บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการศึกษา

1. อุปกรณ์การศึกษา

1.1 อุปกรณ์การปลูกพืชทดลอง

1.1.1 สารละลายธาตุอาหาร สูตร modified Hoagland's (Limpinuntana, 1978) ประกอบด้วย NH^{+}_{4} 600 μM NO^{-}_{3} 3,680 μM $H_2PO^{-2}_{4}$ 660 μM K^{+} 2,000 μM Ca^{+} 1,340 μM Mg^{+2} 340 μM SO^{-2}_{4} 340 μM Na^{+} 2,00 μ Cl^{-} 2,000 μM FE^{+2} 2 ppm Mo^{+3} 0.001 ppm Zn^{+} 0.001 ppm Mn^{+2} 0.4 ppm B^{+3} 0.1 ppm Cu^{+2} 0.01 ppm

1.1.2 เครื่องวัด pH

1.1.3 อ่างพลาสติกขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 25 ซม. สูง 10 ซม.ซึ่งพ่นสีบรอนซ์ภายนอก

1.1.4 โฟม

1.1.5 ฟองน้ำ

1.1.6 petridish

1.1.7 เครื่องวัดการนำไฟฟ้า (EC meter)

1.2 อุปกรณ์การศึกษาลักษณะสรีรวิทยาของพืช

1.2.1 เครื่องวัดการสังเคราะห์ด้วยแสง รุ่น LCA4 ADC

1.2.2 เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง

1.2.3 ตู้อบตัวอย่างพืช

1.2.4 ถุงกระดาษเบอร์ 8

1.3 อุปกรณ์การศึกษาพอลิเอมีน

1.3.1 Spectrofluorometer รุ่น Dyna Quant 200, Hoefer

1.3.2 LK6D Silica gel plate ขนาด 250 μm Whatman

1.3.3 เครื่องปั่นเหวี่ยง ความเร็ว 3000 รอบต่อนาที

1.3.4 ตู้แช่แข็ง อุณหภูมิ –40 ^{o}C

1.3.5 Desaca tank

1.3.6 UV box พร้อมชุดถ่ายภาพ

1.3.7 Pipette man ขนาด 200 และ 1000 μl พร้อม pipette tip

1.3.8 Eppendorf tube ขนาด 1.5 ml

1.3.9 สารพอลิเอมีนมาตรฐาน Put, Spd และ Spm

1.3.10 vortex mixture

1.3.11 water bath shacker

1.3.12 chloroform AR

1.1.13 triethylamine AR

1.1.14 ethylacetate AR

1.1.15 proline AR

1.1.16 benzene AR

1.1.17 dansyl chloride AR

1.1.18 acetone AR

1.1.19 calcium carbonate AR

1.1.20 perchloric acid AR

2. พืชทดลอง

ข้าว (*Oryza sativa* L.) 4 พันธุ์ ได้แก่ พอคคาลี PTT85180-B-34-5C-2 กข 6 และIR 28 ซึ่งมีลักษณะประจำพันธุ์ดังนี้

พอคคาลี พันธุ์ทนดินเค็มค่อนข้างสูง จากประเทศอินเดีย เมล็ดป้อมสั้น ท้องไข่สูง

PTT85180-B-34-5C-2 เป็นสายพันธุ์ข้าวที่ได้จากการปรับปรุงพันธุ์ของศูนย์วิจัยข้าวปทุมธานี มาจากการผสม 3 ทาง SPRLR77089-281-1/ซีต้า/IR42 เมล็ดเรียว ยาว เป็นข้าวไม่ไวต่อช่วงแสง ให้ผลผลิตค่อยข้างสูง มีความทนเค็มระดับปานกลาง ประมาณ 5 มิลลิโมห์/ซม.

