

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）

既存添加物の品質向上に資する研究

(20KA1008)

令和3年度研究分担報告書

既存添加物の有効成分の解明

～qNMR を用いた既存添加物の成分規格試験法に関する研究～

研究分担者 永津明人 金城学院大学薬学部 教授

研究要旨 規格試験法が確立されていない既存添加物に対して、 ^1H -qNMR法(定量 ^1H -NMR法)が試験法として適用可能であるか可能性を検討した上で、適用の可能性のあるものに関して、実際に適用する場合の測定条件の確立、あるいはそれを応用した正確な定量法の検討を目的として研究を行なった。令和3年度も引き続き「香辛料抽出物」の規格試験法への適用の可能性を検討とした。「香辛料抽出物」は実態がわからないものも多いが、令和3年度はその中からローズマリーとケイヒを ^1H -qNMR法での定量が可能かの検討を行った。ローズマリーの検討では、指標成分として適切であろう rosmarinic acid の ^1H -qNMR法を用いた定量の検討を行い、 ^1H -qNMR法で定量可能であることを示し、既存のHPLC法との同等性を確認できた。ケイヒについては令和2年度にも検討を行ったが、HPLCとの比較において、HPLCでの定量でばらつきが大きかったこと、及び生薬としても重要な物であることから、追試として検討を行った。ケイヒの検討では、指標成分として適切であろう cinnamaldehyde の ^1H -qNMR法を用いた定量の検討を行い、 ^1H -qNMR法で定量可能であることを示し、また、 ^1H -qNMR法がHPLCよりも優位な cinnamaldehyde の定量法になりうることを示した。

A. 研究目的

^1H -qNMR法は、SIトレーサブルな認証標準物質を内部標準としてNMRスペクトルの測定することで、測定対象サンプルの絶対定量ができる方法である。¹²⁾対象化合物の標準品の存在がHPLC法などの従来法では必須であるのにたいして、それらがなくても絶対定量が可能であることから、標準品が手に入りにくい天然物の定量に好適な測定法である。すなわち、対象物質の ^1H -NMRスペクトルにおいてシグナルが独立して観測される条件さえ設定できれば、動植物の抽出物を用いる既存添加物の品質管理において非常に有用な品質管理手段となりうる。

令和3年度も引き続き既存添加物である「香辛料抽出物」に着目して研究を行った。既存添加物の「香辛料抽出物」は、アサノミ以下73種類の植物から「抽出しまたはこれを水蒸気蒸留して得られたもの」とされている。基原が多様な上、用部も明確には書かれておらず、現時点では規格基準は定められていない既存添加物

である。規格基準を決めるには素材ごとに基準物質を定めて基準の策定をしていく必要がある。特に、基準物質が精油成分である場合、たとえ市販標準物質があっても揮発性であるがゆえにその純度が変化しやすく、正確な純度を得にくい。そのため、その正確な純度を得るには ^1H -qNMR法が適していると考えられる。令和3年度はその中から香辛料抽出物以外にもローズマリー抽出物として既存添加物名簿に名前が上がっているローズマリーをピックアップし、rosmarinic acid (Fig. 1)が主要成分となると考えて、ローズマリーの葉に含まれる rosmarinic acid の定量方法の検討を行った。また、精油成分の含有量が要点となる素材のうち、既存添加物ではシナモンとして収載され、生薬としても重要なケイヒでは cinnamaldehyde (Fig. 2)が指標成分になりうることを考え、この cinnamaldehyde の定量方法に関する検討を行なった。ケイヒ中の cinnamaldehyde の定量は、昨年度も検討を行っていたが、HPLCを用いた定量値が不安定で、

HPLC 値と ^1H -qNMR 法での測定値とどちらが信頼できるかという点で不安を残していた。そのため、その追試という位置付けも兼ねて今年度再度検討した。

B. 研究方法

B-1) 試料及び試薬

^1H -qNMR 測定時の内部標準物質として用いる 3-(trimethylsilyl)-1-propanesulfonic acid sodium salt- d_6 (DSS- d_6 , Fig. 3)は和光純薬の Trace Sure® 規格のものを用いた。NMR 測定用溶媒の dimethylsulfoxide (DMSO)- d_6 , methanol- d_4 , pyridine- d_5 , acetone- d_6 はそれぞれ Isotec Inc. の 99.9, 99.8, 99.5, 99.9 atom %D を用いた。Rosmarinic acid は富士フィルム和光純薬の生化学用試薬を, cinnamaldehyde は東京化成 *trans*-cinnamaldehyde (試薬 A), 富士フィルム和光純薬の (*E*)-cinnamaldehyde 薬局方生薬試験用 (試薬 B) と cinnamaldehyde 和光特級 (試薬 C) を用いた。ローズマリーは、スパイスとして市販されているローズマリー葉の粉末及び乾燥生薬を令和 3 年 8 月に購入した。既存添加物として流通している水溶性ローズマリー抽出物及び非水溶性ローズマリー抽出物も国立医薬品食品衛生研究所に保管中のものの供与を受けた。ケイヒは、スパイスとして市販されている粉末を令和 3 年 10 月に購入したもの(ケイヒ末 A)と、切断生薬として令和 2 年 4 月と令和 3 年 4 月に購入したものを実験前に粉末化(それぞれケイヒ末 B, C)して使用した。

