

## รายงานเรื่องเต็มผลการทดลองที่สิ้นสุด ปีงบประมาณ 2557

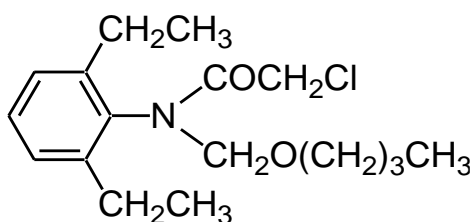
1. ชุดโครงการวิจัย แผนงานวิจัยและพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
2. โครงการวิจัย การพัฒนามาตรฐานระบบตรวจวิเคราะห์พืชและปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
- กิจกรรม 1 พัฒนาการตรวจวิเคราะห์ปุ๋ย พืช ดิน น้ำ สารอินทรีย์ สารควบคุมการเจริญเติบโตพืช สารสกัด และวัตถุอันตรายทางการเกษตร
- กิจกรรมย่อย 1.5 การวิจัยและพัฒนาเทคนิคการตรวจสอบรับรองผลิตภัณฑ์วัตถุพืชมทางการเกษตร
3. ชื่อการทดลอง(ภาษาไทย) การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์วัตถุพืชมทางการเกษตร Butachlor
- ชื่อการทดลอง(ภาษาอังกฤษ) Method Validation of Butachlor in Formulation
4. คณะผู้ดำเนินงาน
- ชื่อหัวหน้าโครงการ นางจิตติมา ยลาภูฐานนท์ สังกัด กลุ่มวิจัยเกษตรเคมี สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
- ชื่อหัวหน้าการทดลอง นายพิเชษฐ์ ทองละเอียด สังกัด กลุ่มวิจัยวัตถุพืชมทางการเกษตรสำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
- ผู้ร่วมงาน นางสาวนันทน์ อรุณ สังกัด กลุ่มวิจัยวัตถุพืชมทางการเกษตรสำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

### 5. บทคัดย่อ

การทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์กลุ่มสารกำจัดวัชพืช Butachlor ในผลิตภัณฑ์วัตถุอันตรายทางการเกษตรด้วยเทคนิค Gas Liquid Chromatography (GLC) มีความเหมาะสมสามารถใช้เป็นวิธีวิเคราะห์ที่ให้ผลถูกต้อง และแม่นยำ ยอมรับได้ตามเกณฑ์การยอมรับสากล เนื่องจาก วิธีการนี้ให้ค่า Range ในช่วงความเข้มข้น 0.1-2.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ให้ค่า Linearity ในช่วงความเข้มข้น 0.2-1.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีค่า correlation coefficient (r) 0.9998 มีความแม่นยำ (Precision) ของวิธีวิเคราะห์ Butachlor ในผลิตภัณฑ์กำจัดวัชพืชสูตร EC ที่ให้ค่า HORRAT ของการทวนซ้ำ (Repeatability) เท่ากับ 0.414 และการทำซ้ำ (Intermediate reproducibility) ที่ความเข้มข้น 0.4, 1.0, 1.5 mg/ml เท่ากับ 0.392, 0.631 และ 0.553 ตามลำดับตรวจสอบ Robustness / Ruggedness ของวิธีการ มีค่า HORRAT เป็น 0.600 และ 0.602 ตามลำดับ ซึ่งไม่เกิน 2 ตามเกณฑ์พิจารณาของ AOAC และ EU, Codex และตรวจสอบความถูกต้อง (Accuracy) ของวิธีการ จากค่า เปอร์เซ็นต์การกลับคืน(% recovery) ที่ 0.4, 1.0, และ 1.4 mg/ml มีค่าเป็นร้อยละ 99.47, 99.33, 99.99 ซึ่งอยู่ในช่วง 98-102 % ตามเกณฑ์พิจารณาสำหรับสารที่มีปริมาณมากกว่า 10 % ของ AOAC วิธีวิเคราะห์นี้สามารถนำไปใช้

ในการตรวจวิเคราะห์วัตถุอันตรายการเกษตร Butachlor ที่เป็นงานประจำและต้องการผลวิเคราะห์ที่รวดเร็วและถูกต้องแม่นยำ

### คำนำ



Butachlor เป็นสารกำจัดวัชพืชที่ใช้กำจัดวัชพืชพวกใบแคบ และใบกว้าง เช่น หญ้าข้าวเนก หญ้าดอกขาว ผักปอดนา และพืชประเภทกก เช่น กกขนาก มีชื่อทางเคมีตาม IUPAC *N*-butoxymethyl-2-chloro-2',6'-diethylacetanilide มีชื่อตาม Chemical Abstract เป็น *N*-(butoxymethyl)-2-chloro-*N*-(2,6-diethylphenyl)acetamide มีสูตรโมเลกุลเป็น  $C_{17}H_{26}ClNO_2$  มีน้ำหนักโมเลกุล 311.9 มีจุดหลอมเหลว -2.8 ถึง 1.7 องศาเซลเซียส มีจุดเดือด 156 องศาเซลเซียส มีลักษณะเป็นของเหลวสีเหลือง ละลายน้ำได้ 20 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส ละลายได้ดีในตัวทำละลายอินทรีย์และอีเทอร์ สลายตัวที่อุณหภูมิ 165 องศาเซลเซียส

ในด้านวิธีวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ Butachlor ในผลิตภัณฑ์วัตถุอันตรายทางการเกษตร มีอ้างอิงใน AOAC official method Vol.17 Ed 986.04 ; CIPAC Handbook, 1988, D, 17 ซึ่งระบุใช้ pack column ซึ่งในปัจจุบันได้มีการผลิต Capillary column ขึ้นมาใช้แทนประสิทธิภาพในการวิเคราะห์ที่ดีกว่า และมีความสะดวก เพื่อให้ผลการวิเคราะห์มีความถูกต้อง (Accuracy) และความแม่นยำ (Precision) เป็นที่ยอมรับได้ตามเกณฑ์การยอมรับสากล จึงจำเป็นต้องศึกษาพัฒนาวิธีวิเคราะห์ขึ้นพร้อมตรวจสอบความใช้ได้ ของวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้น เพื่อใช้ในห้องปฏิบัติการต่อไป

### วัตถุประสงค์การทดลอง

1. พัฒนารูปแบบการตรวจวิเคราะห์สาร Butachlor จากวิธีมาตรฐานที่กำหนดใน AOAC official method Vol.17 Ed 986.04 และ CIPAC Handbook, 1988, D, เพื่อให้สะดวกและมีความเหมาะสมต่อการใช้งาน

2. ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สาร Butachlor ในผลิตภัณฑ์วัตถุมีพิษการเกษตรที่พัฒนาขึ้น เพื่อให้ผลวิเคราะห์มีความถูกต้อง และแม่นยำยอมรับได้ตามเกณฑ์การยอมรับสากล เป็นการเพิ่มความน่าเชื่อถือแก่ห้องปฏิบัติการตรวจสอบวัตถุมีพิษการเกษตร

