

การศึกษาร่วมกันในวิธีวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์อะมีทริน (ametryn) ในผลิตภัณฑ์วัตถุอันตรายทางการเกษตร

Collaborative Study for Determination the Active Ingredients ametryn in Pesticide Products

พิเชษฐ์ ทองละเอียด¹ พินิตนันต์ สรวายเอี่ยม² สุกัญญา คำคง³ ภัทรฤทัย คมนันธุ์⁴ นงพะงา โอลเซน¹
สุธินี สาสิทธิ์² สุภาพร บังพรม³ มณฑาทิพย์ อรุณวารากรณ์⁴ ประไพ หงษา⁵ นิกร โคตรสมบัติ⁶
สาวิตรี เขมวงศ์⁷

Pichet Tongla-eard¹ Pinitnun Sruay-iam² Sukanya Khomkong³ Phatruethai Kumnat⁴
Nongpanga Olsen¹ Sutinee Saseelung² Supapron Bongprom³ Montatip Arunwarakorn⁴
Prapai Hongsa⁵ Nikorn Kotsombate⁶ Sawitri Khemvong⁷

กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร

กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

ABSTRACT

The collaborative study of ametryn in pesticide product. The method was adapted some parameter from CIPAC Handbook vol. H. This method was determined by GC-FID using Capillary column HP-5. This procedure was the first step from join up the participating laboratories, homogeneity testing, stability test and document that the procedure was the same step for 2 days. Finally was evaluated of the test results of the participating laboratories with outlier statistic by Cochran's test, Grubbs' test and HORAAT. The results from 16 participating laboratories of ametryn 80%WP (WP1, WP2), ametryn 80%WG (WG1, WG2) and ametryn 50%W/V SC (SC1, SC2). The test results of all 16 participating laboratories had HORRAT values 0.67-1.15 acceptance criteria of 0.5-2.0 based on AOAC (2016). The results obtained in this parameter was acceptable. This method can be used as a standard method of Department of Agriculture.

Keywords : collaborative study

¹ สำนักวิจัยและพัฒนการเกษตรเขตที่ 1

¹ Office of Agricultural Research and Development Region 1

² สำนักวิจัยและพัฒนการเกษตรเขตที่ 2

² Office of Agricultural Research and Development Region 2

³ สำนักวิจัยและพัฒนการเกษตรเขตที่ 4

³ Office of Agricultural Research and Development Region 4

⁴ สำนักวิจัยและพัฒนการเกษตรเขตที่ 5

⁴ Office of Agricultural Research and Development Region 5

⁵ สำนักวิจัยและพัฒนการเกษตรเขตที่ 6

⁵ Office of Agricultural Research and Development Region 6

⁶ สำนักวิจัยและพัฒนการเกษตรเขตที่ 7

⁶ Office of Agricultural Research and Development Region 7

⁷ สำนักวิจัยและพัฒนการเกษตรเขตที่ 8

⁷ Office of Agricultural Research and Development Region 8

บทคัดย่อ

การศึกษาร่วม Collaborative study ในวิธีวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์สารป้องกันกำจัดศัตรูพืช ametryn เป็นการพัฒนาร่วมกันเพื่อศึกษาวิธีการทดสอบที่ดัดแปลงวิธีบางประการจากวิธีมาตรฐาน CIPAC Handbook Vol. H โดยวิธีที่ทำการร่วมศึกษาใช้เทคนิค GC-FID ด้วยแคปิลารีคอลัมน์ HP-5 ขั้นตอนการร่วมศึกษาโดยทำการรับสมัครห้องปฏิบัติการทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกันและการคงตัวของผลิตภัณฑ์ จัดส่งตัวอย่างทดสอบและเอกสารให้กับห้องปฏิบัติการซึ่งทำการทดสอบขั้นตอนเดิมเป็นเวลา 2 วัน การประเมินผลการทดสอบของห้องปฏิบัติการที่เข้าร่วม ด้วยการตรวจสอบค่า Outlier โดยใช้สถิติ Cochran's test, Grubbs' test และค่า HORRAT ผลการทดสอบของห้องปฏิบัติการ 16 แห่งที่เข้าร่วมของ ametryn 80 %WP (WP1, WP2), ametryn 80 %WG (WG1, WG2) และ ametryn 50 %W/V SC (SC1, SC2) ผลการทดสอบของห้องปฏิบัติการ 16 แห่งที่เข้าร่วมทุกห้องปฏิบัติการมีค่า HORRAT อยู่ในช่วง 0.67-1.15 ตามเกณฑ์พิจารณาของ AOAC (2016) มีเกณฑ์ยอมรับอยู่ที่ 0.5-2.0 ซึ่งแต่ละสูตรความเข้มข้นผ่านเกณฑ์ยอมรับจึงสามารถนำวิธีทดสอบ ametryn ที่ผ่านการร่วมศึกษาใช้เป็นวิธีมาตรฐานการทดสอบของกรมวิชาการเกษตรได้

คำหลัก : การศึกษาร่วม

คำนำ

วิธีวิเคราะห์หาสารออกฤทธิ์อะมีทริน (ametryn) ในผลิตภัณฑ์วัตถุอันตรายทางการเกษตร มีระบุไว้ใน CIPAC Handbook Volume H (Dobrat and Martijn, 1998) โดยวิธี Gas chromatography และใช้ Column glass ห้องปฏิบัติการวิเคราะห์ ametryn ในประเทศไทยมีการทดสอบด้วยวิธี Gas chromatography กลุ่มงานพัฒนาระบบตรวจสอบคุณภาพวัตถุที่มีพิษการเกษตรจึงได้เลือกเทคนิคนี้มากำหนดเป็นวิธีทดสอบความถูกต้องและทดสอบความถูกต้องของวิธีโดยห้องปฏิบัติเดียวที่ห้องปฏิบัติการของกลุ่มวิจัยวัตถุที่มีพิษการเกษตร กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร นำค่าที่ได้มาประเมินผลทางสถิติ พบว่าเป็นวิธีที่เหมาะสม จึงนำวิธีนี้มาทำการศึกษาร่วมกัน (Collaborative Study) โดยคัดเลือกห้องปฏิบัติการทั้งภาครัฐและเอกชน จำนวน 16 แห่ง

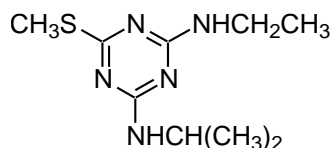
เตรียมตัวอย่างที่มีสารออกฤทธิ์ ametryn โดยแบ่งเป็น 3 สูตรของผลิตภัณฑ์ สูตรละ 2 ตัวอย่าง รวม 6 ตัวอย่าง ส่งให้ห้องปฏิบัติการพร้อมวิธีที่จัดทำขึ้น นำผลที่ได้จากห้องปฏิบัติการมาประเมินผลโดยใช้สถิติที่เหมาะสมตาม Guidelines for Collaborative Study Procedures To Validate Characteristics of a Method of Analysis (George and Latimer, 2016)

