประเทศญี่ปุ่นที่พบ EEQs ในช่วง 0.70 ถึง 4.01 ng/ L[43] และ EEQs ตัวอย่างน้ำในพื้นที่ศึกษามีค่าไม่เกิน 1 ng/L ต่ำกว่าในประเทศบลาซิลที่มีค่าสูงถึง 16 ng/L[44] ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับปริมาณน้ำเสียที่มีจำนวนน้อยกว่าจึงทำให้มีการปนเปื้อนของ EDCs ต่ำกว่า

3. การประเมินความเสี่ยง (risk assessment)

การปนเปื้อนของ EDCs ในแหล่งน้ำและความสามารถในการเลียนแบบเอสโตรเจนของสารนี้ จะทำให้เกิดผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิต เช่น ปลาที่อาศัยอยู่ในแม่น้ำที่มีการปนเปื้อนของ EDCs โดยสารนี้จะรบกวนการทำงานของฮอร์โมนในร่างกาย ทำให้ระบบสืบพันธุ์ผิดปกติ [41] ในการศึกษานี้พบว่าตัวอย่างน้ำและตะกอนจากแม่น้ำน่านส่วนใหญ่มีค่า RQs มากกว่า 0.1 แต่ไม่เกิน 1 แสดงว่ามีความเสี่ยงที่จะเกิดผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตในระดับปานกลาง เมื่อเปรียบเทียบกับประเทศอื่นพบว่าแม่น้ำ Yellow ประเทศจีนมีบางจุดที่มีความเสี่ยงอยู่ในระดับสูง[26] แม่น้ำน่าน จังหวัดพิษณุโลก มีความเสี่ยงอยู่ในระดับต่ำถึงปานกลาง แต่ก็แสดงให้เห็นว่ามีการปนเปื้อน EDCs ที่มีความสามารถในการเลียนแบบฮอร์โมนของสิ่งมีชีวิตในน้ำได้ แม้ว่าปัญหามลภาวะนี้จะไม่อยู่ในระดับที่รุนแรง อย่างไรก็ตามควรมีการประเมินความเสี่ยงอย่างต่อเนื่องเพื่อเป็นการติดตามสถานการณ์และแจ้งเตือนผลกระทบที่อาจเกิดขึ้นต่อสิ่งมีชีวิตได้

สรุป

การตรวจพบ OP, NP, BPA, และ E1 ในตัวอย่างน้ำ ตะกอน และปลา จากการเก็บตัวอย่าง 12 จุด ในแม่น้ำน่าน จังหวัดพิษณุโลก (แบ่งเป็น 3 โซน คือ โซนต้นน้ำก่อนเข้าเมือง โซนในเขตเมือง และโซนปลายน้ำนอกเขตเมือง) วิเคราะห์ความเข้มข้นของสารโดย GC-MS และทดสอบ estrogenic activities (EEQs) โดย YES bio-assay พบว่าความเข้มข้นของสารแต่ละชนิดแตกต่างกันไปในแต่ละจุด โดยความเข้มข้นของ EDCs ส่วนใหญ่มีระดับสูงในเขตเมือง NP มีความเข้มข้นสูงกว่าสารชนิดอื่นทั้งในตัวอย่างน้ำ ตะกอน และปลา และส่วนใหญ่ความ

เสี่ยงต่อสิ่งมีชีวิตอยู่ในระดับต่ำถึงปานกลาง แม้ว่าปริมาณความเข้มข้นของสารเคมีที่ตรวจพบในแม่น้ำน่านนี้จะต่ำกว่าที่อื่น เช่น ประเทศจีน หรือสหรัฐอเมริกา อย่างไรก็ตามควรทำการศึกษาต่อไปถึงผลกระทบที่เกิดขึ้นต่อสิ่งมีชีวิตที่รับสัมผัสสารนี้ในสิ่งแวดล้อม

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ และคณะเกษตรศาสตร์ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวร ที่สนับสนุนงบประมาณในการวิจัยครั้งนี้ รวมถึง State Key Laboratory of Organic Geochemistry, Guangzhou Institute of Geochemistry, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou, China ที่สนับสนุนการวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการทั้งวัสดุอุปกรณ์และสารเคมีในการวิเคราะห์ทางเคมีและทางชีวภาพ