## อุปกรณ์ และวิธีการ

### อุปกรณ์/เครื่องมือ

1. เครื่อง GLC ที่ติดตั้งตัวตรวจวัดชนิด Flame ionization detector (FID)
2. คอลัมน์ชนิด Capillary ภายในเคลือบด้วย 5% phenyl methyl siloxane (HP-5) หนา 0.25 ไมโครเมตร ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 0.32 มิลลิเมตร ยาว 30 เมตร
3. คอลัมน์ชนิด Capillary ภายในเคลือบด้วย 100% dimethylpolysiloxane (DB-1) หนา 0.25 ไมโครเมตร ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 0.32 มิลลิเมตร ยาว 30 เมตร
4. เครื่องชั่งละเอียด 4 ตำแหน่ง (ซึ่งได้ระดับ 0.1 มิลลิกรัม) ที่ผ่านการสอบเทียบแล้ว
5. Ultrasonic bath
6. ขวดปริมาตรชนิด type A ขนาด 10, 25, 50, 100, 250 และ 1000 มิลลิลิตรที่ผ่านการสอบเทียบแล้ว
7. ปิเปตชนิด type A ขนาด 2, 3, 4, 5 และ 10 มิลลิลิตร ที่ผ่านการสอบเทียบแล้ว
8. ปีกเกอร์ ขนาด 100 มิลลิลิตร
9. กรวยแก้วก้านยาว
10. vial ขนาด 2 มิลลิลิตร

### สารเคมี

1. สารมาตรฐาน Butachlor 99.5 %
2. สารเข้มข้น Butachlor (Technical grade, TC) 94.7 %AI
4. ตัวอย่างผลิตภัณฑ์สูตร Emulsifiable concentrates (EC) 60 %AI
5. Acetone AR grade

### ขั้นตอนการดำเนินงาน

#### 1. พัฒนาวิธีการวิเคราะห์ Butachlor

1.1 โดยปรับตั้งสภาวะการใช้งานเครื่อง GLC ในการหาปริมาณที่แน่นอนของสารเข้มข้น ด้วย HP-5 capillary column ดังนี้

อุณหภูมิ Oven	:	220	องศาเซลเซียส
Injector	:	250	องศาเซลเซียส
Detector	:	250	องศาเซลเซียส

สภาวะ Injector :	split ratio	50 :1		
ก๊าซตัวพา :	He	อัตราการไหล	2.0	มิลลิลิตรต่อนาที
ก๊าซจุดเปลวไฟ :	H <sub>2</sub>	อัตราการไหล	40.0	มิลลิลิตรต่อนาที
	Air	อัตราการไหล	450.0	มิลลิลิตรต่อนาที
ก๊าซ make up :	N <sub>2</sub>	อัตราการไหล	45.0	มิลลิลิตรต่อนาที
ปริมาตรที่ฉีด :	1	ไมโครลิตร		

## 2. การตรวจสอบปริมาณที่แน่นอนของสารความเข้มข้นสูง (Technical grade)

### 2.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

ซึ่งสารมาตรฐาน Butachlor หนัก 10 มิลลิกรัม ( $\pm 0.1$  มิลลิกรัม) 2 ซ้ำ

(C<sub>A</sub>, C<sub>B</sub>) ใส่ขวดปริมาตร 10 มิลลิลิตร เติม Acetone ประมาณครึ่งขวด เขย่าให้ละลายด้วย ultrasonic bath 5 นาที ปล่อยให้สารละลายปรับตัวเข้าสู่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย Acetone เขย่าให้เข้ากัน แบ่งใส่ขวด vial ขนาด 2 มิลลิลิตร

### 2.2 การเตรียมสารละลายของสาร Technical grade

ซึ่งสาร Technical grade ที่คลุกเคล้าให้เป็นเนื้อเดียวกันแล้วหนัก 25 มิลลิกรัม ( $\pm 0.1$  มิลลิกรัม) 15 ซ้ำ (T<sub>1</sub> - T<sub>15</sub>) ใส่ขวดปริมาตร 25 มิลลิลิตร เติม Acetone ประมาณครึ่งขวด เขย่าให้ละลายด้วย ultrasonic bath 5 นาที ปล่อยให้สารละลายปรับตัวเข้าสู่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย Acetone เขย่าให้เข้ากัน แบ่งใส่ขวด vial ขนาด 2 มิลลิลิตร

### 2.3 ตรวจสอบปริมาณที่แน่นอนของสาร Technical grade

ตรวจสอบความพร้อมของเครื่อง GLC ที่ปรับตั้งสภาวะการใช้งาน และรอจนกระทั่ง baseline เรียบ ทดลองฉีดสารละลายมาตรฐาน C<sub>A</sub> และ C<sub>B</sub> สลับกันหลายๆ ครั้ง จนได้ค่า response factor ที่คำนวณได้จากการฉีดแต่ละครั้งต่างจากค่าเฉลี่ยไม่เกิน 1 % แล้วฉีดสารละลายเพื่อหาปริมาณสารออกฤทธิ์ ตามลำดับ ดังนี้

C<sub>A</sub>, T<sub>1-1</sub>, T<sub>1-2</sub>, C<sub>B</sub>, T<sub>2-1</sub>, T<sub>2-2</sub>, C<sub>A</sub>, .....

### 2.4 การคำนวณ

#### 2.4.1 ค่า response factor

$$f = W \times P / A$$

W = น้ำหนักสารมาตรฐาน หน่วยเป็น มิลลิกรัม

P = ความบริสุทธิ์ของ Butachlor ในสารมาตรฐาน หน่วยเป็น เปอร์เซ็นต์

A = peak area ของ Butachlor ในสารละลายมาตรฐาน

#### 2.4.2 ปริมาณ Butachlor ในสาร Technical grade

$$M = A_s \times f / W_s$$

$A_s$  = peak area ของ Butachlor ในสารละลาย Technical grade

$W_s$  = น้ำหนักสาร Technical grade หน่วยเป็น มิลลิกรัม

M = ปริมาณ Butachlor ในสาร Technical grade หน่วยเป็น เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก

### 3. ตรวจสอบช่วงความเป็นเส้นตรง (Range / Linear) ของวิธีการ

#### 3.1 ทาค่า Range

3.1.1 ชั่งสาร Technical grade ที่ทราบปริมาณที่แน่นอน และคลุกเคล้าแล้ว ให้มีสารออกฤทธิ์ Butachlor ครอบคลุมช่วงการใช้งาน รวม 6 ความเข้มข้น หนัก 10.5, 52.8, 105.6, 158.4, 211.2, และ 253.4 มิลลิกรัม ( $\pm 0.1$  มิลลิกรัม) ใส่ขวดปริมาตร 100 มิลลิลิตร เติม Acetone ประมาณครึ่งขวด เขย่าให้ละลายด้วย ultrasonic bath 5 นาที ปล่อยให้สารละลายปรับตัวเข้าสู่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย Acetone เขย่าให้เข้ากัน แบ่งใส่ขวด vial ขนาด 2 มิลลิลิตร