การทำ Collaborative study จัดเป็น multi – laboratory method validation เป็นการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ที่สมบูรณ์และน่าเชื่อถือที่สุดซึ่งต้องมีการดำเนินการตามขั้นตอน (protocol) ที่นานาชาติยอมรับส่งผลให้วิธีวิเคราะห์ที่ผ่านการทำ collaborative study มีความน่าเชื่อถือและเป็นที่ยอมรับในระดับนานาชาติ (ทิพวรรณ , 2549)

Ametryn มีลักษณะทางเคมีต่างๆดังนี้

Chemical name: N2-ethyl-N4-isopropyl-6-methylthio-1,3,5-triazine-2,4-diamine
Common name: ametryn
CAS RN: 834-12-8

Structure:



Molecular weight: 227.3

Empirical formula: C₉H₁₇N₅S

Activity: Herbicide

คงสภาพในธรรมชาติและสภาวะที่เป็นกรดและด่างอ่อนๆ เกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสโดยกรดแก่ pH 1 และด่างแก่ pH 13 และสลายตัวช้าๆด้วยแสง (Turner, 2018)

การทำ collaborative study ครั้งนี้เพื่อให้ได้วิธีที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ ametryn และเป็นที่ยอมรับของผู้ที่เกี่ยวข้องทุกภาคส่วน และนำไปใช้เป็นวิธีมาตรฐานของห้องปฏิบัติการในส่วนของกรมวิชาการเกษตร และส่วนของบริษัทเอกชนต่อไป

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. เครื่อง gas chromatography ที่ติดตั้งตัวตรวจวัดชนิด flame ionization detector (FID)
2. คอลัมน์ชนิด capillary ภายในเคลือบด้วย 5% phenyl methyl siloxane (HP-5)
3. เครื่องชั่งละเอียด 4 ตำแหน่ง (ซึ่งได้ระดับ 0.1 มิลลิกรัม) ที่ผ่านการสอบเทียบแล้ว
4. Ultrasonic bath
5. ขวดปริมาตรชนิด type A ขนาด 10 และ 50 มิลลิลิตรที่ผ่านการสอบเทียบแล้ว
6. บีกเกอร์ ขนาด 100 มิลลิลิตร
7. vial ขนาด 2 มิลลิลิตร
8. syringe ขนาด 10 มิลลิลิตร
10. syringe filters 0.22 ไมโครเมตร
11. สารมาตรฐาน ametryn purity 99.32 %
12. ametryn 80% W/W WP1
13. ametryn 80% W/W WP2
14. ametryn 80% W/W WG1
15. ametryn 80% W/W WG2
16. ametryn 50% W/V SC1
17. ametryn 50% W/V SC2
18. Acetone AR grade

วิธีการ

1. ส่งแบบตอบรับไปยังห้องปฏิบัติการ

ส่งแบบตอบรับการเข้าร่วมไปยังห้องปฏิบัติที่สนใจการศึกษาร่วมกัน (collaborative study) ทั้งในส่วนราชการและเอกชน

2. ทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกัน (homogeneity test)

ทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกันของตัวอย่าง โดยสุ่มตัวอย่างแบบ random ในแต่ละสูตรของผลิตภัณฑ์ตัวอย่างละ 10 ขวด ตรวจวิเคราะห์หาปริมาณ ametryn โดยทดสอบแบบสุ่มขวดละ 2 ขวด นำผลที่ได้มาทดสอบความแตกต่างระหว่างตัวอย่าง (between sample variation) โดยใช้สถิติ One-way ANOVA (Analysis of Variance) ค่า F ที่คำนวณได้ต้องน้อยกว่า F critical ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

3. การทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์โดยห้องปฏิบัติการเดียว

โดยเลือกวิธีที่มีการทดสอบความถูกต้องของห้องปฏิบัติการเดียวที่ห้องปฏิบัติการของกลุ่มวิจัยวัฏภูมิพิษ กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตรได้จัดทำขึ้น

การหาความเข้มข้นของ ametryn โดยวิธี Gas chromatography มี condition ดังนี้

Capillary column	:	HP-5 (30 m x 0.32 mm (i.d.) film thickness 0.25 μ m)
Oven temperature	:	210 °C
Injector temperature	:	250 °C
Detector temperature	:	250 °C
Split injector	:	Split ratio 50:1
Carrier gas	:	Helium 2.0 ml/min
Gas detector	:	Hydrogen 40.0 ml/min Air 400.0 ml/min
Make up gas	:	Nitrogen 40.0 ml/min
Injection volume	:	1 μ l
Run time	:	5 min

3.1. การเตรียมสารละลายมาตรฐาน ametryn

ชั่งสารมาตรฐาน ametryn ให้มีปริมาณสารออกฤทธิ์ 10 ± 2 mg จำนวน 2 ขวด (C_1 , C_2) ลงในขวดวัดปริมาตร 10 ml ละลายด้วย acetone ปริมาตร 5 ml เขย่าให้เข้ากันด้วย ultrasonic bath 5 นาที ปล่อยให้สารปรับตัวที่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรให้เป็น 10 ml ด้วย acetone เขย่าให้เข้ากัน แบ่งใส่ขวด นำไปฉีดเข้าเครื่อง GC-FID

3.2 การเตรียมสารละลายตัวอย่าง

ชั่งตัวอย่างผลิตภัณฑ์วัฏภูมิพิษทางการเกษตร ametryn สูตร WP, WG และ SC ให้มีปริมาณสารออกฤทธิ์ 50 ± 10 mg ตัวอย่างละ 1 ขวด ลงในขวดวัดปริมาตร 50 ml ละลายด้วย acetone ปริมาตร 25 ml เขย่าให้เข้ากันด้วย ultrasonic bath 5 นาที ปล่อยให้สารปรับตัวที่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรให้เป็น 50 ml ด้วย acetone เขย่าให้เข้ากัน แบ่งใส่ขวด นำไปฉีดเข้าเครื่อง GC-FID

3.3 วิธีฉีดสารละลายมาตรฐาน และสารละลายตัวอย่าง

นำสารละลายมาตรฐาน และสารละลายตัวอย่างที่ได้จากการเตรียมข้างต้นนำมาวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-FID โดยทำการฉีดสารมาตรฐาน C_1 จำนวน 8 ขวดเพื่อทำ Equilibrate ตรวจสอบความพร้อมของเครื่อง จากนั้นทำการฉีดตามลำดับดังนี้ C_1 , WP_{1-1} , WP_{1-2} , C_2 , C_1 , WP_{2-1} , WP_{2-2} , C_2 , C_1 , WG_{1-1} , WG_{1-2} , C_2 , C_1 , WG_{2-1} , WG_{2-2} , C_2 , C_1 , SC_{1-1} , SC_{1-2} , C_2 , C_1 , SC_{2-1} , SC_{2-2} , C_2 ,