กข 6 (IR6) เป็นข้าวพันธุ์เหนียวหอม ที่ได้จากการกลายพันธุ์ (Mutation) ของพันธุ์ข้าวขาวดอกมะลิ 105 เมล็ดเรียวยาว เป็นพันธุ์ข้าวที่นิยมปลูกมากในภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ

IR 28 พันธุ์ข้าวผลผลิตสูงจากสถาบันวิจัยข้าวนานาชาติ อ่อนแอต่อดินเค็ม

3.การวางแผนการทดลอง

ในการทดลองจัดตำรับทดลอง (treatment) ที่ศึกษาแบบ Factorial in Completely Randomized Design (CRD) มีจำนวน 3 ซ้ำ ประกอบด้วย 3 ปัจจัยดังนี้

ปัจจัย A พันธุ์ข้าว 4 พันธุ์

1	พอคคาลี	(พันธุ์ทนเค็มมาตรฐาน)
2	PTT85180-B-34-5C-2	(พันธุ์ทนเค็มปานกลาง)
3	กข6	(พันธุ์ทนเค็มปานกลาง)
4	IR28	(พันธุ์ไม่ทนเค็ม)

ปัจจัย B ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 3 ระดับ

1	0 มิลลิโมลาร์
2	50 มิลลิโมลาร์
3	100 มิลลิโมลาร์

ปัจจัย C การตอบสนองต่อความเค็ม 2 ระยะเวลา

1	ระยะสั้น	(0, 2, 4, 6, 8, 12 และ 24 ชั่วโมง)
2	ระยะยาว	(1, 7, 14, และ21 วัน)

4. วิธีการทดลอง

การเพาะเมล็ดข้าว แช่เมล็ดข้าวพันธุ์ละ 200 เมล็ด ในน้ำกรองนาน 24 ชั่วโมง จากนั้นหุ้มด้วยผ้าเก็บไว้ในที่ร่มและชื้นเป็นเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อเมล็ดเริ่มงอก นำมาวางบน petridish ที่รองด้วยกระดาษกรองอิ่มตัวด้วยน้ำ เมื่อต้นข้าวเจริญเติบโตอายุได้ 10 วัน จึงนำไปย้ายปลูกในสารละลายธาตุอาหาร

การปลูกข้าวสารละลายธาตุอาหาร นำต้นกล้าที่มีขนาดใกล้เคียงกัน ไปปลูกในอ่างพลาสติกขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 25 ซม. สูง 10 ซม. บรรจุสารละลายอาหาร (Limpinuntana, 1978) จำนวน 3 ลิตร ปักดำข้าว 10 ต้นต่ออ่าง โดยหุ้มต้นข้าวด้วยฟองน้ำ เพื่อให้เป็นส่วนยึดติดกับโฟมที่ปิดอ่าง โดยให้ระดับน้ำยาห่างจากโฟม 1 ซม. ภายนอกภาชนะปลูกข้าวทาสีบรอนซ์ เพื่อป้องกันการผ่านของแสง ควบคุม pH ของสารละลายที่ 5.8 เปลี่ยนสารละลายอาหารสัปดาห์ละครั้ง เริ่มให้โซเดียมคลอไรด์หลังการย้ายปลูกได้ 7 วัน เก็บข้อมูลหลังจากต้นข้าวได้รับโซเดียมคลอไรด์เป็น 2 ระยะ คือ ระยะสั้นที่ 0, 2, 4, 6, 8, 12 และ 24 ชั่วโมง หลังจากข้าวได้รับสารละลายธาตุอาหารที่มีโซเดียมคลอไรค์ โดยเริ่มนับที่ 0 ชั่วโมงในเวลา 8.00น. ส่วนระยะยาวที่ 1, 7, 14 และ 21 วันหลังจากได้รับเกลือ ข้อมูลที่ศึกษาประกอบด้วย

4.1 การศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยาของข้าว

4.1.1 วัดอัตราการสังเคราะห์ด้วยแสงของข้าว โดยใช้ Portable photosynthetic system โมเดล LCA4 ADC ซึ่งเป็นระบบเปิด (open system) ข้อมูลประกอบด้วย อัตราการสังเคราะห์ด้วยแสง (A) การนำที่ปากใบ (Gs) อัตราการคายน้ำ (E) ปริมาณ CO_2 ใน substomata (vpm)