B-2) 装置等

秤量には島津製作所の精密電子天秤 AUW120D を用いた。生薬の粉末化には大阪ケミカル WB-1, 分注操作の電動ピペッターは Eppendorf Multipett E3x, 超音波抽出は超音波洗浄器 Sharp UT-105S, 遠沈操作は遠心器 AS One Mini Centrifuge をそれぞれ用いた。NMR 装置は日本電子 JNM-ECA500 を使用した。HPLC は、ポンプとして JASCO PU-4180, カラムオーブンに Shimadzu CTO-20AC, 検出器はフォトダイオードアレイ検出器 JASCO MD-4010 を用いた。

メンブランフィルターは Cosmonice Filter W 0.45 μm ϕ 13 mm を用いた。

B-3) ^1H -qNMR 法を用いたローズマリー葉中及び既存添加物ローズマリー中の rosmarinic acid の定量

まず, rosmarinic acid の ^1H -qNMR スペクトルの実施の条件検討と, 生薬中あるいは既存添加物中の rosmarinic acid の定量を行うことにした。また, HPLC を用いた定量との比較も行うことにした。

B-3-a) ^1H -qNMR 法に用いる試料の調製

DSS- d_6 はデシケーター中で保管乾燥させたものを用いた。約 10 mg を精秤して 20.00 mL の methanol- d_4 に溶かして内部標準用溶液とした。

Rosmarinic acid 標準品はデシケータ中で一晩乾燥させ, 約 5 mg を精秤して 2.50 mL の内部標準用溶液に溶かした。この溶液 0.600 mL を NMR 試料管にとり qNMR の測定に供した。

ローズマリー葉粉末中及び既存添加物中の rosmarinic acid の測定用試料の調製は, 次のように行った。乾燥させた粉末生薬または既存添加物試料の約 100mg を精秤して acetone (1.00 mL) に懸濁し, 超音波下 30 分抽出を行い, 遠沈し, その上清をとって濃縮乾固した。この操作を 3 回繰り返した。集めた抽出物に内部標準用溶液 (1.00 mL) を加えて完全に溶解したのち, メンブランフィルターを用いて濾過し, 濾液から 0.600 mL を NMR 試料管にとり, ^1H -qNMR の測定に供した。

B-3-b) ^1H -qNMR スペクトルの測定

Rosmarinic acid とローズマリー葉粉末中及び既存添加物の水溶性の抽出液の ^1H -NMR を測定し, rosmarinic acid (Fig. 1) の 8 位のプロトンシグナルが 6.25 ppm に現れることを確認した。(Fig. 4) ^1H -qNMR スペクトルの測定条件は Table 1 に示した条件で測定した。積算回数は 8 回とした。測定によって得られたスペクトルから, rosmarinic acid の 3 位のシグナルと 0.00 ppm とした DSS- d_6 のメチル基プロトンのシグナルの面積を比較して次式に従って rosmarinic acid の濃度を算

$$C_R = (I_R / I_D) \times C_D$$

ただし、 C_D 、 C_R はそれぞれ DSS- d_6 及び rosmarinic acid のモル濃度(mol/mL)、 I_D 、 I_R はそれぞれ DSS- d_6 及び rosmarinic acid の水素 1 個あたりのシグナル面積。

B-3-c) HPLC を用いたローズマリー葉中及び既存添加物ローズマリー中の rosmarinic acid の定量

HPLC は YMC-Triart C18 250 mm x 4.6 mm i.d. のカラムを用い、40°C で MeCN : 0.1%リン酸-H₂O の 20:80、流速 1.0 mL/min で溶出、330 nm における吸光度で検出するという条件で測定を行った。(Fig. 5)

¹H-qNMR 法で定量した rosmarinic acid 標準品の溶液を標準液として検量線を作成した。(Fig. 6)それぞれの生薬試料は、¹H-qNMR スペクトルの測定溶液を HPLC の展開溶媒で 10 倍に希釈し、その試料溶液を 10 μ L 注入して得られたクロマトグラムの rosmarinic acid のピークの面積からその定量を行った。