3.1.2 ฉีดสารละลายเรียงลำดับจากความเข้มข้นน้อยไปมาก

3.1.3 วาดกราฟระหว่างความเข้มข้นของ Butachlor (แกน X) กับค่า response (แกน Y)

3.1.4 พิจารณาช่วงกราฟที่เป็นเส้นตรง

#### 3.2 ทาค่า Linearity

3.2.1 เลือกค่าจาก Range ที่เป็นเส้นตรง 3 ความเข้มข้น

3.2.2 ชั่งสาร Technical grade ที่ทราบปริมาณที่แน่นอน และคลุกเคล้าแล้ว ให้มีสารออกฤทธิ์ Butachlor 6 ความเข้มข้น หนัก 21.1, 52.8, 84.5, 105.6, 126.7 และ 158.4 มิลลิกรัม ( $\pm 0.1$  มิลลิกรัม) ใส่ขวดปริมาตร 100 มิลลิลิตร เติม Acetone ประมาณครึ่งขวด เขย่าให้ละลายด้วย ultrasonic bath 5 นาที ปล่อยให้สารละลายปรับตัวเข้าสู่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย Acetone เขย่าให้เข้ากัน แบ่งใส่ขวด vial ขนาด 2 มิลลิลิตร

3.2.3 ฉีดสารละลายเรียงลำดับจากความเข้มข้นน้อยไปมาก

3.2.4 วาดกราฟระหว่างความเข้มข้นของ Butachlor (แกน X) กับค่า response (แกน Y)

3.2.5 พิสูจน์ความเป็นเส้นตรง โดยคำนวณค่า correlation coefficient (r) ต้องมีค่ามากกว่า 0.995

#### 4. ตรวจสอบความแม่นยำ (Butachlor) ของวิธีการ

##### 4.1 ตรวจสอบความทวนซ้ำ (Repeatability)

4.1.1 ชั่งผลิตภัณฑ์สูตร EC ที่คลุกเคล้าแล้ว หนัก 20.8, 41.7 และ 62.5 มิลลิกรัม ( $\pm 0.1$  มิลลิกรัม) อย่างละ 10 ซ้ำ ( $EC_S$ ,  $EC_M$ ,  $EC_L$ ) ใส่ขวดปริมาตร 25 มิลลิลิตร เติม Acetone ประมาณครึ่งขวด เขย่าให้ละลายด้วย ultrasonic bath 5 นาที ปล่อยให้สารละลายปรับตัวเข้าสู่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย Acetone เขย่าให้เข้ากัน แบ่งใส่ขวด vial ขนาด 2 มิลลิลิตร

4.1.2 วิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ Butachlor ในสารละลายของผลิตภัณฑ์ ที่เตรียม (ข้อ 4.1.1) เทียบกับกราฟ (ข้อ 3.2.4) คำนวณค่าเฉลี่ย (mean) ความเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation, SD) ความคลาดเคลื่อนสัมพัทธ์ (relative standard deviation, RSD) และ ประเมินค่า HORRAT โดยต้องมีค่าไม่เกิน 2 ตามเกณฑ์พิจารณาของ AOAC และ EU, Codex

##### 4.1.3 การคำนวณ

$$\text{HORRAT} = \%RSD_{\text{exp.}} / \%RSD_{\text{Horwitz}}$$

$$\%RSD_{\text{Horwitz}} = 0.66 \times 2^{(1-0.5 \log C)} \quad : \text{ intra-lab.}$$

$$C = \text{Concentration ratio}$$

##### 4.2 ตรวจสอบความทำซ้ำ (Intermediate reproducibility)

เตรียมสารละลายผลิตภัณฑ์สูตร EC ขึ้นใหม่ตามข้อ 4.1.1 (ต่างวันกัน) แล้วนำมาวิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ Butachlor เทียบกับกราฟ (ข้อ 3.2.4) คำนวณค่าเฉลี่ย ความเบี่ยงเบนมาตรฐาน ความคลาดเคลื่อนสัมพัทธ์ และประเมินค่า HORRAT ของปริมาณ Butachlor จากข้อ 4.1.2 และ 4.2 ดังนี้

$$\text{HORRAT} = \%RSD_{\text{exp.}} / \%RSD_{\text{Horwitz}}$$

$$\%RSD_{\text{Horwitz}} = 2^{(1-0.5 \log C)} \quad : \text{ inter-lab.}$$

$$C = \text{Concentration ratio}$$

#### 5. ตรวจสอบ Robustness / Ruggedness ของวิธีการ

##### 5.1 ตรวจสอบ Robustness

5.1.1 วิเคราะห์หาปริมาณ Butachlor ที่สภาวะการใช้งาน ใช้คอลัมน์ชนิด HP-5 (5% phenyl methyl siloxane)

5.1.1.1 เตรียมสารละลายของสาร Technical grade ที่ทราบปริมาณที่แน่นอน หน้า 21.1, 52.8, 84.5, 105.6, 126.7 และ 158.4 มิลลิกรัม ( $\pm 0.1$  มิลลิกรัม) ใน Acetone 100 มิลลิลิตร ฉีดเข้าเครื่องเพื่อสร้างกราฟ

5.1.1.2 ชั่งสารละลายผลิตภัณฑ์สูตร EC คลุกเคล้าแล้ว หน้า 20.8, 41.7 และ 62.5 มิลลิกรัม ( $\pm 0.1$  มิลลิกรัม) อย่างละ 10 ซ้ำ ( $EC_s$ ,  $EC_M$ ,  $EC_L$ ) ใน Acetone 25 มิลลิลิตร เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณ Butachlor ที่สภาวะคอลัมน์ DB-1 (100% dimethylpolysiloxane)

5.1.2 วิเคราะห์หาปริมาณ Butachlor ที่สภาวะคอลัมน์ DB-1 (100% dimethylpolysiloxane)

5.1.2.1 ปรับเปลี่ยนสภาวะคอลัมน์ DB-1 (100% dimethylpolysiloxane)

5.1.2.2 ฉีดสารละลายของสาร Technical grade (ข้อ 5.1.1.1) เพื่อสร้างกราฟ

5.1.2.3 ฉีดสารละลายผลิตภัณฑ์สูตร EC (ข้อ 5.1.1.2) เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณ Butachlor ที่สภาวะคอลัมน์ DB-1 (100% dimethylpolysiloxane)