3.4 ทดสอบซ้ำตามข้อ 1-4 ในวันถัดไป

3.5 นำผลทดสอบที่ได้บันทึกลงในตารางบันทึกผล

4. การส่งตัวอย่างทดสอบและเอกสารวิธีวิเคราะห์ให้ห้องปฏิบัติการ

ส่งตัวอย่างวิธีวิเคราะห์ คำแนะนำ แบบรายงานผล และแบบสอบถามรายละเอียดเกี่ยวกับการตรวจวิเคราะห์ เพื่อใช้ในการติดต่อกับผู้ดำเนินการ ส่งทางไปรษณีย์ลงทะเบียน โดยแต่ละห้องปฏิบัติการจะได้รับตัวอย่าง 3 ตัวอย่าง ตัวอย่างละ 2 ขวดที่มีรหัสต่างกัน โดยไม่ทราบวาทัง 2 ขวดเป็นตัวอย่างเดียวกัน

5. การทดสอบความคงตัว (Stability test)

เมื่อครบกำหนดที่ให้แต่ละห้องปฏิบัติการส่งผลการวิเคราะห์กลับมาแล้ว ดำเนินการคัดเลือกตัวอย่างที่ผ่านการทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกัน เป็นตัวแทนในการทดสอบการคงตัวของตัวอย่าง โดยสุ่มตัวอย่างมา 5 ขวด ทำการวิเคราะห์หลังจากวันที่ครบกำหนดการส่งผล ทำการวิเคราะห์ขวดละ 2 ซ้ำ และนำผลวิเคราะห์ที่ได้มาเปรียบเทียบกับผลวิเคราะห์จากการทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกันโดยใช้สถิติ t-test ค่า t จะต้องน้อยกว่า t critical ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

6. การประเมินทางสถิติ (Statistic evaluation of results)

6.1 ทวนสอบข้อมูลผลการวิเคราะห์และข้อมูลต่างๆ จากทางห้องปฏิบัติการที่ได้ส่งกลับมา โดยศึกษาข้อมูลในแบบรายงานผลและแบบสอบถามรายละเอียดเกี่ยวกับการตรวจวิเคราะห์ของแต่ละห้องปฏิบัติการ เพื่อกำจัดผลวิเคราะห์ที่ไม่ถูกต้อง หรือผลวิเคราะห์ที่เห็นได้ชัดว่าไม่น่าเชื่อถือ ออกก่อนนำไปประมวลผลทางสถิติ เพื่อให้มั่นใจว่าข้อมูลที่ถูกต้องและน่าเชื่อถือมาใช้ในการประเมินผล

6.2 การทดสอบค่าสุดต่าง (Outliers test) โดยข้อมูลที่มีค่าแตกต่างกันทั้งมากและน้อยจากข้อมูลในชุดเดียวกันที่ทำให้สงสัยว่าเป็นข้อมูลที่ไม่อยู่ในกลุ่มเดียวกัน จะถูกนำมาทดสอบค่าสุดต่าง โดยสถิติ Cochran's test และ Grubbs' test ดำเนินการตาม Guidelines for Collaborative Study Procedures To Validate Characteristics of a Method of Analysis

6.2.1 ทดสอบค่าสุดต่างของห้องปฏิบัติการเดียว (within-laboratory outliers test)

ผลวิเคราะห์ของห้องปฏิบัติการที่มีความแตกต่างของค่าที่ได้จากการวิเคราะห์ของคู่เดียวกันมากที่สุดเมื่อเทียบกับผลวิเคราะห์ของคู่ตัวอย่างเดียวกันจากห้องปฏิบัติการอื่นๆ จะถูกนำมาทดสอบค่าสุดต่างหรือไม่โดยใช้สถิติ Cochran's test

$$C = \frac{(D_{\max}^2) \times 100}{(\sum D_i^2)}$$

เมื่อ D_{\max} = ค่าแตกต่างของคู่ตัวอย่างที่มีค่าสูงสุด

D_i = ค่าแตกต่างของคู่ตัวอย่างที่ i เมื่อ $i = 1, 2, 3, \dots, n$

เปรียบเทียบค่า C ที่คำนวณได้กับค่าวิกฤตในตาราง ที่ระดับ $P = 2.5\%$ (1-tail) เมื่อ L คือ จำนวนห้องปฏิบัติการ หรือจำนวนคู่ของตัวอย่างเดียวกัน ถ้าค่าที่คำนวณได้มากกว่าค่าวิกฤตแสดงว่ามีความแตกต่างของผลวิเคราะห์ตัวอย่างนั้นถือว่าค่าที่สงสัยนั้นเป็น outlier ให้ตัดค่าผลวิเคราะห์คู่ตัวอย่างนั้นออก

6.2.2 ทดสอบค่าสุดต่างระหว่างห้องปฏิบัติการ (inter-laboratory outliers test)

6.2.2.1 ค่าสงสัยมีค่าเดียว (single Grubbs' test)

คำนวณค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของข้อมูลทั้งหมด (S) คำนวณค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของข้อมูลเมื่อไม่มีค่าต่ำสุดของข้อมูล (S_L) และเบี่ยงเบนมาตรฐานของข้อมูลเมื่อไม่มีค่าสูงสุดของข้อมูล (S_H) คำนวณค่าร้อยละของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานที่ลดลงดังนี้

$$G_L = 100 \times [1 - (S_L/S)]$$

$$G_H = 100 \times [1 - (S_H/S)]$$

เมื่อ G_L เท่ากับร้อยละของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานที่ลดลงเมื่อไม่มีค่าต่ำสุดของข้อมูล

เมื่อ G_H เท่ากับร้อยละของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานที่ลดลงเมื่อไม่มีค่าสูงสุดของข้อมูล

เปรียบเทียบค่า G_L , G_H ที่คำนวณได้กับตารางค่าวิกฤตในตาราง Grubbs' test ที่จำนวน L ข้อมูล ถ้าค่า G สูงกว่าค่าวิกฤตที่ $P = 2.5\%$ (2-tail) แสดงว่าค่าที่สงสัยเป็น outlier

6.2.2.2 ค่าสงสัยมี 2 ค่า (double Grubbs' test)

คำนวณค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของข้อมูลทั้งหมด (S) คำนวณค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของข้อมูลเมื่อไม่มีค่าต่ำสุด 2 ค่าของข้อมูล (S_{2L}) และเบี่ยงเบนมาตรฐานของข้อมูลเมื่อไม่มีค่าสูงสุด 2 ของข้อมูล (S_{2H}) และเมื่อไม่มีค่าต่ำสุดและสูงสุดของข้อมูล (S_{HL}) คำนวณค่า G_{2L} , G_{2H} , และ G_{HL} ตามสูตรดังนี้

$$G_{2L} = 100 \times [1 - (S_{2L}/S)]$$

$$G_{2H} = 100 \times [1 - (S_{2H}/S)]$$

$$G_{HL} = 100 \times [1 - (S_{HL}/S)]$$

เมื่อ G_L เท่ากับร้อยละของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานที่ลดลงเมื่อไม่มีค่าต่ำสุดของข้อมูล