4.1.2 ประสิทธิภาพการใช้น้ำ (Water use efficiency, WUE) คำนวณจากจำนวนโมล CO_2 assimilated ต่อโมล H_2O transpired (Fischer and Turner, 1978)

4.1.3 Quantum yield of photosynthesis (QY) คำนวณจากจำนวนโมล CO_2 assimilated ต่อจำนวนโมล CO_2 ใน substomata (Long and Hallgren, 1993)

4.2 การวัดการเจริญเติบโตของข้าว

4.2.1 พื้นที่ใบ คำนวณจากค่าผลคูณของความกว้างใบ, ความยาวใบ และค่าคงที่ (K = 0.725) ตามวิธีการของ Yoshida และคณะ (1976) ดังสมการ

พื้นที่ใบ = ความกว้างใบ x ความยาวใบ x K(0.725)

4.2.2 อัตราการเจริญเติบโตสัมพัทธ์ (Relative Growth Rate, RGR) คำนวณจากอัตราการสร้างน้ำหนักแห้งส่วนต้นต่อหน่วยเวลา ตามวิธีการของ Beadle(1993) ดังสมการ

$$RGR = \frac{\ln W_2 - \ln W_1}{t_2 - t_1}$$ หน่วย $g\ g^{-1}\ d^{-1}$

W_1 และ W_2 = น้ำหนักแห้งส่วนต้นเก็บครั้งที่ 1 และ 2

t_1 และ t_2 = ระยะเวลาในการเก็บเกี่ยวครั้งที่ 1 และ 2

4.2.3 Specific leaf weight (SLW) คำนวณจากความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักแห้งใบต่อหน่วยพื้นที่ใบ (Beadle, 1993) มีหน่วย มิลลิกรัม/ซม.^{2}

4.2.4 วัดน้ำหนักแห้งของใบ กาบใบ ลำต้นและราก โดยอบตัวอย่างให้แห้งที่อุณหภูมิ 80°C นาน 48 ชั่วโมง จนกระทั่งน้ำหนักคงที่ (Yoshida *et al.*,1976)

4.3 การศึกษาพอลิเอมีนในใบข้าว

การวัดพอลิเอมีนในใบข้าวใช้วิธี Dansylation โดยประยุกต์จากวิธีการของ Flores และ Galston (1982) , Smith และ Davies(1985) ประกอบด้วย

4.3.1 การตรวจสอบค่ามาตรฐานของพอลิเอมีน

ค่ามาตรฐานของพอลิเอมีนที่ศึกษาในครั้งนี้คือ putrescine (Put), spermidine (Spd) และ spermine (Spm) เตรียมค่ามาตรฐานของ Put, Spd และ Spm แต่ละชนิดใช้ความเข้มข้น 5 ระดับ คือ 0, 0.184 ,0.368 ,0.552, 0.735 และ 0.920 นาโนโมล ในแต่ละตัวอย่างผสมสารทั้งสามชนิดเข้าด้วยกัน ทำจำนวน 9 ซ้ำ ส่วนอีก1 ชุด แยกค่ามาตรฐานของ Put, Spd และ Spm ออกจากกัน เพื่อใช้เป็นค่ามาตรฐานสำหรับการกำหนดค่า Rf ของสารแต่ละตัว จากนั้นนำไปทำ Dansylation พร้อมกับแยกชนิดของพอลิเอมีนด้วยวิธี Thin layayer chromatography (TLC) ใช้ระบบ solvent system คือ chloroform : triethylamine (25:2 v/v) เพื่อแยกชนิดสารออกจากกันโดยเปรียบเทียบค่า Rf พร้อมขูด dansylpolyamine band มาวัดค่าด้วย Spectrofluorometer โดยกำหนดปริมาณสูงสุดของ Put, Spd และ Spm ให้มีค่า fluorescence เท่ากับ 100 ซึ่งในการวัดค่า Put, Spd และ Spm แต่ละครั้งมีการปรับค่า fluorescence สูงสุดใหม่ตามชนิดของสารที่ศึกษา นำค่ามาตรฐานที่อ่านได้ในแต่ละชุดมาเขียนกราฟมาตรฐาน โดยให้แกน X คือค่าปริมาณพอลิเอมีนแต่ละชนิด ส่วนแกน y คือค่า fluorescence พร้อมทั้งคำ นวนค่า SD และ CV(%) จากการทดลอง (ตารางที่1 และภาพที่2)