B-4) ¹H-qNMR 法を用いたケイヒ中の cinnamaldehyde の定量

まず、cinnamaldehyde の ¹H-qNMR スペクトルの実施の条件検討と、ケイヒ中の cinnamaldehyde の定量を行うことにした。また、HPLC を用いた定量との比較も行うことにした。

B-3-a) ¹H-qNMR 法に用いる試料の調製

Rosmarinic acid の測定に用いたものと同じく、DSS- d_6 約 10 mg を精秤して 20.00 mL の methanol- d_4 に溶かした内部標準溶液を調製した。

各試薬の cinnamaldehyde は液体であるため特に前処理は行わず、各約 5 mg を精秤して 1.00 mL の内部標準溶液に溶かした。この溶液 0.600 mL を NMR 試料管にとり qNMR の測定に供した。

ケイヒは市販の食品用(ケイヒ末 A)の粉末はそのまま、切断生薬として入手したケイヒは粉末化して用いた(ケイヒ末 B, C)。粉末中の cinnamaldehyde の測定用試料の調製は、次のように行った。乾燥させた粉末生薬の約 100 mg を

精秤して内部標準用溶液(1.00 mL)に懸濁し、超音波下 30 分抽出を行い、遠沈し、その上清をとってメンブランフィルターを用いて濾過し、濾液から 0.600 mL を NMR 試料管にとり、¹H-qNMR の測定に供した。

B-4-b) ¹H-qNMR スペクトルの測定

Cinnamaldehyde とケイヒ末の抽出液の ¹H-NMR を測定し、cinnamaldehyde (Fig. 1)のアルデヒド基のプロトンシグナルが 9.65 ppm に現れることを確認した。(Fig. 7) ¹H-qNMR スペクトルの測定条件は Table 1 に示した条件で測定した。積算回数は 8 回とした。測定によって得られたスペクトルから、cinnamaldehyde のアルデヒド基のシグナルと 0.00 ppm とした DSS- d_6 のメチル基プロトンのシグナルの面積を比較して次式に従って cinnamaldehyde の濃度を算出した。

$$C_C = (I_C / I_D) \times C_D$$

ただし、 C_D 、 C_C はそれぞれ DSS- d_6 及び cinnamaldehyde のモル濃度(mol/mL)、 I_D 、 I_C はそれぞれ DSS- d_6 及び cinnamaldehyde の水素 1 個あたりのシグナル面積。

また、試薬の cinnamaldehyde のうち、試薬 A の溶液を内部標準溶液で順次希釈し、各希釈液の ¹H-qNMR スペクトルを測定して、検量線を作成した。

また、添加回収実験を次のように行なった。ケイヒ末 C 約 100 mg を精秤し、cinnamaldehyde(試薬 A)約 5 mg を精秤して内部標準用溶液(1.00 mL)に溶解した溶液 1.00 mL に懸濁し、超音波下 30 分抽出、遠沈した。その上清をとってメンブランフィルターを用いて濾過し、濾液から 0.600 mL を NMR 試料管にとり、¹H-qNMR の測定に供した。この時の積分値(X)と、ケイヒ末 C 約 100 mg を内部標準用溶液(1.00 mL)から同様に試料を調製して ¹H-qNMR の測定した時の積分値(Y)、cinnamaldehyde(試薬 A)約 5 mg を精秤して内部標準用溶液(1.00 mL)に溶解した溶液から調製した試料の ¹H-qNMR 測定から得られた積分値(Z)から、次式に従って添加回収率を算出した。

$$\text{添加回収率} = [X / (Y + Z)] \times 100 (\%)$$

B-4-c) HPLC を用いたケイヒ中の cinnamaldehyde の定量

HPLC は COSMOSIL 5C18-MS-IIあるいは COSMOSIL 5C18-AR-IIのそれぞれ 4.6 ID × 250 mm のカラムを用い、40°Cで MeCN-H₂O または MeOH-H₂O の溶媒系で初期条件 40 : 60 → 20 min に 55 : 45 → 25 min に 90 : 10 というグラジエント、流速 1.0 mL/min で溶出、280 nm における吸光度で検出するという条件で測定を行った。

¹H-qNMR 法で定量した試薬の cinnamaldehyde うち、試薬 A の溶液を標準液として検量線を作成することを試みたが、結果で述べるように cinnamaldehyde のピークの形が時間経過とともに崩れてくる現象が観察された。(Fig. 8) 他の試薬でも同様であったため、HPLC における定量は断念した。