5.1.3 การประเมินค่า HRRAT

นำค่าปริมาณสารออกฤทธิ์ Butachlor ที่วิเคราะห์ได้จากข้อ 5.1.1.2 และ 5.1.2.3 มาคำนวณค่าเฉลี่ย ความเบี่ยงเบนมาตรฐาน ความคลาดเคลื่อนสัมพัทธ์ และ HRRAT ตามข้อ 4.2

5.2 ตรวจสอบ Ruggedness

5.2.1 เตรียมสารละลายผลิตภัณฑ์สูตร EC ตามข้อ 4.1.1 และเตรียม Technical grade (ข้อ 3.2.2) เพื่อสร้างกราฟ โดยมีการวิเคราะห์ต่างวันกันแล้วนำมาวิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ Propanil เทียบกับกราฟ (ข้อ 3.2.4)

5.2.2 นำค่าปริมาณสารออกฤทธิ์ Butachlor ของผลิตภัณฑ์สูตร EC จากข้อ 5.2.1 นำมาคำนวณค่าเฉลี่ย ความเบี่ยงเบนมาตรฐาน ความคลาดเคลื่อนสัมพัทธ์ และ HRRAT ตามข้อ 4.2

6. ตรวจสอบความถูกต้อง (Accuracy) ของวิธีการ

6.1 เตรียมสารละลาย Stock Tech (5 mg AI / ml)

ชั่งสาร Technical grade ที่ทราบปริมาณที่แน่นอน และคลุกเคล้าแล้ว หน้า 1,320.0 มิลลิกรัม ( $\pm 0.1$  มิลลิกรัม) ใส่ปิกรขนาด 100 มิลลิลิตร นำมาละลายด้วย Acetone ถ่ายผ่านกรวยแก้วก้านยาวสู่ขวดปริมาตรขนาด 250 มิลลิลิตร เขย่าให้ละลายด้วย ultrasonic bath 5 นาที ปล่อยให้สารละลายปรับตัวเข้าสู่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย Acetone เขย่าให้เข้ากัน

6.2 เตรียมสารละลาย เพื่อวาดกราฟ

ชั่งสาร Technical grade ให้มีสารออกฤทธิ์ Butachlor 6 ความเข้มข้น หน้า 21.1, 52.8, 84.5, 105.6, 126.7 และ 158.4 มิลลิกรัม ( $\pm 0.1$  มิลลิกรัม) ใส่ขวดปริมาตร 100 มิลลิลิตร เติม Acetone ประมาณครึ่งขวด เขย่าให้ละลายด้วย ultrasonic bath 5 นาที ปล่อยให้สารละลายปรับตัวเข้าสู่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตร

ด้วย Acetone เขย่าให้เข้ากัน แบ่งใส่ขวด vial ขนาด 2 มิลลิลิตร นำไปฉีดเข้าเครื่อง GLC โดยเรียงตามลำดับความเข้มข้น

### 6.3 เตรียมสารละลาย Stock Sample (1 mg AI / ml)

ซึ่งผลิตภัณฑ์สูตร EC ที่คลุกเคล้าแล้วหนัก 1666.7 มิลลิกรัม ( $\pm 0.1$  มิลลิกรัม) ตามลำดับใส่ปีกเกอร์ขนาด 100 มิลลิลิตร นำมาละลายด้วย Acetone ผ่านกรวยแก้วก้านยาวสู่ขวดปริมาตรขนาด 1,000 มิลลิลิตร เขย่าให้ละลายด้วย ultrasonic bath 5 นาที ปล่อยให้สารละลายปรับตัวเข้าสู่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย Acetone เขย่าให้เข้ากัน

### 6.4 เตรียมสารละลาย เพื่อหาค่า Origin

ปิเปตสารละลาย Stock Sample EC (ข้อ 6.3) มา 10 มิลลิลิตร 10 ซ้ำใส่ขวดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร รวม 10 ใบ ปรับปริมาตรด้วย Acetone เขย่าให้เข้ากัน นำไปฉีดเข้าเครื่อง GLC หาปริมาณ Butachlor เทียบกับกราฟ (ข้อ 6.2)

### 6.5 เตรียมสารละลาย เพื่อหาค่า Spike

ปิเปตสารละลาย Stock Tech (ข้อ 6.1) 3, 5 และ 7 มิลลิลิตร เติมลงในขวดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร ที่มีสารละลาย Stock Sample EC (ข้อ 6.3) อยู่ 10 มิลลิลิตร อย่างละ 10 ซ้ำ รวม 30 ใบ ปรับปริมาตรด้วย Acetone เขย่าให้เข้ากัน นำไปฉีดเข้าเครื่อง GLC หาปริมาณ Butachlor เทียบกับกราฟ (ข้อ 6.2)

### 6.6 การประเมินค่า Accuracy จาก % Recovery

นำค่าปริมาณสารออกฤทธิ์ Butachlor ที่เป็นค่า Origin และ Spike (ข้อ 6.4-6.5) มาหาค่าเฉลี่ยและคำนวณค่า % Recovery โดยต้องอยู่ในช่วง 98-102 % ตามเกณฑ์พิจารณาสำหรับสารที่มีปริมาณมากกว่า 10 % ของ AOAC จากสูตร

$$\% \text{ Recovery} = (A_{\text{spike}} - A_{\text{origin}}) \times 100 / A_{\text{add}}$$

$$A_{\text{spike}} = \text{ปริมาณ Butachlor ในสารละลาย Spike}$$

$$A_{\text{origin}} = \text{ปริมาณ Butachlor ในสารละลาย Origin}$$

$$A_{\text{add}} = \text{ปริมาณ Butachlor ที่เติมลงในสารละลาย Spike}$$



## ระยะเวลาดำเนินการ (เริ่มต้น-สิ้นสุด)

ตุลาคม 2556 – กันยายน 2557

สถานที่ดำเนินการ

ห้องปฏิบัติการสำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

ผลการทดลอง และวิจารณ์

จากการประเมินความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ ได้ผลการทดลองดังนี้

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ เพื่อหาปริมาณสารออกฤทธิ์ Butachlor ในผลิตภัณฑ์สารกำจัดแมลง เมื่อตั้งสภาวะการใช้งานของเครื่อง GLC แล้ว ดำเนินการตรวจสอบความพร้อมของเครื่อง ได้ผลการคำนวณค่า response factor (f) ของการฉีดแต่ละครั้งต่างจากค่าเฉลี่ย ไม่เกินร้อยละ 1 (ตารางที่ 1) และตรวจหาปริมาณที่แน่นอนของสาร Technical grade เทียบกับสารละลายมาตรฐาน (รูปที่ 1) ได้ค่าเฉลี่ยร้อยละ 94.7 (ตารางที่ 2)