4.2.2 การตรวจสอบความแม่นยำ (precision) และความเที่ยงตรง (accuracy)

การวัดค่า recovery(%)

เตรียมจากตัวอย่างพืช (crude extract) และตัวอย่างพืชกับปริมาณ Put, Spd และ Spm ที่ทราบค่า ซึ่งในที่นี้ใช้สารแต่ละชนิดปริมาณ 0.184,0.368, 0.552 และ 0.732 นาโนโมล ทำจำนวน 4 ซ้ำ นำไปทำ Dansylayion พร้อมทั้งแยกชนิดด้วยวิธี TLC วัดปริมาณด้วย Spectrofluorometer นำตัวอย่างไปเทียบกับค่ามาตรฐานของสารแต่ละชนิด ส่วนการหาค่า recovery คำนวนจากผลต่างระหว่างตัวอย่างพืชปกติพืชที่เติมสารแต่ละชนิดที่ทราบปริมาณแล้วเทียบค่าเป็นเปอร์เซ็นต์ พร้อมทั้งแสดงค่า SD และ CV(%) จากการทดลอง (ตารางที่2)

การตรวจสอบ Intraassay precision

เตรียมจากตัวอย่างพืช (crude extract) ประมาณ 20 มิลลิลิตรสำหรับใช้ตรวจสอบทั้ง Interassay และ Intraassay precision

การทำ Intraassay precision เพื่อวัดความแม่นยำจากการหาปริมาณพอลิเอมีนภายในชุดการทดลองใช้ตัวอย่างพืชจำนวน 10 ซ้ำ จาก 1 แผ่นของ TLC plate

โดยเตรียมค่ามาตรฐานของสารทั้ง 3 ชนิดปริมาณ 0, 0.184, 0.368, 0.552, 0.735 และ 0.920 นาโนโมล นำไปทำ Dansylation พร้อมทั้งแยกชนิด Put, Spd และ Spm ด้วยวิธี TLC วัดปริมาณด้วย Spectrofluorometer เปรียบเทียบตัวอย่างกับค่ามาตรฐาน หา Intraassay precision โดยพิจารณาค่า Put, Spd และ Spm ที่วัดได้จากตัวอย่างพืชเปรียบเทียบค่าที่วัดได้ระหว่างซ้ำโดยพิจารณาร่วมกับค่า SD และ CV(%) (ตารางที่3)

การทำ Interassay precision เพื่อวัดความเที่ยงตรง (accuracy) จากการหาปริมาณพอลิเอมีนระหว่างชุดทดลอง ใช้ตัวอย่างพืชจำนวน 8 ซ้ำ (TLC plate 8 แผ่น) ซึ่งTLC plate ใน 1 แผ่น load ตัวอย่างพืชลงไป 10 lane โดยเตรียมค่ามาตรฐานของสารเช่นเดียวกับการทำ Intraassay precision นำไปทำ Dansylation พร้อมทั้งแยกชนิด Put, Spd และ Spm ด้วยวิธี TLC วัดปริมาณด้วย Spectrofluorometer เปรียบเทียบตัวอย่างกับค่ามาตรฐาน โดยเปรียบเทียบค่า Put, Spd และ Spm ที่วัดได้จากตัวอย่างพืชระหว่าง TLC plate จำนวน 8 แผ่น โดยพิจารณาร่วมกับค่า SD และ CV (%) ซึ่งสามารถอธิบายความเที่ยงตรง (accuracy) ตามตารางที่4