C. 結果及び考察

C-1) ローズマリー葉中及び既存添加物ローズマリー中の rosmarinic acid の定量

Rosmarinic acid 標準品中の rosmarinic acid の定量を ¹H-qNMR 法で行った結果、89.2±1.0%と見積もられ、試薬の純度表示(96%以上)よりも小さな値となった。

非水溶性ローズマリー抽出物では rosmarinic acid のシグナルは観測できなかったため、この試料での検討は行わなかった。ローズマリー葉中及び既存添加物の水溶性ローズマリー抽出物中の rosmarinic acid では、抽出溶媒を acetone, methanol, ethylacetate, DMSO, chloroform, pyridine で検討、測定溶媒を (DMSO)-d₆, methanol-d₄, pyridine-d₅, acetone-d₄ で検討した。その結果、ローズマリー葉の粉末及び水溶性ローズマリー抽出物では、rosmarinic acid のシグナルが観測され、そのシグナルの大きさから、抽出効率という点では各抽出溶媒で大きな違いは見られなかったものの、acetone 抽出を行うと 8-H 周辺で観測されるシグナルが少なくなり、さらに測定を methanol-d₄ で行うと 8-H の付近の小さなシグナルも 8-H から離れて観測される

状況となった。よって、この acetone で抽出 → methanol-d₄ で測定という組み合わせにして行うことにした。¹H-qNMR 測定の結果、ローズマリー葉の粉末中の rosmarinic acid 含有率は 0.35±0.03%、水溶性ローズマリー抽出物中では 0.60±0.11%という結果を得た。(Table 2) HPLC で rosmarinic acid の検量線を作成したところ、良好な相関の検量線を得ることができた。この検量線からローズマリー葉中及び既存添加物の水溶性ローズマリー抽出物中の rosmarinic acid の含有率を算出したところ、ローズマリー葉中では 0.34±0.03%、水溶性ローズマリー抽出物中では 0.60±0.13%という結果が得られ、¹H-qNMR 法での数値に極めて近似した値が得られた。¹H-qNMR 法が HPLC の代わりにとり得る方法であることが確認できた。

一方、水溶性ローズマリーでは両測定法ともに測定値に対するばらつきが大きいと考えることもできる。特に ¹H-qNMR 方でのばらつきの大きさは、8-H のシグナルの裾に小さなシグナルが存在するようにも見えるため、このシグナルと積分値の取り方との関係で、人為的なばらつきが出やすい状況になっているとも考えられる。Rosmarinic acid に関しては、標準品の rosmarinic acid 溶液を ¹H-qNMR 法で値づけをして、その溶液を基に HPLC で定量するという方法が確立されている。^{3,4)} ¹H-qNMR 法を用いての水溶性ローズマリー抽出物中の rosmarinic acid も不可能ではないが、精密さという観点からは HPLC の利用の方が優位であると考えられた。

C-2) ケイヒ中の cinnamaldehyde の定量

Cinnamaldehyde 試薬 A, B, C 中の cinnamaldehyde の定量を ¹H-qNMR 法で行った結果、それぞれ 99.43±2.57%, 92.04±1.03%, 97.94±1.17%と見積もられた。ケイヒ末 A, B, C 中の cinnamaldehyde の ¹H-qNMR 法を用いた定量では、それぞれ 3.46±0.04%, 2.39±0.06%, 2.72±0.04%と見積もられた。(Table 3)

次に、HPLC で cinnamaldehyde の測定を試みたが、上述のように cinnamaldehyde のピークの形が時間経過とともに崩れてくる現象が観察さ

れた。Cinnamaldehyde を MeOH-H₂O または CH₃CN-H₂O に希釈して inject するが、MeOH-H₂O 系の溶媒で展開するとメインのピークの後に分離しきらない形で小さな緩やかなピークが連なり始める状態となり、CH₃CN-H₂O 系の溶媒で展開すると、メインのピークに鋭い小さなピークがついてくるという形になった。(Fig. 8) 溶液として保存している過程または展開中に cinnamaldehyde が変化していることを示唆している。この変化がどのような条件で起こり、何が生成しているかについては今後検討したい。

HPLC での定量は信頼性が低いと考えて、HPLC における定量と ¹H-qNMR を用いた定量との比較をすることは断念した。¹H-qNMR 法を用いることの信頼性の確認のため、積分値と濃度の相関、添加回収率、定量の限界についての確認も行った。Fig. 9 に示すように、積分値と濃度との間には極めて良い相関があることが確認できた。添加回収実験の結果、添加回収率は 96.3% で、極めて良好な回収率だった。また、濃度を変えながら純度測定を行った結果、0.1 mg/mL 程度の濃度までは誤差 1% 程度に抑えられていることがわかった。故に 0.1 mg/mL 程度の濃度までは ¹H-qNMR 法で測定が可能であることがわかった。