เอกสารอ้างอิง

1. Wêsierska-G¹dek J. Endocrine disruptor contaminants in water and their adverse effects in humans. Ecohydrol. Hydrobiol 2006;6:233-42.
2. Schug TT, Janesick A, Blumberg B, Heindel JJ. Endocrine disrupting chemicals and disease susceptibility. J Steroid Biochem Mol Biol 2011;127:204-15.
3. Meeker JD. Exposure to environmental endocrine disrupting compounds and men's health. Maturitas 2010;66:236-41.
4. Fowler PA, Bellingham M, Sinclair KD, Evans NP, Pocar P, Fischer B, et al. Impact of endocrine-disrupting compounds (EDCs) on female reproductive health. Mol Cell Endocrinol 2012;355:231-9.
5. Jackson J, Sutton R. Sources of endocrine-disrupting chemicals in urban wastewater, Oakland, CA. Sci Total Environ 2008;405:153-60.
6. Nie Y, Qiang Z, Zhang H, Ben W. Fate and seasonal variation of endocrine-disrupting chemicals in a sewage treatment plant with A/A/O process. Sep Purif Technol 2012;84:9-15.
7. Schug TT, Janesick A, Blumberg B, Heindel JJ. Endocrine Disrupting Chemicals and Disease Susceptibility. J Steroid Biochem Mol Biol 2011;127:204-15.
8. Wang L, Ying GG, Chen F, Zhang LG, Zhao JL, Lai HJ, et al. Monitoring of selected estrogenic compound s and estrogenic activity in surface water and sediment of the Yellow River in China using combined chemical and biological tools. Environ Pollut 2012;165:241-9.
9. Yoon Y, Ryu J, Oh J, Choi BG, Snyder SA. Occurrence of endocrine disrupting compounds, pharmaceuticals, and personal care products in the Han River (Seoul, South Korea). Sci Total Environ 2012;408:636-43.
10. Boyd GR, Palmeri JM, Zhang S , Grimm DA. Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) and endocrine disrupting chemicals (EDCs) in stormwater canals and Bayou St. John in New Orleans, Louisiana, USA. Sci Total Environ 2004;333:137-48.
11. Yu Y, Wu Y, Chang AC. Seasonal variation of endocrine disrupting compounds, pharmaceuticals and personal care products in wastewater treatment plants. Sci Total Environ 2013;442:310-6.
12. Saaristo M, Myers J, Jacques-Hamilton R, Allinson M, Yamamoto A, Allinson G, et al. Altered reproductive behaviors in male mosquito fish living downstream from a sewage treatment plant. Aquat Toxicol 2014;149:58-64.
13. Yan Z, Lun G, Liu J, Jin S. An integrated assessment of estrogenic contamination and feminization risk in fish in Taihu Lake, China. Ecotoxicol. Environ Saf 2012; 84:334-40.
14. Liu J, Wang R, Huang B, Lin C, Zhou J, Pan X. Biological effects and bioaccumulation of steroidal and phenolic endocrine disrupting chemicals in high-back crucian carp expose d to wastewater treatment plant effluents. Environ Pollut 2012;162:325-31.
15. Iwanowicz LR, Blazer VS, Pinkney AE, Guy CP, Major AM, Munney K, et al. Evidence of estrogenic endocrine disruption in smallmouth and largemouth bass inhabiting Northeast U.S. national wildlife refuge waters: a recon-

naissance study. Ecotoxicol Environ Saf 2016;124:50-9.