4.2.3 การวัดพอลิเอมีนในใบข้าว

สกัดพอลิเอมีนจากเนื้อเยื่อข้าว

ชั่งใบสดข้าว 500 มิลลิกรัม นำมาบดในโกร่งด้วย cold 5% $HClO_4$ จำนวน 1 มิลลิลิตร ดูดพอลิเอมีนที่สกัดได้ใส่ในหลอด Eppendorf ขนาด 1.5 มิลลิลิตร แช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วจึงนำไปปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็ว 13,000 g นาน 10 นาที นำสารละลายพอลิเอมีนที่สกัดได้ไปทำ dansylation และวัดปริมาณพอลิเอมีนต่อไป หรือหากยังไม่นำมาใช้ควรเก็บไว้ที่อุณหภูมิ –40°C

การทำ Dansylation

ดูดสารละลายพอลิเอมีนที่สกัดได้จากใบพืช 200 ไมโครลิตร พร้อมกับเติมโซเดียมคาร์บอเนตอิ่มตัว (saturated) 200 ไมโครลิตร และ dansyl chloride ที่ละลายใน acetone(5 mg/ml) 400 ไมโครลิตร ผสมให้เข้าเป็นเนื้อเดียวกัน นำไปบ่มใน shaking water bath ที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมงในที่มืด หลังจากนั้นเติม proline (100 mg/ml) 100 ไมโครลิตรลงไป ทิ้งไว้ 30 นาที เพื่อให้ proline จับกับ dansyl chloride ที่มีมากเกิดพอในปฏิกิริยา แล้วเติม benzene 500 ไมโครลิตร เขย่า

ด้วย vortex นาน 30 วินาที ปล่อยไว้ 10 นาที ส่วนผสมถูกแยกออกเป็น 2 ส่วนคือ aqueous phase และ organic phase นำส่วนของ organic phase ซึ่งอยู่ชั้นบนและมีพอลิเอมีนผสมอยู่มาใช้ทันที หรือเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -40°C สำหรับค่ามาตรฐาน (standard) ของพอลิเอมีนทั้ง Put, Spd และ Spm ทำตามวิธีการเดียวกับตัวอย่าง โดยแยกค่ามาตรฐานแต่ละตัว หรือรวมทั้ง 3 ตัวเข้าด้วยกัน ค่ามาตรฐานที่ใช้ในการวัดค่า Put, Spd และ Spm นี้ มีความเข้มข้นที่ 0, 0.184, 0.368, 0.552, 0.735 และ 0.920 นาโนโมลาร์ สำหรับการตรวจสอบความแม่นยำ (precision) และความเที่ยงตรง (accuracy) ของวิธีการทดลอง ใช้วิธี Interassay precision และ Intraassay precision จำนวน 10 ซ้ำ รวมทั้งการทำ Recovery check พิจารณาข้อมูลที่ได้จากค่า Standard deviation (SD) และ Coefficient variation (%CV) รวมทั้งเปอร์เซ็นต์ Recovery ประกอบการทดลอง

การหาแยกสารพอลิเอมีนด้วยวิธี Thin layer chromatography (TLC)

วิธีนี้ใช้ LK6D Silica gel plate เป็น stationary phase และความเข้มข้นของสารเป็น mobile phase ในที่นี้ Solvent system ที่ใช้คือ chloroform : triethylamine (25 : 2 v/v) วิธีการโดย load สารละลายพอลิเอมีน 50 ไมโครลิตร ลงบน pre-adsorbent zone นำไปทำ chromatogram develop 1 ชั่วโมง เพื่อแยกพอลิเอมีนแต่ละชนิดออกจากกัน โดยเปรียบเทียบค่า Rf ของ unknown กับค่ามาตรฐานของ Put, Spd และ Spm (ค่า Rf เท่ากับ 0.60, 0.80 และ 0.90 ตามลำดับ) ภายใต้แสงอัลตร้าไวโอเลต (255/366) สำหรับค่า Rf คำนวณได้จาก

$$\text{Rf (Retardation factor)} = \frac{\text{ระยะจากจุดเริ่มต้นถึงตำแหน่งสุดท้ายของสารที่แยกได้}}{\text{ระยะจากจุดเริ่มต้นถึงตำแหน่งที่สารเคลื่อนที่}}$$