ところで、試薬の純度測定において試薬 B だけが表示の規格と大きく異なっていたが、この試薬 B は純度を HPLC で検査している旨の記載がされていた。Cinnamaldehyde の定量を HPLC で行っている報告は多数あるが、上記のように HPLC による定量の信頼性が低い可能性がある。試薬 B の純度だけが表示と大きく異なったのはこのようなことも関連しているかもしれない。他の試薬は GC で検証したとされている。この GC での検証の元となった標準物質の純度の検証については不明である。¹H-qNMR の特色を考えると、¹H-qNMR が cinnamaldehyde の唯一の正確な定量手段となる可能性が考えられる。

D. 結論

1) ローズマリー葉中、及び既存添加物の水溶性ローズマリー抽出物中の rosmarinic acid の ¹H-

qNMR 法を用いた定量条件を確立した。

2) ケイヒ中の cinnamaldehyde の ¹H-qNMR 法を用いた定量条件を確立した。この過程で、HPLC を用いた cinnamaldehyde の定量時に cinnamaldehyde が不安定であるかことを示唆する現象が観察され、定量の信頼性という観点でも ¹H-qNMR 法が cinnamaldehyde の定量において優れた方法であることが示された。既存添加物の規格を定める場合とともに、生薬ケイヒの品質管理にも適応できる可能性を示した。

E. 参考文献

- 1) Tahara M, Sugimoto N, Suematsu T, Arifuku K, Saito T, Ihara, T, Yoshida Y, Tada A, Kubota R, Shimizu K, Yamazaki T, Tanamoto K, Nakazawa H, Nishimura T. *Jpn J Food Chem Safety* **16**, 28-33 (2009).
- 2) 厚生労働省, 第 18 改正日本薬局方, pp2623 (2021).
- 3) Naoko Masumoto, Yuzo Nishizaki, Naoki Sugimoto, Kyoko Sato. *日本食品化学学会誌*, **25**(2), 105-113(2018).
- 4) Yuzo Nishizaki, Naoko Masumoto, Kaori Nakajima, Kyoko Ishizuki, Taichi Yamazaki, Miho Kuroe, Masahiko Numata, Toshihide Ihara, Atsuko Tada, Naoki Sugimoto and Kyoko Sato, *Food Additives & Contaminants, Part A*, **36**(2), 203-211 (2019).

F. 研究業績

1. 学会発表等

1-1. 学会

- 1) 定量NMR (¹H-qNMR)を用いた生薬中の精油成分の定量～オールスパイス中の eugenol 及びケイヒ中の cinnamaldehyde の定量～, 加納優奈, 今川真由香, 福本帆花, 永津明人, 西崎雄三, 増本直子, 杉本直樹, 佐藤恭子, *日本薬学会第142年会*(2022年3月, 名古屋).

2. 論文発表等

2-1. 論文

- 1) Fujiwara, Yumi; Miwa, Mako; Nagatsu, Akito; Honma, Atsushi: Identification of Maple

Anthocyanin and its Antiproliferative Activity against LLC, T47D and C3H10T1/2 Cells. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, **21**(7), 894-901(2021).