เมื่อ G_H เท่ากับร้อยละของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานที่ลดลงเมื่อไม่มีค่าสูงสุดของข้อมูล

เมื่อ G_{HL} เท่ากับร้อยละของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานที่ลดลงเมื่อไม่มีค่าต่ำและค่าสูงสุดของข้อมูล

เปรียบเทียบค่า G_L , G_H และ G_{HL} ที่คำนวณได้กับตารางค่าวิกฤตในตาราง Grubbs' test ที่จำนวน L ข้อมูล ถ้าค่า G สูงกว่าค่าวิกฤตที่ $P = 2.5\%$ (2-tail) แสดงว่าค่าที่สงสัยเป็น outlier

6.2.3 คำนวณความเที่ยงของวิธี (precision)

นำข้อมูลที่เหลือจากการตัดค่าสุดต่างออกทั้ง Cochran's test และ Grubbs' test แล้วนำไปคำนวณค่าทางสถิติอื่นๆ โดยการคำนวณ

Repeatability standard deviation; $S_r = (\sum d_i^2 / 2L)^{1/2}$

เมื่อ d_i = ความต่างของผลวิเคราะห์ของคู่ตัวอย่างเดียวกัน

L = จำนวนห้องปฏิบัติการ (หรือจำนวนคู่ของตัวอย่างเดียวกัน)

Repeatability relative standard deviation; $\%RSD_r = \frac{(S_r \times 100)}{\text{mean}}$

Repeatability limit; $r = 2.8 S_r$

Reproducibility standard deviation; $S_R = \{(S_d^2 + S_r^2)/2\}^{1/2}$

เมื่อ $S_d^2 = \frac{\sum (T_i - T)^2}{2(L - 1)}$

T_i = ผลรวมค่าของคู่ของตัวอย่าง i ของแต่ละห้องปฏิบัติการ

T = ค่าเฉลี่ยของค่า T_i ของทุกห้องปฏิบัติการ

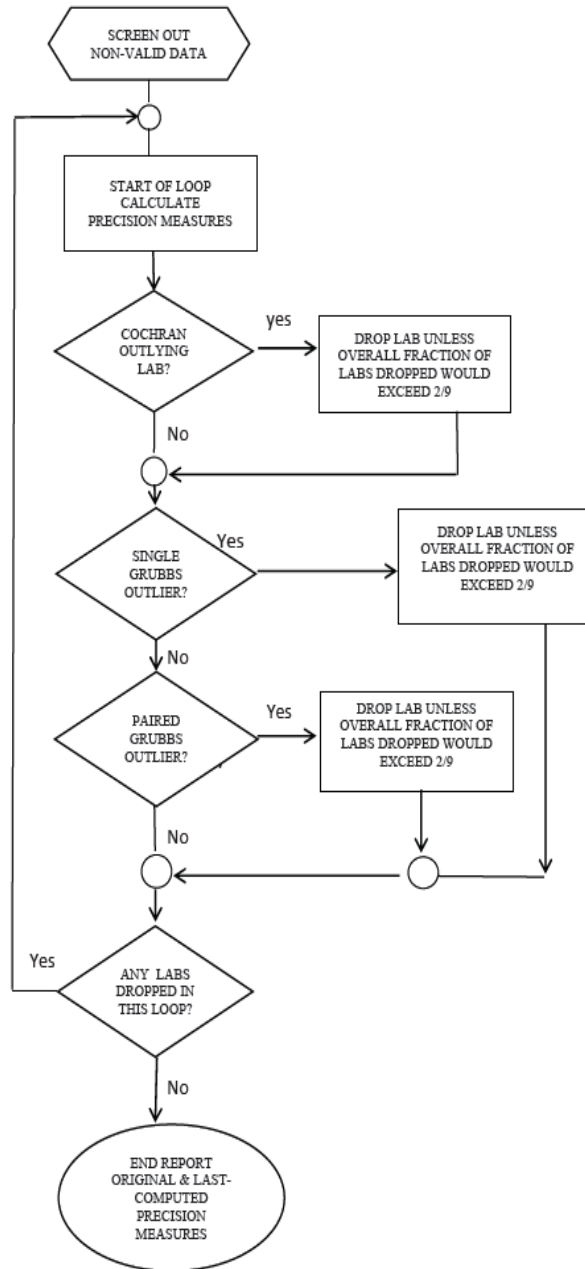
L = จำนวนห้องปฏิบัติการ (หรือจำนวนคู่ของตัวอย่างเดียวกัน)

Reproducibility relative standard deviation; $\%RSD_R = \frac{(S_R \times 100)}{\text{mean}}$

Reproducibility limit; $R = 2.8 S_R$

6.2.4 HORRAT

โดยค่า HORRAT คือ อัตราส่วนระหว่าง ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (Relative Standard Deviation, $\%RSD_R$) ค่า Horwitz's equation ($\%RSD_{\text{Horwitz}}$)



ภาพที่ 1 ขั้นตอนการประเมินผลทางสถิติ (George and Latimer, 2016)

ระยะเวลา เริ่มต้น ตุลาคม 2562 สิ้นสุด กันยายน 2564

สถานที่ทำการทดลอง ห้องปฏิบัติการกองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. ทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกัน (homogeneity testing)

จากการทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกันของตัวอย่าง ametryn ทั้ง 3 ตัวอย่าง โดยใช้ one-way ANOVA ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P=0.05$) พบว่าทุกตัวอย่าง มีค่า F น้อยกว่าค่า F-critical แสดงว่าตัวอย่างมีความเป็นเนื้อเดียวกัน แสดงผลดังตาราง 1-3

ตารางที่ 1 Anova: Single Factor WP

SUMMARY

Groups	Count	Sum	Average	Variance
replicate 1	10	806.64	80.664	0.345537778
replicate 2	10	805.62	80.562	0.456395556

ANOVA

Source of Variation	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Between Groups	0.05202	1	0.05202	0.12973647	0.722897214	4.413873419
Within Groups	7.2174	18	0.400966667			
Total	7.26942	19				

ตารางที่ 2 Anova: Single Factor WG

SUMMARY

Groups	Count	Sum	Average	Variance
replicate 1	10	813.42	81.342	0.358328889
replicate 2	10	810.79	81.079	1.073121111

ANOVA

Source of Variation	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Between Groups	0.345845	1	0.345845	0.483209333	0.495848799	4.413873419
Within Groups	12.88305	18	0.715725			
Total	13.228895	19				

ตารางที่ 3 Anova: Single Factor SC

SUMMARY

Groups	Count	Sum	Average	Variance
replicate 1	10	464.74	46.474	0.175004444
replicate 2	10	468.23	46.823	0.566312222

ANOVA

Source of Variation	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Between Groups	0.609005	1	0.609005	1.643036039	0.216174782	4.413873419
Within Groups	6.67185	18	0.370658333			
Total	7.280855	19				