16. Thibaut R, Porte C. Effects of endocrine disrupters on sex steroid synthesis and metabolism pathways in fish. J Steroid Biochem Mol Biol 2004;92:485-94.
17. Urbatzka R, Bottero S, Mandich A, Lutz I, Kloas W. Endocrine disrupters with (anti)estrogenic and (anti) androgenic modes of action affecting reproductive biology of Xenopus laevis: I. Effects on sex steroid levels and biomarker expression. Comp Biochem Physiol Part C 2007;144:310-8.
18. Quinn B, Gagné F, Costello M, McKenzie C, Wilson J, Mothersill C. The endocrine disrupting effect of municipal effluent on the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). Aquat Toxicol 2004;66:279-92.
19. Purdom CE, Hardiman PA, Bye VJ, Eno NC, Tyler CR, Sumpter JP. Oestrogenic effects of effluent from sewage treatment works. J Chem Ecol 1994;8:275-85.
20. Ankley GT, Bencic DC, Breen MS, Collette TW, Conolly RB, Denslow ND, et al. Endocrine disrupting chemicals in fish: developing exposure indicators and predictive models of effects based on mechanism of action. Aquat Toxicol 2009;29:168-78.
21. Boyd GR, Palmeri JM, Zhang S, Grimm DA. Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) and endocrine disrupting chemicals (EDCs) in stormwater canals and Bayou St. John in New Orleans, Louisiana, USA. Sci Total Environ 2004;333:137-48.
22. Kuster M, Díaz-Cruz S, Rosell M, López de Alda M, Barceló D. Fate of selected pesticides, estrogens, progestogens and volatile organic compounds during artificial aquifer recharge using surface waters. Chemosphere 2010;79:880-6.
23. Rodriguez-Mozaz S, López de Alda MJ, Barceló D. Monitoring of estrogens, pesticides and bisphenol A in natural waters and drinking water treatment plants by solid-phase extraction-liquid chromatography-mass spectrometry. J Chromatogr A 2004;1045:85-92.
24. Ko EJ, Kim KW, Kang SY, Kim SD, Bang SB, Hamm SY, et al. Monitoring of environmental phenolic endocrine disrupting compounds in treatment effluents and river waters, Korea. Talanta 2007;73:674-83.
25. Yoon Y, Ryu J, Oh J, Choi BG, Synder SA. Occurrence of endocrine disrupting compounds, pharmaceuticals, and personal care products in the Han River (Seoul, South Korea). Sci Total Environ 2010;408:636-43.
26. Wang L, Ying GG, Chen F, Zhang LJ, Zhao JL, Lai HJ, et al. Monitoring of selected estrogenic compound s and estrogenic activity in surface water and sediment of the Yellow River in China using combined chemical. Environ Pollut 2012;165:241-9.
27. Rahmana MF, Yanfula EK, Jasim SY. Occurrences of endocrine disrupting compounds and pharmaceuticals in the aquatic environment and their removal from drinking water: challenges in the context of the developing world and biological tools. Desalination 2009;248:578-85.
28. Ying GG, Kookana RS, Dillon P. Sorption and degradation of selected five endocrine disrupting chemicals in aquifer material. Water Res 2003;37:3785-91.
29. Yu Y, Huang Q, Wang Z, Zhang K, Tang C, Cui J, et al. Occurrence and behavior of pharmaceuticals, steroid hormones, and endocrine-disrupting personal care products in wastewater and the recipient river water of the Pearl River Delta, South China. J Environ Monit 2011; 13:871-8.
30. Aoki JY, Nagae M, Takao Y, Hara A, Lee YD, Yeo IK, et al. Survey of contamination of estrogenic chemicals in Japanese and Korean coastal waters using the wild grey mullet (*Mugil cephalus*). Sci Total Environ 2010; 408:660-5.
31. กรมควบคุมมลพิษ. มาตรฐานคุณภาพน้ำ [อินเทอร์เน็ต]. [สืบค้นเมื่อ 25 ต.ค. 2559]. แหล่งข้อมูล: http://www.pcd.go.th/info_serv/reg_std_water05.html
32. กนกทิพย์ จักษุ. Contamination of endocrine disrupting chemicals (EDCs) in wastewater from hotels and the Nan River, Mueang district, Phitsanulok, Thailand [วิทยานิพนธ์/ปริญญาโท]. พิษณุโลก: มหาวิทยาลัยนเรศวร; 2558.
33. Zhao JL, Ying GG, Wang L, Yang JF, Yang XB, Yang LH, et al. Determination of phenolic endocrine disrupting chemicals and acidic pharmaceuticals in surface

water of the Pearl Rivers in South China by gas chromatography–negative chemical ionization–mass spectrometry. Sci Total Environ 2009;407:962-74.