G. 知的財産権の出願. 登録状況
なし

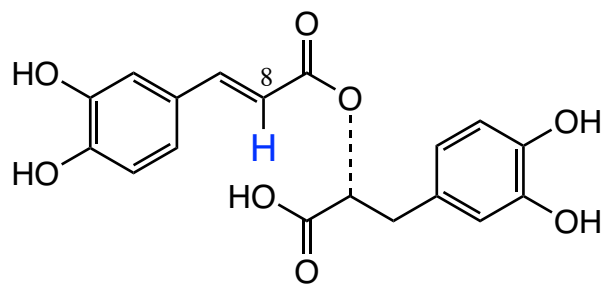


Fig. 1 Rosmarinic acid の構造

8 位のプロトンが ^1H -qNMR 法を適用する際の積分値を測定したプロトン

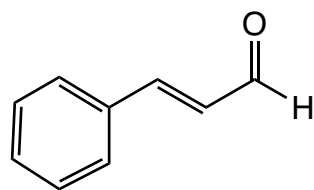


Fig. 2 Cinnamaldehyde の構造

アルデヒド基の H と書かれたプロトンが ^1H -qNMR 法を適用する際の積分値を測定したプロトン

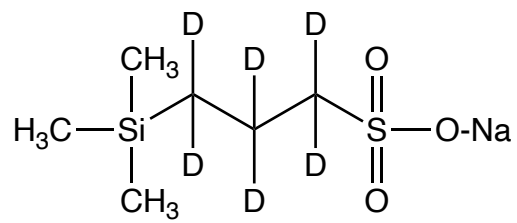


Fig. 3 定量用の認証標準物質: DSS-*d*₆

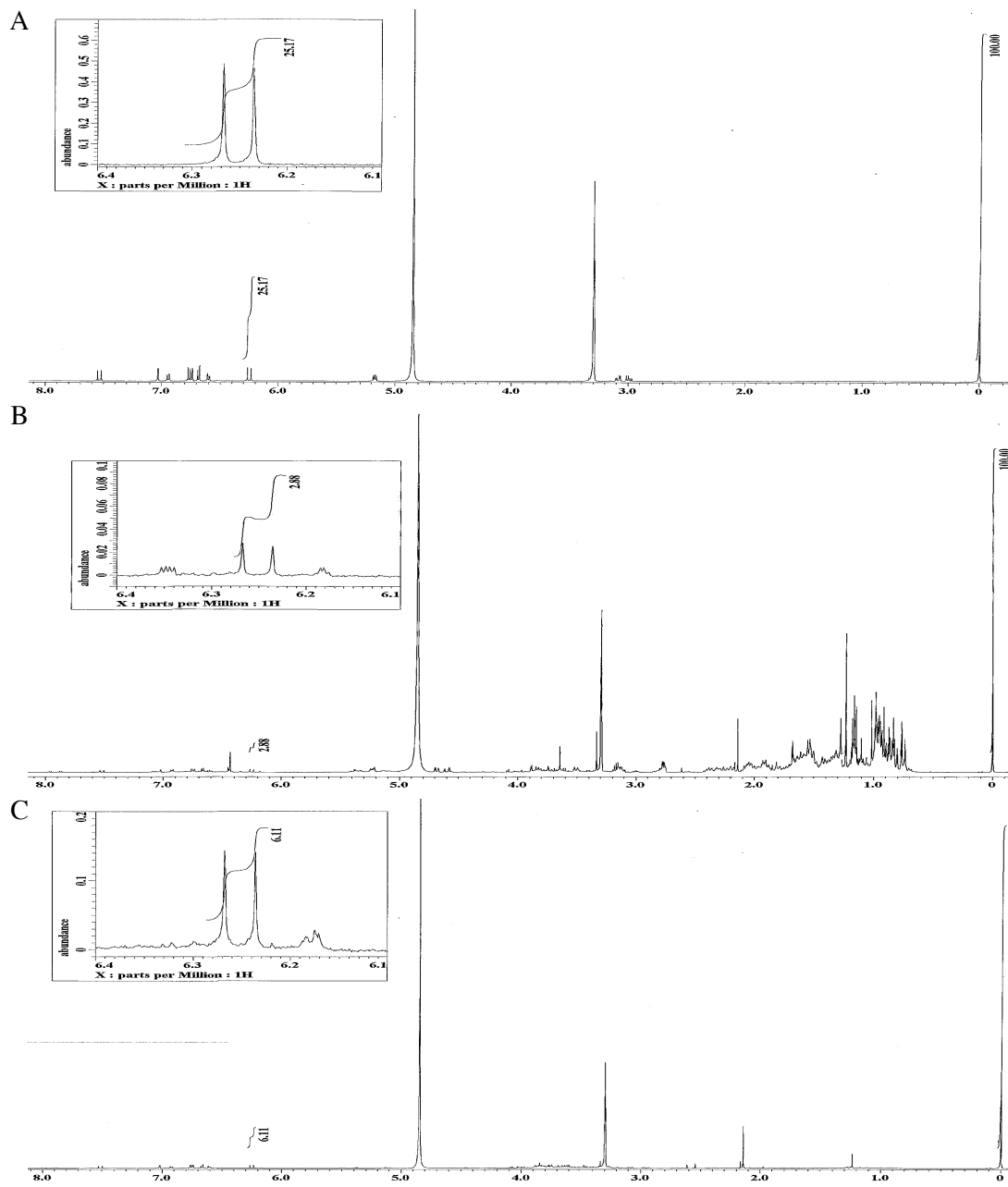


Fig. 4 Rosmarinic acid 試薬(A), ローズマリー葉(B)及び既存添加物のローズマリー水性抽出物(C)の¹H-qNMR スペクトル (in methanol-*d*₄, 500 MHz)
 拡大図は rosmarinic acid の 8-H のシグナル.