เมื่อพิจารณาค่า Range ของวิธีวิเคราะห์ พบว่า มีช่วงความเป็นเส้นตรงครอบคลุมค่าความเข้มข้น 0.1 – 2.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 3 และ รูปที่ 2) จึงตรวจสอบค่า Linearity ในช่วงความเข้มข้น 0.2 - 1.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่า มีค่า correlation coefficient (r) 0.9998 (ตารางที่ 4 และ รูปที่ 3)

ในด้านความแม่นยำ (Precision) ของวิธีวิเคราะห์ที่ใช้ตรวจหาปริมาณสารออกฤทธิ์ Butachlor ในผลิตภัณฑ์กำจัดโรคพืชสูตร EC พบว่า การทวนซ้ำ (Repeatability) มีค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ที่ความเข้มข้น 0.4, 1.0, 1.5 mg/ml เท่ากับ 0.305 มีค่าความคลาดเคลื่อนสัมพัทธ์ (%RSD) 0.875 และคำนวณค่า HORRAT ได้เป็น 0.414 (ตารางที่ 5) ส่วนการทำซ้ำ (Intermediate reproducibility) ที่ความเข้มข้น 0.4, 1.0, 1.5 mg/ml มีค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) 0.337, 0.546, 0.478 มีค่าความคลาดเคลื่อนสัมพัทธ์ (%RSD) 0.559, 0.900, 0.788 และคำนวณค่า HORRAT ได้เป็น 0.392, 0.631, 0.552 ตามลำดับ (ตารางที่ 6)

การตรวจสอบ Robustness / Ruggedness ของวิธีการ พบว่า Robustness มีค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) 0.518 มีค่าความคลาดเคลื่อนสัมพัทธ์ (%RSD) 0.857 และคำนวณค่า HORRAT ได้เป็น 0.600 ตามลำดับ (ตารางที่ 7) และพบว่า Ruggedness มีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) 0.519 มีค่าความคลาดเคลื่อนสัมพัทธ์ (%RSD) 0.859 และคำนวณค่า HORRAT ได้เป็น 0.602 ตามลำดับ (ตารางที่ 8)

กรณีความถูกต้อง (Accuracy) ของวิธีการ พบว่า % recovery ของการตรวจหาปริมาณ สารออกฤทธิ์ Butachlor ในผลิตภัณฑ์กำจัดวัชพืช EC ที่ความเข้มข้น 0.4, 1.0, และ 1.4 mg/ml มีค่าเป็นร้อยละ 99.47, 99.33, 99.99 (ตารางที่ 9)

## วิจารณ์

วิธีวิเคราะห์มาตรฐานที่ใช้หาปริมาณสารออกฤทธิ์ Butachlor ตามที่ระบุใน CIPAC Handbook, D และ AOAC Methods, 17<sup>th</sup> Ed., 986.04 เป็นการใช้ Pack column ในการแยกสาร และ การศึกษาทดลองนี้ได้ พัฒนาใช้ Capillary column ซึ่งมีประสิทธิภาพการแยกสารสูงกว่าแทน และปรับเปลี่ยนปริมาณการใช้สาร มาตรฐาน เพื่อประหยัดค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์ การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ จึงจำเป็นต้อง ดำเนินการ โดยหาปริมาณที่แน่นอนของสารเข้มข้นสูงก่อน เพื่อนำมาใช้ทดแทนสารมาตรฐานซึ่งมีราคาแพงและใช้ ในปริมาณที่มาก ในขั้นตอนต่างๆ โดยเฉพาะการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีการ ที่ต้องมีการใช้สารมาตรฐานเติมลงในสารละลายตัวอย่างอย่างน้อย 30 ซ้ำ และผลของการศึกษาครั้งนี้ สามารถตรวจสอบได้ว่า ค่าความคลาดเคลื่อนต่างๆ สามารถยอมรับได้ตามมาตรฐานสากล วิธีการนี้จึงสามารถนำมาใช้เป็นวิธีมาตรฐานในการวิเคราะห์ Butachlor ของห้องปฏิบัติการต่อไป

## สรุปผลการทดลอง

1. วิธีการวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ Butachlor ในผลิตภัณฑ์สารกำจัดวัชพืช โดยใช้เทคนิควิธี Gas Liquid Chromatography (GLC) ที่มีตัวตรวจวัด (Detector) ชนิด Flame Ionization Detector (FID) ด้วย HP-5 capillary column ซึ่งมีสถานะการใช้งาน ดังนี้

อุณหภูมิ Oven	:	220	องศาเซลเซียส		
Injector	:	250	องศาเซลเซียส		
Detector	:	250	องศาเซลเซียส		
สภาวะ Injector	:	split ratio	50 :1		
ก๊าซตัวพา	:	He	อัตราการไหล	2.0	มิลลิลิตรต่อนาที
ก๊าซจุดเปลวไฟ	:	H <sub>2</sub>	อัตราการไหล	40.0	มิลลิลิตรต่อนาที
	:	Air	อัตราการไหล	450.0	มิลลิลิตรต่อนาที
ก๊าซ make up	:	N <sub>2</sub>	อัตราการไหล	45.0	มิลลิลิตรต่อนาที
ปริมาตรที่ฉีด	:	1	ไมโครลิตร		

2. การเตรียมสารละลายเพื่อการวิเคราะห์

2.1 เตรียมสารละลายมาตรฐาน Butachlor ให้มีความเข้มข้นของสารออกฤทธิ์ 1 มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร โดยชั่งสารมาตรฐานให้มีสารออกฤทธิ์ หนักประมาณ 10 มิลลิกรัม ใส่ในขวดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร เติม Acetone เขย่าด้วยเครื่อง ultrasonic bath 5 นาที ปล่อยให้สารละลายปรับตัวเข้าสู่ อุณหภูมิห้อง จึงปรับปริมาตรด้วย Acetone เขย่าให้เข้ากัน

2.2 เตรียมสารละลายตัวอย่าง ให้มีความเข้มข้นของสารออกฤทธิ์ Butachlor 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยชั่งตัวอย่างให้มีสารออกฤทธิ์ หนักประมาณ 25 มิลลิกรัม ใส่ในขวดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร เติม Acetone เขย่าด้วยเครื่อง ultrasonic bath 5 นาที ปล่อยให้สารละลายปรับตัวเข้าสู่ อุณหภูมิห้อง จึงปรับปริมาตรด้วย Acetone เขย่าให้เข้ากัน

3. วิธีการนี้มีค่า Range ที่เป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้นของสารออกฤทธิ์ 0.1-2.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และมีค่า Linearity ในช่วงความเข้มข้น 0.2-1.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีค่า correlation coefficient (r) 0.9998