2. การส่งตัวอย่างทดสอบและเอกสารวิธีวิเคราะห์ให้ห้องปฏิบัติการ นำตัวอย่างที่ผ่านการทดสอบเป็นเนื้อเดียวกันแล้ว พร้อมด้วยสารมาตรฐานและเอกสารต่างๆให้กับห้องปฏิบัติการที่เข้าร่วมโครงการจำนวน 16 ห้องปฏิบัติการ ดังภาพที่ 2



ภาพที่ 2 สารมาตรฐานและตัวอย่างเตรียมส่งห้องปฏิบัติการที่เข้าร่วมโครงการ

3. การทดสอบความคงตัว (Stability test)

ผลวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์ ametryn ในผลิตภัณฑ์วัตถุอันตรายทางการเกษตร โดยตัวอย่างละ 5 ขวด ขวดละ 2 กรัม เมื่อนำไปเปรียบเทียบกับผลวิเคราะห์จากการทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกันของตัวอย่าง ด้วยสถิติ t-test พบว่าค่า P-value มากกว่า 0.05 ดังนั้นตัวอย่างจึงมีความคงตัวตลอดช่วงการดำเนินโครงการ (ตารางที่ 4-6)

ตารางที่ 4 ทดสอบการคงสภาพของ ametryn สูตร WP

รายการทดสอบ	N	Average	SD	t Stat	P-value (t-test)>0.05
homogeneity WP	20	80.613	0.382	1.425	0.164
stability WP	10	80.291	0.250		

ตารางที่ 5 ทดสอบการคงสภาพของ ametryn สูตร WG

รายการทดสอบ	N	Average	SD	t Stat	P-value (t-test)>0.05
homogeneity WG	20	81.210	0.696	0.431	0.669
stability WG	10	81.078	0.486		

ตารางที่ 6 ทดสอบการคงสภาพของ ametryn สูตร SC

รายการทดสอบ	N	Average	SD	t Stat	P-value (t-test)>0.05
homogeneity SC	20	46.648	0.383	0.753	0.457
stability SC	10	46.488	0.132		

4. การประเมินทางสถิติ (Statistic evaluation of results)

4.1 ทวนสอบข้อมูลผลการวิเคราะห์และข้อมูลต่างๆ จากทางห้องปฏิบัติการที่ร่วมทดสอบโดยศึกษาข้อมูลในแบบรายงานผลและแบบสอบถามรายละเอียดเกี่ยวกับการตรวจวิเคราะห์ของแต่ละห้องปฏิบัติการ (ตารางที่ 7)

ตารางที่ 7 ผลการทดสอบ ametryn ในสูตรต่างๆของแต่ละห้องปฏิบัติการ

Lab no.	สูตร WP		สูตร WG		สูตร SC	
	WP1	WP2	WG1	WG2	SC1	SC2
1	79.672	78.592	79.358	45.765	45.765	45.765
2	79.494	78.841	79.774	45.891	45.891	45.891
3	78.383	78.159	78.777	45.615	45.615	45.615
4	81.879	82.423	82.160	47.482	47.482	47.482
5	80.487	79.903	80.311	46.694	46.694	46.694
6	80.355	80.328	79.814	45.936	45.936	45.936
7	79.348	79.547	79.329	45.862	45.862	45.862
8	81.587	81.250	81.352	47.276	47.276	47.276
9	79.558	80.436	81.636	46.644	46.644	46.644
10	80.324	80.254	80.394	46.480	46.480	46.480
11	79.607	80.754	79.920	46.085	46.085	46.085
12	80.239	79.829	79.134	46.573	46.573	46.573
13	83.743	86.143	85.507	48.798	48.798	48.798
14	81.146	81.112	80.372	46.837	46.837	46.837
15	81.120	81.475	83.698	45.754	45.754	45.754
16	80.768	78.592	80.711	46.075	46.075	46.075

4.2 การทดสอบค่าสุดต่าง (Outliers test) โดยข้อมูลที่มีค่าแตกต่างกันทั้งมากและน้อยจากข้อมูลในชุดเดียวกันที่ทำให้สงสัยว่าเป็นข้อมูลที่ไม่อยู่ในกลุ่มเดียวกัน จะถูกนำมาทดสอบค่าสุดต่าง โดยสถิติ Cochran's test และ Grubbs' test (ตารางที่ 8-13)

ตารางที่ 8 ผลการทดสอบค่าสุดต่างของ ametryn 80% WP1 แต่ละห้องปฏิบัติการ

Lab no.	Day1	Day2	Mean	Std.Dev.	Notes
1	79.84	79.51	79.67	0.231	
2	80.40	78.59	79.49	1.278	
3	78.08	78.69	78.38	0.432	
4	79.98	83.78	81.88	2.688	
5	80.44	80.54	80.49	0.071	
6	79.42	81.29	80.36	1.325	
7	80.03	78.67	79.35	0.964	
8	82.07	81.10	81.59	0.686	
9	80.69	78.43	79.56	1.599	
10	79.43	81.22	80.32	1.269	
11	78.93	80.29	79.61	0.960	
12	79.96	80.52	80.24	0.397	
13	87.95	79.54	83.74	5.946	C
14	81.12	81.17	81.15	0.033	
15	80.00	80.63	81.12	1.590	
16	80.63	80.91	80.77	0.197	

C – Cochran outlier, G – Grubb outlier

ตารางที่ 9 ผลการทดสอบค่าสุดต่างของ ametryn 80% WP2 แต่ละห้องปฏิบัติการ

Lab no.	Day1	Day2	Mean	Std.Dev.	Notes
1	78.79	78.40	78.59	0.275	
2	78.93	78.75	78.84	0.127	
3	78.07	78.25	78.16	0.128	
4	80.86	83.99	82.42	2.210	
5	80.58	79.22	79.90	0.962	
6	79.88	80.78	80.33	0.636	
7	79.70	79.40	79.55	0.213	
8	81.78	80.72	81.25	0.752	
9	80.35	80.52	80.44	0.123	
10	80.73	79.78	80.25	0.666	
11	80.45	81.06	80.75	0.431	
12	79.89	79.77	79.83	0.085	
13	89.41	82.88	86.14	4.615	C
14	80.85	81.37	81.11	0.365	
15	81.62	81.33	81.48	0.202	
16	81.58	79.34	80.46	1.581	

C – Cochran outlier, G – Grubb outlier

ตารางที่ 10 ผลการทดสอบค่าสุดท้ายของ ametryn 80% WG1 แต่ละห้องปฏิบัติการ

Lab no.	Day1	Day2	Mean	Std.Dev.	Notes
1	79.78	78.93	79.36	0.600	
2	77.77	81.78	79.77	2.834	
3	78.83	78.73	78.78	0.071	
4	80.81	83.51	82.16	1.916	
5	80.34	80.28	80.31	0.045	
6	79.30	80.33	79.81	0.734	
7	79.78	78.88	79.33	0.634	
8	81.71	80.99	81.35	0.508	
9	80.71	82.56	81.64	1.308	
10	81.13	79.66	80.39	1.044	
11	79.49	80.35	79.92	0.610	
12	79.95	78.31	79.13	1.160	
13	86.32	84.70	85.51	1.145	
14	80.51	80.24	80.37	0.188	
15	83.24	84.15	83.70	0.644	
16	80.57	80.85	80.71	0.196	