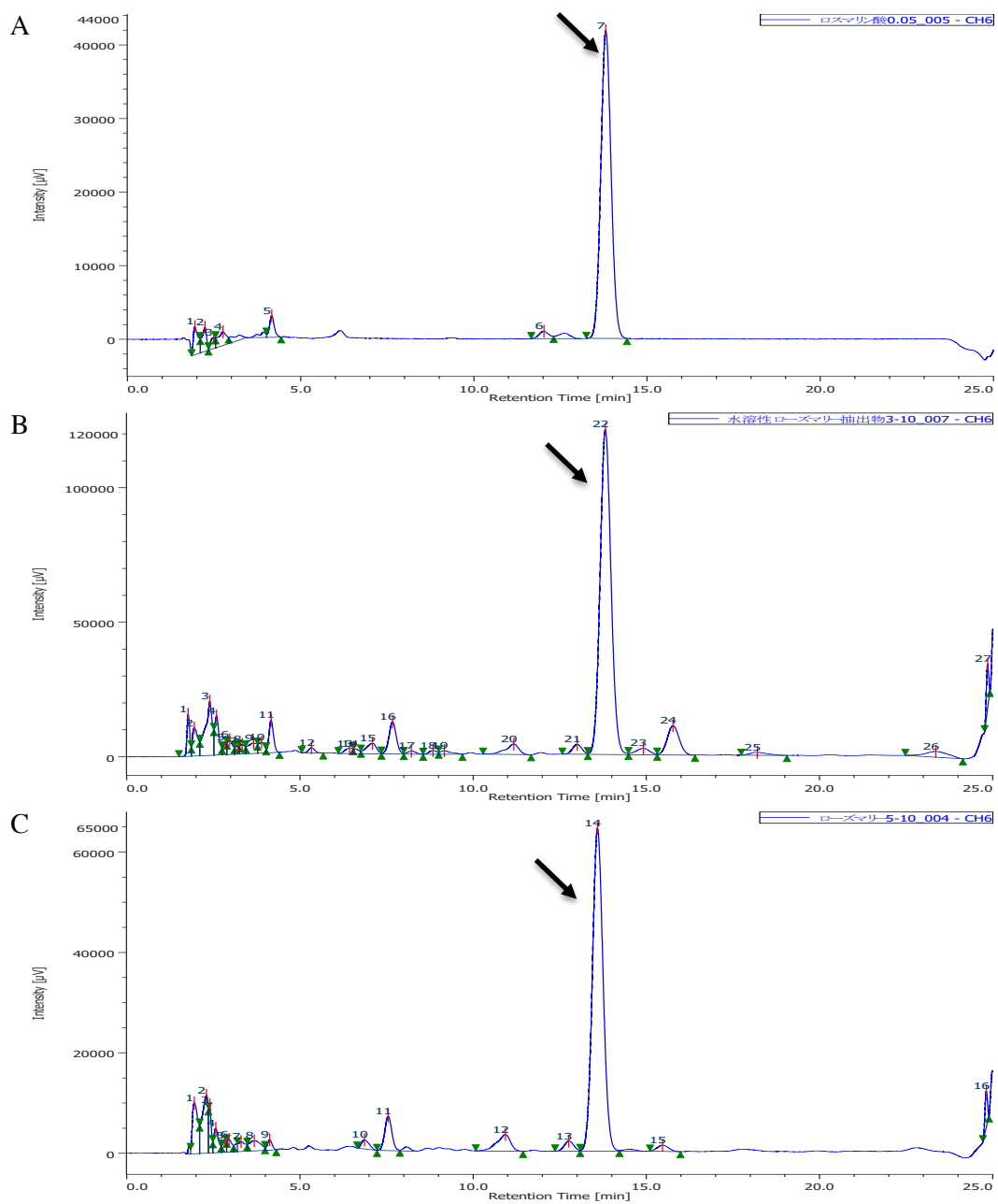


Fig. 5 Rosmarinic acid 試薬(A), ローズマリー葉(B)及び既存添加物のローズマリー水性抽出物(C)のHPCLクロマトグラム
矢印は rosmarinic acid のピーク.