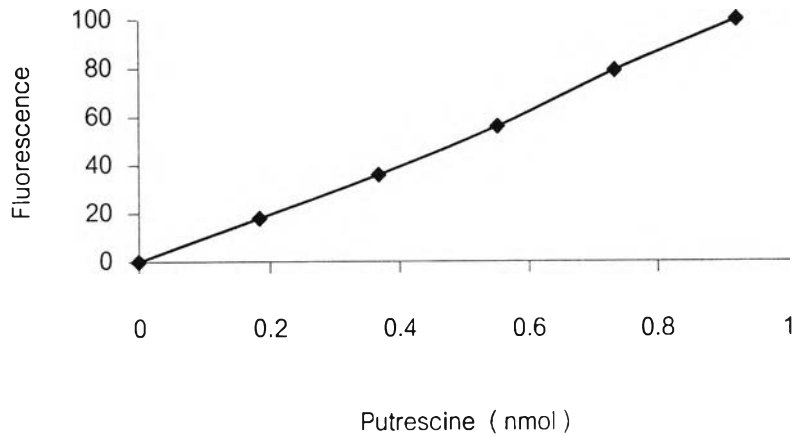
การวัดปริมาณพอลิเอมีน

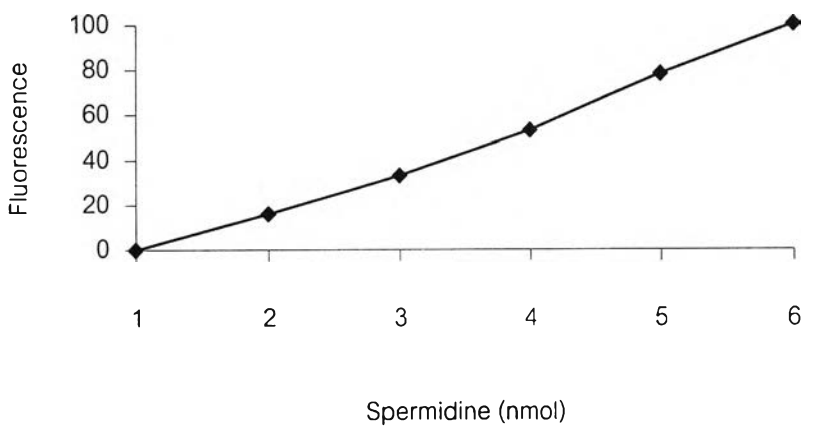
วิธีการโดยขูด dansylpolyamine band มาละลายด้วย ethylacetate นำไปวัดค่าด้วย Spectrofluorometer ที่ค่า excitation 365 nm และ emission 460 nm โดยเปรียบเทียบกับค่ามาตรฐานของ Put, Spd และ Spm ตามลำดับ

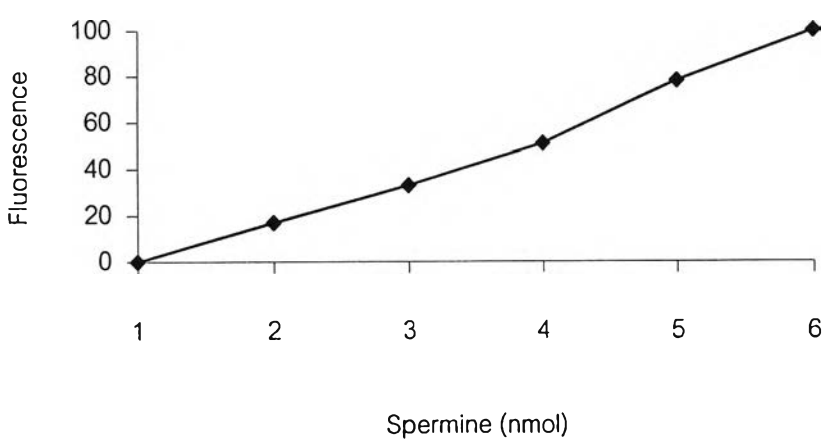
5 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

วิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูล (analysis of variance) ตามการจัดตำรับทดลองแบบ Factorial in CRD เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างตำรับทดลอง โดยใช้ Least Significant Difference (LSD) ที่ระดับความเชื่อมั่นทางสถิติ 95 เปอร์เซ็นต์ วิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยของโซเดียมคลอไรด์ ลักษณะทางสรีรวิทยา และการเจริญเติบโต ปริมาณพอลิเอมีนในใบของข้าวแต่ละพันธุ์ โดยใช้ multiple regression model พร้อมทั้งวัดสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ (correlation coefficients of R^2) ระหว่างปัจจัยดังกล่าว (Gomez and Gomez, 1984)

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย







ภาพที่ 2 ค่ามาตรฐาน Putrescine, Spermidine และ Spermine

ตารางที่ 1 ค่ามาตรฐานของ Putrescine, Spermidine และ Spermine
ข้อมูลเฉลี่ย ± SD จำนวน 9 ซ้ำ

Polyamine	Putrescine		Spermidine		Spermine	
(nmol)	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
0.920	100	-	100	-	100	-
0.735	79	3.22	78	3.98	78	3.16
0.552	56	3.47	53	3.11	51	2.67
0.368	36	4.50	33	1.97	33	2.49
0.184	18	2.27	16	2.83	17	2.02
0	0	-	0	-	0	-

ตารางที่ 2 ค่า Recovery (%) ของ Putrescine, Spermidine และ Spermine ใน crude extract
ข้อมูลเฉลี่ย ± SD จำนวน 4 ซ้ำ

Sample	Polyamine content (nmol)		
	Putrescine	Spermidine	Spermine
Initial crude extract	0.014±0.011	0.091±0.013	0.262±0.018
Initial + 0.184 nmol PA mixed	0.173±0.005	0.257±0.011	0.419±0.017
Initial + 0.368 nmol PA mixed	0.372±0.025	0.431±0.023	0.622±0.035
Initial + 0.552 nmol PA mixed	0.580±0.031	0.564±0.002	0.751±0.030
Initial + 0.732 nmol PA mixed	0.775±0.006	0.721±0.003	0.859±0.021
	Recovery (%)		
Initial crude extract	100 ± 0.011	100 ± 0.013	100 ± 0.018
Initial + 0.184 nmol PA mixed	86 ± 0.005	90 ± 0.011	85 ± 0.017
Initial + 0.368 nmol PA mixed	97 ± 0.025	92 ± 0.023	97 ± 0.035
Initial + 0.552 nmol PA mixed	102 ± 0.031	86 ± 0.002	89 ± 0.030
Initial + 0.732 nmol PA mixed	103 ± 0.006	86 ± 0.003	81 ± 0.021
mean	97	89	88

ตารางที่ 3 ค่า Intraassay precision ของ Putrescine, Spermidine และ Spermine ใน crude extract ข้อมูลเฉลี่ย ± SD จำนวน 10 ซ้ำ

Sample	Putrescine (nmol)	Spermidine (nmol)	Spermine (nmol)
1	0.020	0.104	0.296
2	0.020	0.080	0.255
3	0.020	0.104	0.288
4	0.020	0.088	0.255
5	0.028	0.104	0.247
6	0.020	0.104	0.263
7	0.020	0.080	0.239
8	0.020	0.096	0.239
9	0.020	0.104	0.255
10	0.020	0.096	0.263
Mean	0.021	0.096	0.260
SD	0.003	0.010	0.019
CV(%)	12.05	10.39	7.28

ตารางที่ 4 ค่า Interassay precision ของ Putrescine, Spermidine และ Spermine ใน crude extract ข้อมูลเฉลี่ย ± SD จำนวน 8 ซ้ำ

Sample	Putrescine (nmol)	Spermidine (nmol)	Spermine (nmol)
1	0.021	0.096	0.260
2	0.023	0.108	0.262
3	0.018	0.120	0.240
4	0.018	0.103	0.281
5	0.022	0.118	0.262
6	0.015	0.112	0.245
7	0.021	0.122	0.268
8	0.021	0.103	0.236
Mean	0.020	0.110	0.257
SD	0.003	0.009	0.014
CV (%)	12.35	7.92	5.53