4. ความแม่นยำ (Precision) ของวิธีวิเคราะห์ Butachlor ในผลิตภัณฑ์กำจัดวัชพืชสูตร EC เมื่อทดสอบค่า การทวนซ้ำ (Repeatability) ค่าความคลาดเคลื่อนสัมพัทธ์ (%RSD) มาคำนวณค่า HORRAT ได้เป็น 0.589 และ 0.414ตามลำดับ การทำซ้ำ (Intermediate reproducibility) สัมพัทธ์ (%RSD) มาคำนวณค่า HORRAT ที่ความ เข้มข้น 0.4, 1.0, 1.5 mg/ml ค่าความคลาดเคลื่อนสัมพัทธ์ (%RSD) ได้เป็น 0.559, 0.900, 0.788 ตามลำดับ ค่า HORRAT เท่ากับ 0.392, 0.631, 0.552 ซึ่งยอมรับได้ เนื่องจากไม่เกิน 2 ตามเกณฑ์พิจารณาของ AOAC และ EU,Codex

5. การตรวจสอบ Robustness / Ruggedness ของวิธีการ พบว่า ยอมรับได้ เนื่องจากเมื่อนำค่าความ คลาดเคลื่อนสัมพัทธ์ (%RSD) มาคำนวณค่า HORRAT ของ Robustness และ Ruggedness ได้เป็น 0.602 และ 0.600 ตามลำดับ ซึ่งไม่เกิน 2 ตามเกณฑ์พิจารณาของ AOAC และ EU,Codex

6. ความถูกต้อง (Accuracy) ของวิธีการ พบว่า % recovery ของการตรวจหาปริมาณ สารออกฤทธิ์ Butachlor ในผลิตภัณฑ์กำจัดวัชพืชสูตร EC ที่ความเข้มข้น 0.4, 1.0, และ 1.4 mg/ml มีค่าเป็น ร้อยละ 99.47, 99.33, 99.99 อยู่ในช่วง 98-102 % ตามเกณฑ์พิจารณาสำหรับสารที่มีปริมาณมากกว่า 10 % ของ AOAC

1. กองควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร. 2537. การขึ้นทะเบียนวัตถุมีพิษทางการเกษตรในประเทศไทย. กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. ซาลิธีธุรกิจและโฆษณา, กรุงเทพฯ.
2. Kidd, H. and D.R. James (Eds). 1993. **The Agrochemicals Handbook**. 3rd. ed. MethodsRoyal Society of Chemistry, England.
3. Dobrat, W. and A. Martijn. 1988. **CIPAC Handbook-Vol. D. : Analysis of Technical and Formulated Pesticides**. Collaborative International Pesticides Analytical Council Limited, Black Bear Press Ltd., England.
4. **AOAC Methods**,17<sup>th</sup> Ed.,986.04
5. The e-Pesticide Manual (Thirteenth Edition ) Version 3.0 BCPC (British Crop Protection Council)

#### ภาคผนวก

ตารางที่ 1 การปรับตั้งเครื่องก่อนการวิเคราะห์ (Std. Purity 99.5 %, in 10 ml.)

Std. Soln.	Mg	Area	$f = W_s * P / V_s * A_s$	% diff.
C <sub>A</sub>	10.4	239.00948	0.4308	1.5410
C <sub>B</sub>	12.5	283.49893	0.4365	0.2310
C <sub>A</sub>	10.4	236.10400	0.4361	0.3294
C <sub>B</sub>	12.5	282.62393	0.4379	-0.0779

C <sub>A</sub>	10.4	231.86038	0.4441	-1.4949
C <sub>B</sub>	12.5	281.35718	0.4398	-0.5285

Mean 0.4375

---

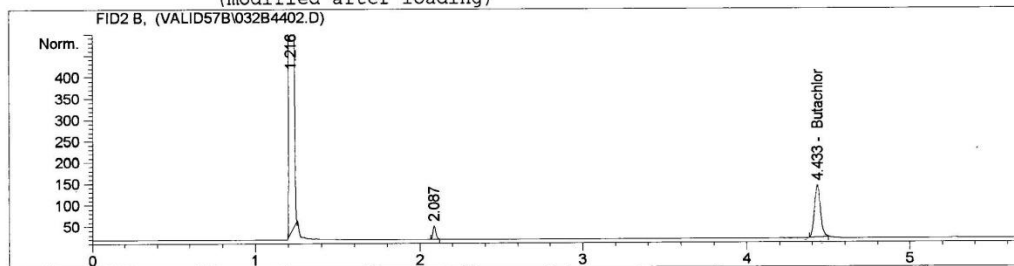
หมายเหตุ : f = Response factor  
 % diff. = ร้อยละของการเบี่ยงเบนจากค่าเฉลี่ย

Data File C:\HPCHEM\1\DATA\VALID57B\032B4402.D

Sample Name: Precision 1

```

=====
Injection Date : 8/14/2014 11:03:02 PM      Seq. Line : 44
Sample Name   : Precision 1.0mg           Location  : Vial 32
Acq. Operator : pichet                      Inj       : 2
Acq. Instrument : Instrument 1              Inj Volume: 1 µl
Acq. Method   : C:\HPCHEM\1\METHODS\BUTACHLO.M
Last changed  : 8/14/2014 3:33:52 PM by pichet
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\BUTACHLO.M
Last changed  : 8/15/2014 12:38:14 PM by pichet
                (modified after loading)
=====
  
```



=====

ESTD Percent Report

=====

```

Sorted By      :      Signal
Calib. Data Modified : 8/15/2014 10:45:42 AM
Multiplier    :      1.0000
Dilution      :      25.0000
Sample Amount  :      42.50000 [ng/ul]
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
  
```

รูปที่ 1 โครมาโตแกรมของสารมาตรฐาน propanil

ตารางที่ 2 การหาปริมาณ Butachlor ในผลิตภัณฑ์สูตร Tech.