34. Yang J, Li H, Ran Y, Chan K. Distribution and bioconcentration of endocrine disrupting chemicals in surface water and fish bile of the Pearl River Delta, South China. Chemosphere 2014;107:439-46.
35. Zhao JL, Ying GG, Yang B, Liu S, Zhou LJ, Chen ZF. Screening of multiple hormonal activities in surface water and sediment from the Pearl River system, South China, using effect-directed in vitro bioassay. Environmental Toxicology and Chemistry 2011; 30 (10):2208-2215.
36. Zhang YZ, Meng W, Zhang Y. Occurrence and partitioning of phenolic endocrine-Disrupting Chemicals (EDCs) Between Surface Water and Suspended Particulate Matter in the North Tai Lake Basin, Eastern China. Bull Environ Contam Toxicol 2014;92:148-53.
37. Barber LB, Loyo-Rosales JE, Rice CP, Minarik TA, Oskouie AK. Endocrine disrupting alkylphenolic chemicals and other contaminants in wastewater treatment plant effluents, urban streams, and fish in the Great Lakes and Upper Mississippi River Regions. Sci Total Environ 2015;517:195-206.
38. Stuart JD, Capulong CP, Launer KD, Pan X. Analyses of phenolic endocrine disrupting chemicals in marine samples by both gas and liquid chromatography–mass spectrometry. J Chromatogr A 2005;1079:136-45.
39. Gong J, Ran Y, Chen DY,Yang Y. Occurrence of endocrine-disrupting chemicals in riverine sediments from the Pearl River Delta, China. Mar Pollut Bull 2011; 63:556-63.
40. Pojana G, Gomiero A, Jonkers N, Marcomini A. Natural and synthetic endocrine disrupting compounds (EDCs) in water, sediment and biota of a coastal lagoon. Environ Int 2007;33:929-36.
41. Jiang W, Yan Y, Ma M, Wang D, Luo Q, Wang Z, et al. Assessment of source water contamination by estrogenic disrupting compounds in China. J Environ Sci 2012;24:320-8.
42. Jobling S, Nolan M, Tyler CR, Brighty G, Sumpter JP. Widespread sexual disruption in wild fish. Environ Sci Technol 1998;32:2498-506.
43. Hashimoto S, Horiuchi A, Yoshimoto T, Nakao M, Omura H, Kato Y, et al. Horizontal and Vertical Distribution of Estrogenic Activities in Sediments and Waters from Tokyo Bay, Japan. Environ Contam Toxicol 2005; 48:209-16.
44. Dias ACV, Gomes FW, Bila DM, Sant'Anna Jr GL, Dezotti M. Analysis of estrogenic activity in environmental waters in Rio de Janeiro state (Brazil) using the yeast estrogen screen. Ecotoxicol Environ Saf 2015;120:41-7.

Abstract: **Endocrine Disrupting Chemicals and Estrogenic Activity in Surface Water, Sediment, and Fish from the Nan River, Phitsanulok, Thailand**

Saowanee Deemoon, Ph.D.*; Charoon Sarin, Ph.D.; Kanokthip Juksu, M.S.***; Guang-GuoYing, Ph.D.***; Chanyud Kritsunankul, Ph.D.**; Sarin Sriprang, Ph.D. ****

** Office of Disease Prevention and Control Region 2, Phitsanulok, Thailand; ** Naresuan University Phitsanulok, Thailand; *** State Key Laboratory of Organic Geochemistry, Guangzhou Institute of Geochemistry, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou, China*

Journal of Health Science 2019;28:68-80.

Endocrine disrupting chemicals (EDCs) as known as emerging compounds which are found in natural hormones, pharmaceutical and personal care products. EDCs may associate with altered reproductive function in human and wildlife. This study aimed to determine EDCs and test estrogenic activity in surface water, sediment, and fish samples in the Nan River, Phitsanulok Province, Thailand. The samples were collected from 12 sites along the Nan River (upstream to downstream). The target compounds (Octylphenol; OP, Nonylphenol; NP, Bisphenol A; BPA, and Estrone; E1) were determined by chemical analysis (GC-MS) and estrogenic activities were also measured by Yeast Estrogen Screen (YES) bioassay. OP, NP, BPA, and E1 were detected in surface water from each sampling site, with concentration in ranges of 1-10 ng/L, 244-1062 ng/L, 43-1421 ng/L, and ND-10 ng/L, respectively. In sediment samples, NP, BPA, and E1 were found with concentration in ranges of 6-57 ng/g, 5-8 ng/g, and 1-11 ng/g respectively. For fish samples, OP, NP, BPA, and E1 were found with concentration in ranges of 62-600 ng/g, 5624-57281 ng/g, 9-52 ng/g, and 6-122 ng/g , respectively. Estrogenic activity in term of EEQs in water samples ranged from 0-0.98 ng/L, sediment samples ranged from 0-0.17 ng/g, and in fish samples ranged from 0.09-1.24 ng/g. Although EDCs concentrations in surface water and sediment of the Nan River were found in low level, however they having minimal to medium estrogenic risks which can harmful to aquatic organisms. This research for the first time reported of EDCs in surface water, sediment, and fish from the Nan River, Phitsanulok, Thailand. The results provide evidence that EDCs commonly occur in the Nan River may due to the contamination of wastewater.

Key words: **estrogenic activity, endocrine disrupting chemicals, surface water, sediment, fish, risk assessment**