C – Cochran outlier, G – Grubb outlier

ตารางที่ 11 ผลการทดสอบค่าสุดท้ายของ ametryn 80% WG2 แต่ละห้องปฏิบัติการ

Lab no.	Day1	Day2	Mean	Std.Dev.	Notes
1	79.63	79.15	79.39	0.339	
2	80.12	77.01	78.57	2.199	
3	79.94	77.99	78.46	0.672	
4	78.53	82.80	80.66	3.024	
5	80.47	79.91	80.19	0.390	
6	78.97	80.01	79.49	0.730	
7	78.43	79.12	78.78	0.493	
8	81.47	80.57	81.02	0.634	
9	78.30	81.14	79.72	2.003	
10	81.07	81.46	81.27	0.277	
11	79.49	80.65	80.07	0.820	
12	78.32	78.71	78.52	0.279	
13	83.37	79.33	81.35	2.853	
14	80.19	80.39	80.29	0.139	
15	87.35	81.56	84.45	4.095	G
16	79.82	78.90	79.36	0.644	

C – Cochran outlier, G – Grubb outlier

ตารางที่ 12 ผลการทดสอบค่าสุดท้ายของ ametryn 50% SC1 แต่ละห้องปฏิบัติการ

Lab no.	Day1	Day2	Mean	Std.Dev.	Notes
1	45.93	45.92	45.92	0.005	
2	48.43	46.31	47.37	1.496	
3	45.86	45.73	45.79	0.091	
4	45.93	47.60	46.76	1.185	
5	46.27	46.32	46.30	0.038	
6	45.69	45.73	45.71	0.031	
7	45.71	45.97	45.84	0.185	
8	46.50	46.41	46.45	0.064	
9	45.88	47.58	46.73	1.102	
10	46.02	46.08	46.05	0.042	
11	45.66	46.17	45.92	0.358	
12	47.01	47.08	47.04	0.049	
13	53.59	45.78	49.68	5.520	C
14	47.20	47.13	47.16	0.047	
15	44.18	46.48	45.33	1.628	
16	45.48	45.38	45.43	0.074	

C – Cochran outlier, G – Grubb outlier

ตารางที่ 13 ผลการทดสอบค่าสุดท้ายของ ametryn 50% SC2 แต่ละห้องปฏิบัติการ

Lab no.	Day1	Day2	Mean	Std.Dev.	Notes
1	45.96	45.57	45.77	0.227	
2	46.78	45.00	45.89	1.257	
3	45.51	45.72	45.61	0.146	
4	46.70	48.26	47.48	1.104	
5	46.62	46.77	46.69	0.103	
6	45.84	46.04	45.94	0.141	
7	45.75	45.98	45.86	0.165	
8	47.55	47.00	47.28	0.386	
9	46.47	46.82	46.64	0.245	
10	46.38	46.58	46.48	0.145	
11	45.93	46.24	46.09	0.215	
12	46.35	46.80	46.57	0.317	
13	50.57	47.03	48.80	2.505	C
14	46.86	46.82	46.84	0.028	
15	45.16	46.35	45.75	0.843	
16	46.66	45.49	46.08	0.829	

C – Cochran outlier, G – Grubb outlier

จากการประเมินผลทางสถิติของผลการทดลองทั้ง 16 ห้องปฏิบัติการด้วย Cochran's test outliers และ Grubbs' test outliers (ตารางที่ 14)

ตารางที่ 14 สรุปผล Cochran's test outliers และ Grubbs' test outliers ของแต่ละตัวอย่าง ทั้ง 16 ห้องปฏิบัติการ

ชนิดตัวอย่าง	จำนวนห้องปฏิบัติการทั้งหมด	Cochran's test outliers	Grubbs' test outliers
WP1	16	1	0
WP2	16	1	0
WG1	16	0	0
WG2	16	0	1
SC1	16	1	0
SC2	16	1	0

4.3 การหาความเที่ยงของวิธี (precision)

นำข้อมูลที่ตัดค่า outlier ออกจากการประเมินด้วย Cochran's test และ Grubbs' test นำข้อมูลไปคำนวณค่าทางสถิติ (ตารางที่ 15)

ตารางที่ 15 ผลการคำนวณหาค่าความเที่ยงของวิธี (precision)

สถิติที่ใช้ทดสอบ	ชนิดตัวอย่าง					
	WP1	WP2	WG1	WG2	SC1	SC2
Total mean, X (wt%)	80.5	80.6	80.8	80.1	46.5	46.5
L	16	16	16	16	16	16
n	16	16	16	16	16	16
$S_r = (\sum d^2/2L)^{1/2}$	1.16	0.83	1.10	1.40	0.73	0.56
$S_R = \{(S_d^2+S_r^2)/2\}^{1/2}$	1.25	1.28	1.91	1.40	0.82	0.70
$RSD_r\% = (S_r*100)/\text{mean}$	1.44	1.03	1.26	1.75	1.57	1.21
$RSD_R\% = (S_R*100)/\text{mean}$	1.55	1.60	2.37	1.75	1.77	1.51
RSD%	2.0680	2.0680	2.0680	2.0680	2.2191	2.2191
PRSD _r %	2.07	2.07	2.06	2.07	2.24	2.24
HORRAT	0.75	0.77	1.15	0.85	0.79	0.67
Repeatability limit; $R = 2.8 S_r$	3.24	2.32	3.07	3.91	2.04	1.57
Reproducibility limit; $R = 2.8 S_R$	3.49	3.59	5.35	3.92	2.30	1.96

Total mean, X (wt%)