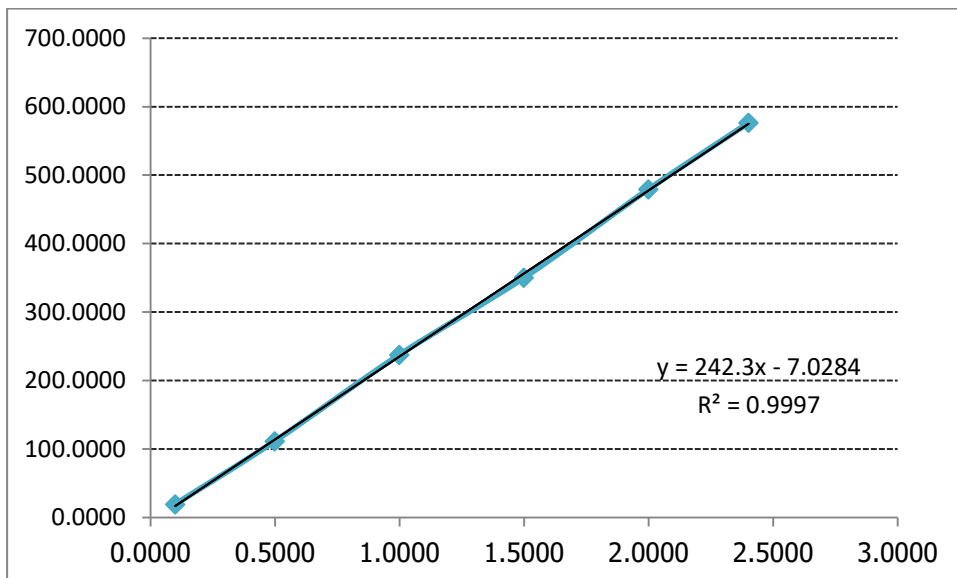
mg. Tech	%w/w
25.5	94.6
24.2	96.2

26.2	96.2
27.2	93.7
23.6	95.7
23.5	95.2
24.3	95.5
25.1	94.2
25.3	94.3
24.1	94.9
23.7	94.1
25.2	92.2
24.7	94.6
25.0	95.3
24.1	94.7
<b>mean</b>	<b>94.7</b>

mg Al, Tech / ml	Area
0.0985	19.2396
0.4981	111.3786
0.9981	237.3481
1.4991	350.1134
1.9982	478.9888

2.4016	576.4564
--------	----------

ตารางที่ 3 การหาช่วงของการวัด (Range)

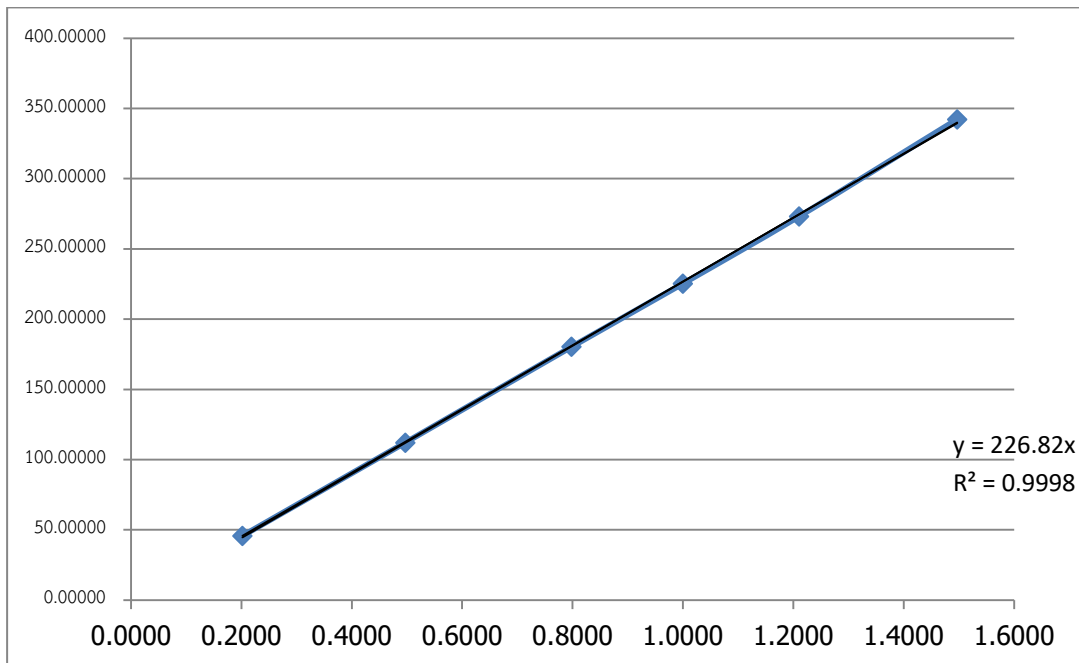


รูปที่ 2 การตรวจสอบช่วงของการวัด (Range)

ตารางที่ 4 การหาความเป็นเส้นตรงของช่วงการวัด (Linearity)

mg Al, Tech / ml	Area
0.2017	45.72450

0.4972	112.1729
0.7983	180.3414
1.0000	225.3167
1.2107	273.2258
1.4972	342.3279



รูปที่ 3 การตรวจสอบความเป็นเส้นตรง (Linearity)

ตารางที่ 5 ตรวจสอบ Repeatability ของสูตร EC



mg. Sample	%w/v
23.2	60.174
19.2	59.850
21.3	60.179
22.1	60.673
21.6	59.968
22.5	60.025
23.3	60.498
23.3	61.104
21.6	60.164
21.6	60.195
42.5	60.292
42.8	60.878
42.0	60.909
41.3	61.320
41.6	61.315
40.9	60.498
43.9	60.601

mg. Sample	%w/v
42.9	60.806
45.9	61.176
46.9	61.264
60.1	61.510
59.9	60.631
59.9	61.027
59.5	60.431
59.0	61.140
60.8	60.595
60.9	61.032
59.6	60.888
63.0	61.310
60.1	60.524
<b>Mean</b>	<b>60.901</b>
<b>SD</b>	<b>0.359</b>
<b>%RSD</b>	<b>0.589</b>

$$\begin{aligned}
 \%RSD_{HOR} &= 0.66 \times 2^{(1-0.5\log C)} \\
 &= 0.66 \times 2^{(1-0.5\log 0.6)} \\
 &= 0.66 \times 2^{1.111} \\
 &= 1.426
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 Horrat &= \%RSD / \%RSD_{HOR} \\
 &= 0.589 / 1.426 \\
 &= 0.414
 \end{aligned}$$

ตารางที่ 6 ตรวจสอบ Intermediat reproducibility ของสูตร EC

ความเข้มข้นที่ 0.4 mg/ml

mg. Sample	%w/v	mg. Sample	%w/v
23.6	60.385	23.2	60.174
22.7	60.518	19.2	59.850
22.6	60.521	21.3	60.179
23.5	60.133	22.1	60.673
21.8	60.400	21.6	59.968
22.8	59.953	22.5	60.025
23.6	60.071	23.3	60.498
23.8	59.758	23.3	61.104
21.5	60.035	21.6	60.164
23.4	59.624	21.6	60.194
		<b>Mean</b>	<b>60.198</b>
		<b>SD</b>	<b>0.337</b>
		<b>%RSD</b>	<b>0.559</b>

$$\begin{aligned}
 \%RSD_{HOR} &= 0.66 \times 2^{(1-0.5\log C)} \\
 &= 0.66 \times 2^{(1-0.5\log 0.6)} \\
 &= 0.66 \times 2^{1.111} \\
 &= 1.426
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 Horrat &= \%RSD / \%RSD_{Hor} \\
 &= 0.559 / 1.426 \\
 &= 0.392
 \end{aligned}$$