= average

L

= number of laboratories

S_r

= repeatability standard deviation

S_R

= reproducibility standard deviation

RSD_r

= repeatability relative standard deviation

RSD_R

= reproducibility relative standard deviation

n

= number of data

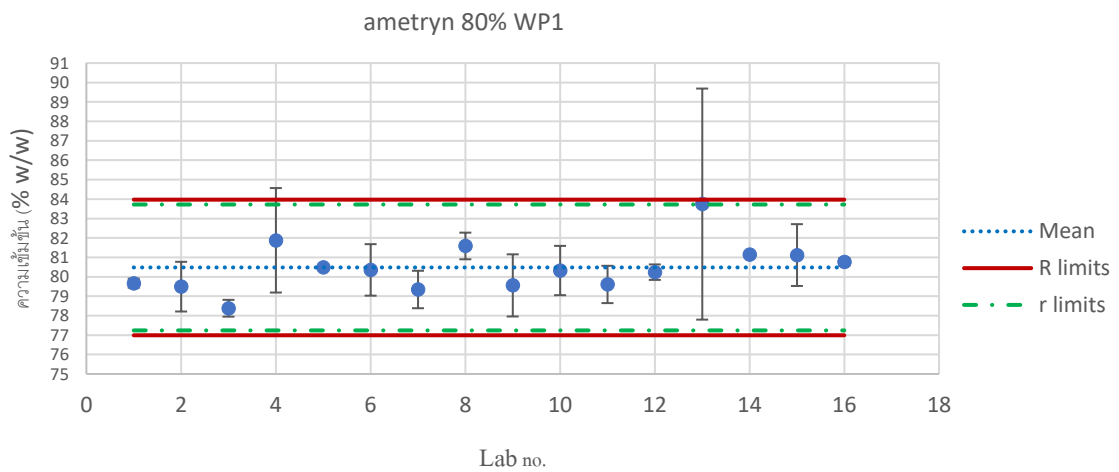
r

= repeatability limit

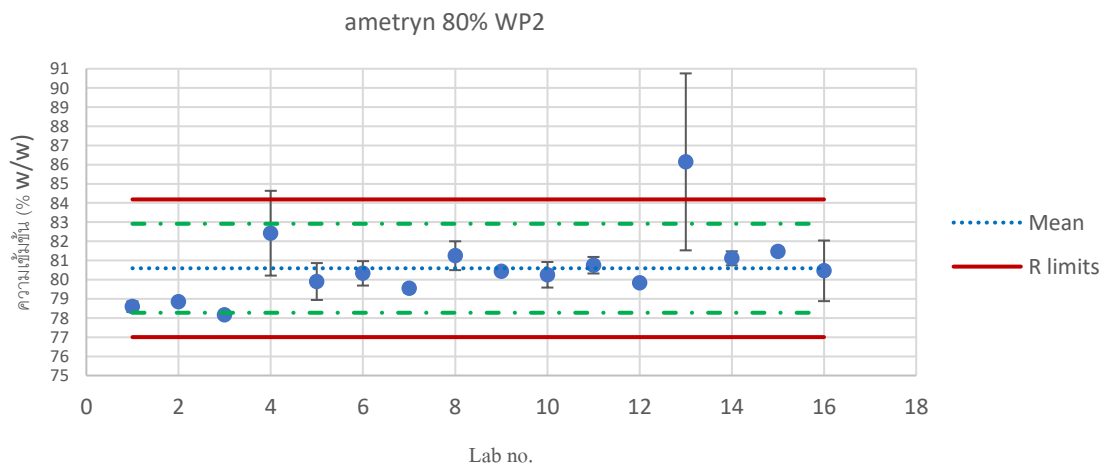
R

= reproducibility limit

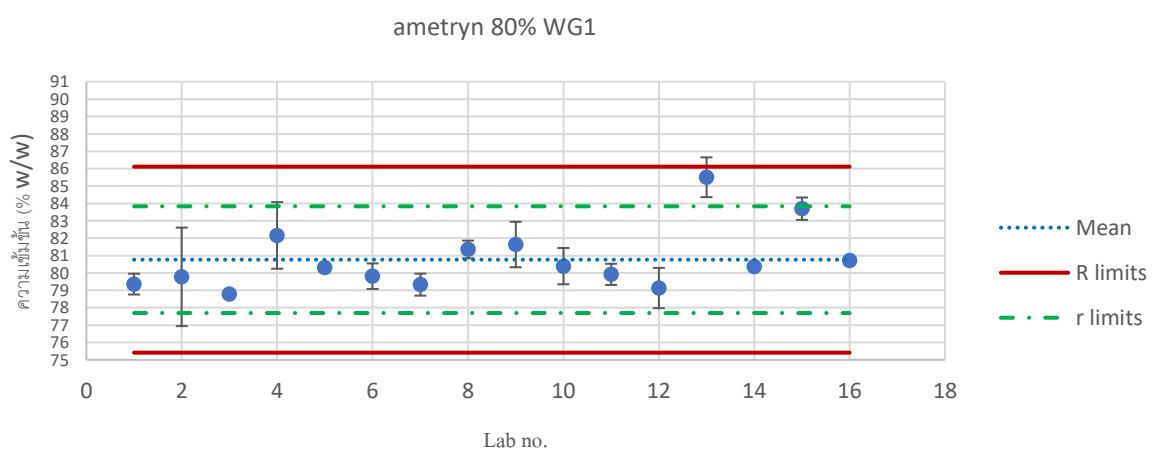
5. นำข้อมูลทุกห้องปฏิบัติการมาทำเป็นกราฟการเบี่ยงเบนมาตรฐานจากค่าเฉลี่ย



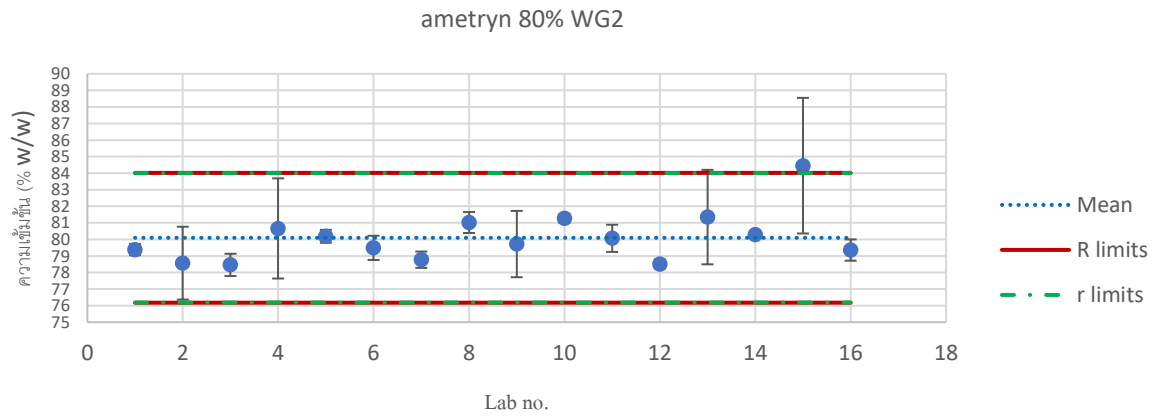
ภาพที่ 3 กราฟการเบี่ยงเบนจากค่าเฉลี่ย ของ WP1



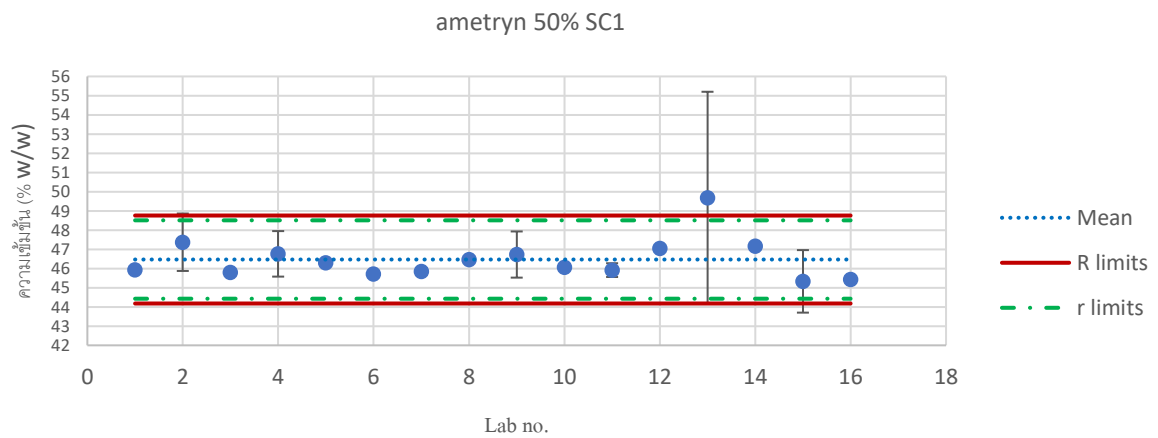
ภาพที่ 4 กราฟการเบี่ยงเบนจากค่าเฉลี่ย ของ WP2



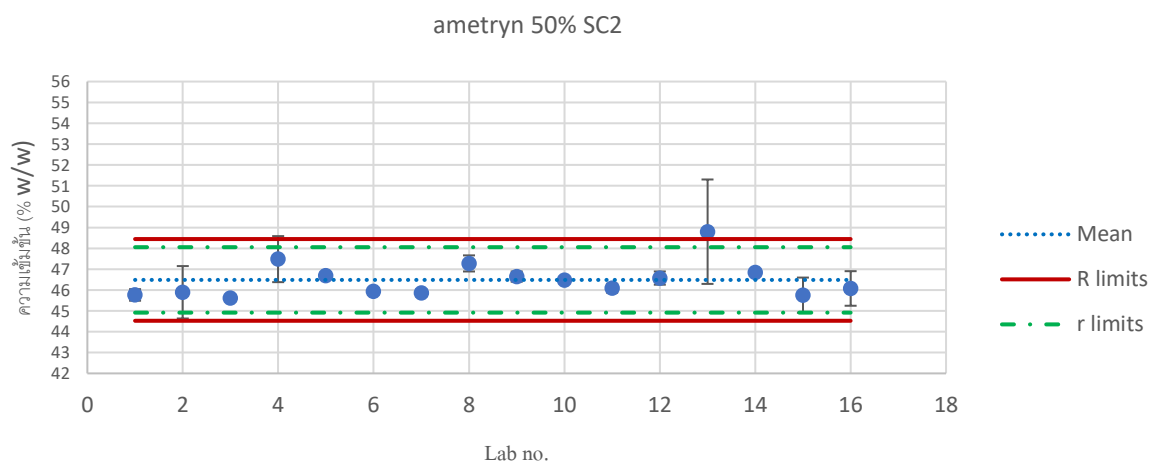
ภาพที่ 5 กราฟการเบี่ยงเบนจากค่าเฉลี่ย ของ WG1



ภาพที่ 6 กราฟการเบี่ยงเบนจากค่าเฉลี่ย ของ WG2



ภาพที่ 7 กราฟการเบี่ยงเบนจากค่าเฉลี่ย ของ SC1



ภาพที่ 8 กราฟการเบี่ยงเบนจากค่าเฉลี่ย ของ SC2

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ/คำแนะนำ

วิธีวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์อะมีทริน (ametryn) ในผลิตภัณฑ์วัตถุอันตรายทางการเกษตร ได้มีการพัฒนาจากการใช้ pack column จนได้เปลี่ยนมาเป็น capillary column ซึ่งเป็นที่นิยมในปัจจุบัน อีกทั้งเป็นวิธีที่ห้องปฏิบัติการหลายแห่งในประเทศเลือกใช้

ศึกษา collaborative study สารออกฤทธิ์อะมีทริน (ametryn) สูตร 80% WP, 80% WG และ 50% W/V SC โดยทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกันและความคงตัวของตัวอย่างโดยสถิติ one-way ANOVA พบว่า มีความเป็นเนื้อเดียวกันและมีความคงตัวจึงมีความเหมาะสมในการใช้ทำกิจกรรมนี้ มีห้องปฏิบัติการที่ร่วมทดสอบรวม 16 แห่ง

การศึกษา outlier ของข้อมูลโดยใช้สถิติ Grubbs' test พบว่ามีผลการทดสอบเป็น outlier สำหรับห้องปฏิบัติการที่ 15 ในตัวอย่าง WG2 และเมื่อใช้สถิติ Cochran's test พบว่ามีผลการทดสอบเป็น outlier สำหรับห้องปฏิบัติการที่ 13 ในตัวอย่าง WP1, WP2, SC1, SC2 ความเที่ยงแสดงด้วยค่า HORRAT มีค่าอยู่ที่ 0.67-1.15 เป็นค่าที่สอดคล้องกับค่าที่ยอมรับอยู่ในช่วง 0.5-1.5 ตามเกณฑ์พิจารณาของ AOAC (George and Latimer, 2016)

การศึกษา collaborative study ได้นำผลการทดสอบที่ได้จากห้องปฏิบัติการมาประเมินผลโดยใช้สถิติที่เหมาะสมตาม Guidelines for Collaborative Study Procedures To Validate Characteristics of a Method of Analysis (George and Latimer, 2016) เพื่อให้ได้วิธีที่จะใช้เป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์อะมีทริน (ametryn) ในผลิตภัณฑ์วัตถุอันตรายทางการเกษตร โดยแต่ละห้องปฏิบัติการสามารถนำวิธีนี้ไปใช้ในการตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์อะมีทริน (ametryn) ในผลิตภัณฑ์วัตถุอันตรายทางการเกษตรได้

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

1. ใช้เป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์อะมีทริน (ametryn) ในผลิตภัณฑ์วัตถุอันตรายทางการเกษตร
2. ห้องปฏิบัติการในส่วนภูมิภาคของกรมวิชาการเกษตร และบริษัทเอกชนสามารถนำวิธีนี้ไปเป็นวิธีมาตรฐานในการวิเคราะห์ได้

เอกสารอ้างอิง

- ทิพวรรณ นิ่งน้อย. 2549. แนวทางปฏิบัติการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ทางเคมีโดยห้องปฏิบัติการเดียว. นนทบุรี. กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข. หน้า 10.
- Dobrat, W. and A. Martijn. 1998. CIPAC Handbook Vol. H. Analysis of Technical and Formulated Pesticides. Collaborative International Pesticides Analytical Council Limited, Black Bear Press Ltd., England. p. 22-25.
- George W. and Jr., Latimer. 2016. Official methods of analysis of AOAC international. Appendix D: Guidelines for collaborative study procedures to validate characteristics of method of analysis. 20th ed. AOAC international, 2016. p. 1-12.
- Turner, J. A. 2018. A World Compendium The Pesticide Manual. 18th ed. BCPC., UK. p. 35-36.