ความเข้มข้นที่ 1.0 mg/ml

mg. Sample	%w/v	mg. Sample	%w/v
41.8	60.308	42.0	60.909
42.8	60.986	41.3	61.320
42.3	60.888	41.6	61.315
43.1	59.511	40.9	60.498
42.5	59.511	43.9	60.601
42.1	59.465	42.9	60.806
41.6	61.002	45.9	61.176
41.8	60.878	46.9	61.264
42.5	60.292	41.5	60.143
42.8	60.878	<b>42.5</b>	<b>60.292</b>
		<b>Mean</b>	<b>60.723</b>
		<b>SD</b>	<b>0.546</b>
		<b>%RSD</b>	<b>0.900</b>

$$\begin{aligned}
 \%RSD_{HOR} &= 0.66 \times 2^{(1-0.5\log C)} \\
 &= 0.66 \times 2^{(1-0.5\log 0.6)} \\
 &= 0.66 \times 2^{1.111} \\
 &= 1.426
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 Horrat &= \%RSD / \%RSD_{HOR} \\
 &= 0.900 / 1.426 \\
 &= 0.631
 \end{aligned}$$

ความเข้มข้นที่ 1.5 mg/ml

mg. Sample	%w/v
62.5	60.251
62.3	59.912
61.0	60.729
62.2	60.534
61.5	60.472
62.8	60.595
62.5	59.506
61.5	60.940
62.4	61.233
62.7	60.426

mg. Sample	%w/v
60.1	61.510
59.9	60.631
59.9	61.027
59.5	60.431
59.0	61.140
60.8	60.595
60.9	61.032
59.6	60.888
63.0	61.310
<b>60.1</b>	<b>60.524</b>
<b>Mean</b>	<b>60.684</b>
<b>SD</b>	<b>0.478</b>
<b>%RSD</b>	<b>0.788</b>

$$\begin{aligned} \%RSD_{HOR} &= 0.66 \times 2^{(1-0.5\log C)} \\ &= 0.66 \times 2^{(1-0.5\log 0.6)} \\ &= 0.66 \times 2^{1.111} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} Horrat &= \%RSD / \%RSD_{Hor} \\ &= 0.788 / 1.426 \\ &= 0.552 \end{aligned}$$

= 1.426

ตารางที่ 7 ตรวจสอบ Robustness ของสูตร EC

mg. Sample	%w/w	mg. Sample	%w/w
23.6	60.385	41.8	60.878
22.7	60.518	42.5	60.292
22.6	60.521	42.8	60.878
23.5	60.133	62.5	60.251
21.8	60.400	62.3	59.912
22.8	59.953	61.0	60.729
23.6	60.071	62.2	60.534
23.8	59.758	61.5	60.472
21.5	60.035	62.8	60.595
23.4	59.624	62.5	59.506
41.8	60.308	61.5	60.940
42.8	60.986	62.4	61.233

42.3	60.888
43.1	59.511
42.5	59.511
42.1	59.465
41.6	61.002

62.7	60.426
<b>Mean</b>	<b>60.371</b>
<b>SD</b>	<b>0.517</b>
<b>%RSD</b>	<b>0.857</b>

$$\begin{aligned} \%RSD_{HOR} &= 0.66 \times 2^{(1-0.5\log C)} \\ &= 0.66 \times 2^{(1-0.5\log 0.6)} \\ &= 0.66 \times 2^{1.111} \\ &= 1.426 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Horrat} &= \%RSD / \%RSD_{HOR} \\ &= 0.857 / 1.426 \\ &= 0.600 \end{aligned}$$

**ตารางที่ 8** ตรวจสอบ Ruggedness ของสูตร EC

mg. Sample	%w/w	mg. Sample	%w/w
23.6	60.534	41.8	60.945
22.7	60.642	42.5	61.238
22.6	60.282	42.8	60.374
23.5	60.629	62.5	60.493
21.8	60.441	62.3	59.845
22.8	59.963	61.0	60.637
23.6	60.071	62.2	60.652
23.8	59.794	61.5	60.313
21.5	60.189	62.8	60.529
23.4	59.763	62.5	59.567
41.8	60.534	61.5	60.935

42.8	61.176	62.4	61.253
42.3	60.770	62.7	60.354
43.1	61.012	<b>Mean</b>	<b>60.389</b>
42.5	59.629	<b>SD</b>	<b>0.519</b>
42.1	59.480	<b>%RSD</b>	<b>0.859</b>
41.6	60.904		

$$\begin{aligned}
 \%RSD_{HOR} &= 0.66 \times 2^{(1-0.5\log C)} \\
 &= 0.66 \times 2^{(1-0.5\log 0.6)} \\
 &= 0.66 \times 2^{1.111} \\
 &= 1.426
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 Horrat &= \%RSD / \%RSD_{HOR} \\
 &= 0.859 / 1.426 \\
 &= 0.602
 \end{aligned}$$

**ตารางที่ 9** ตรวจสอบ % Recovery ของสูตร EC

N	AI content ( mg / 25 ml )								
	Concn. (0.4 mg / ml)			Concn. (1.0 mg / ml)			Concn. (1.4 mg / ml)		
	Origin	Spike	Added	Origin	Spike	Added	Origin	Spike	Added
1	8.22	18.55	10.00	8.11	33.04	25.00	8.35	43.09	35.00
2	8.34	18.24	10.00	8.46	33.31	25.00	8.44	43.11	35.00
3	8.12	18.24	10.00	8.31	32.89	25.00	8.25	43.01	35.00
4	8.25	18.02	10.00	8.23	33.11	25.00	8.55	43.05	35.00

5	8.31	18.22	10.00	8.44	32.99	25.00	8.20	43.22	35.00
6	8.44	18.16	10.00	8.33	33.01	25.00	8.58	43.44	35.00
7	8.35	18.11	10.00	8.32	33.12	25.00	8.15	43.65	35.00
8	8.11	17.81	10.00	8.24	32.88	25.00	8.23	43.66	35.00
9	8.23	18.33	10.00	8.12	33.21	25.00	8.46	43.56	35.00
10	8.26	18.42	10.00	8.20	33.53	25.00	8.45	43.85	35.00
mean	<b>8.26</b>	<b>18.21</b>	<b>10.00</b>	<b>8.28</b>	<b>33.11</b>	<b>25.00</b>	<b>8.37</b>	<b>43.36</b>	<b>35.00</b>
SD	<b>0.10</b>	<b>0.21</b>		<b>0.12</b>	<b>0.20</b>		<b>0.15</b>	<b>0.30</b>	
%RSD	<b>1.24</b>	<b>1.14</b>		<b>1.44</b>	<b>0.60</b>		<b>1.81</b>	<b>0.70</b>	
%Recov			<b>99.47</b>			<b>99.33</b>			<b>99.99</b>