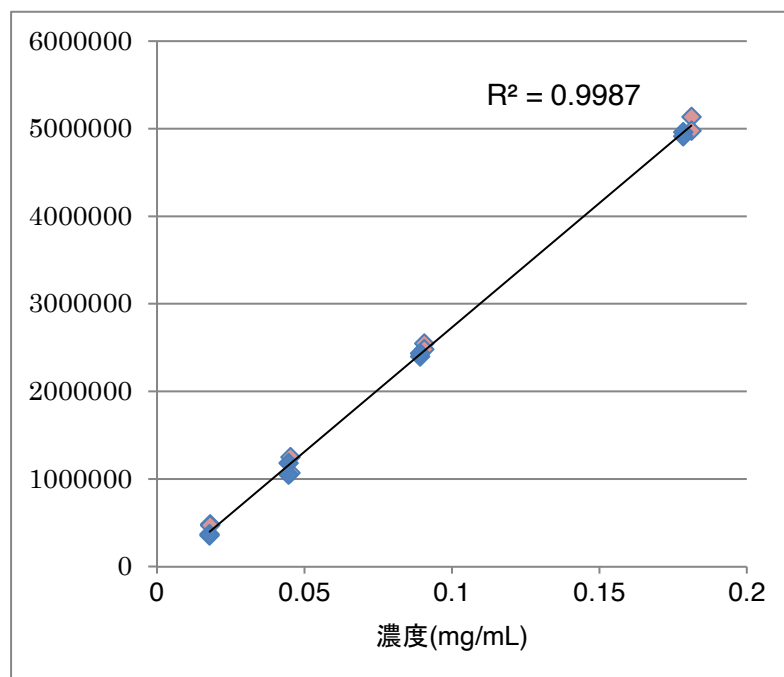


Fig. 6 HPLC における rosmarinic acid の検量線

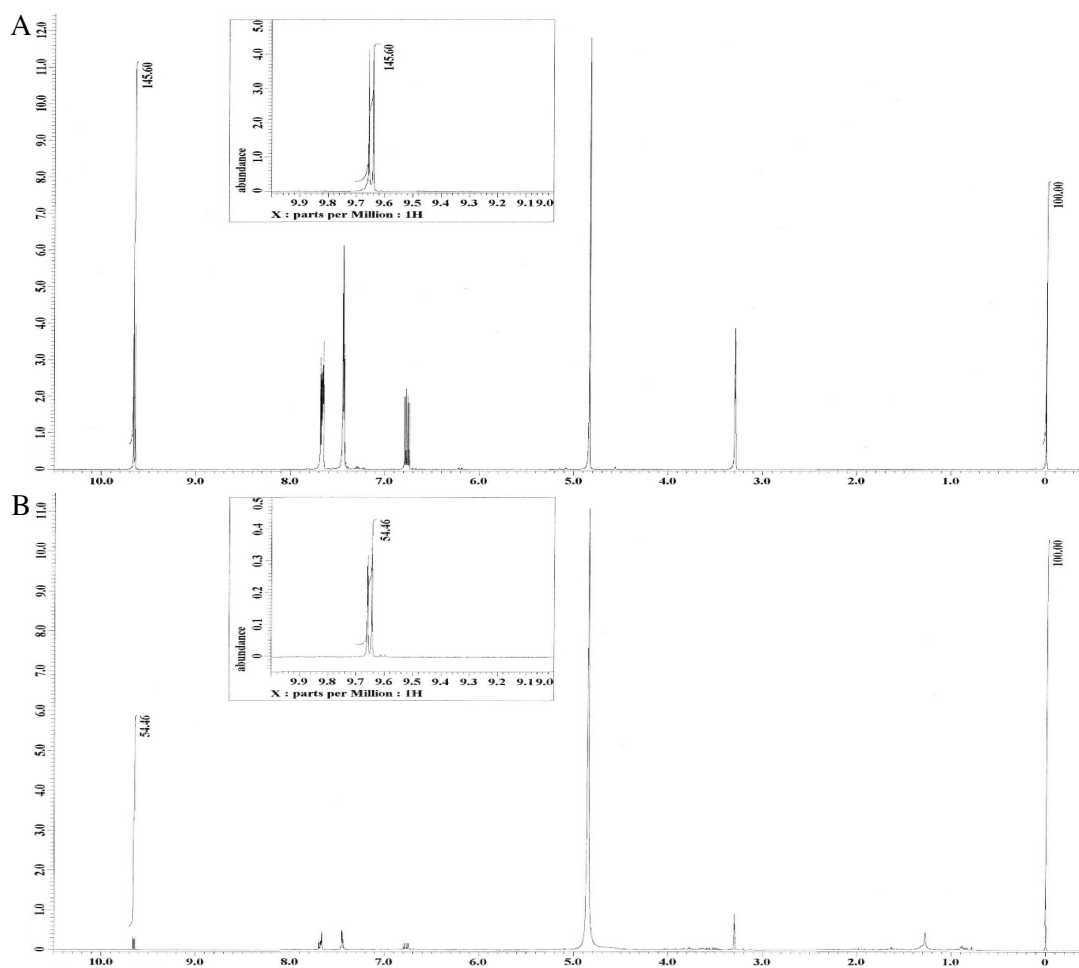


Fig. 7 Cinnamaldehyde 試薬 A (A)とケイヒ末 C (B)の ^1H -qNMR スペクトル (in methanol- d_4 , 500 MHz)

拡大図は cinnamaldehyde のアルデヒド基プロトンのシグナル。

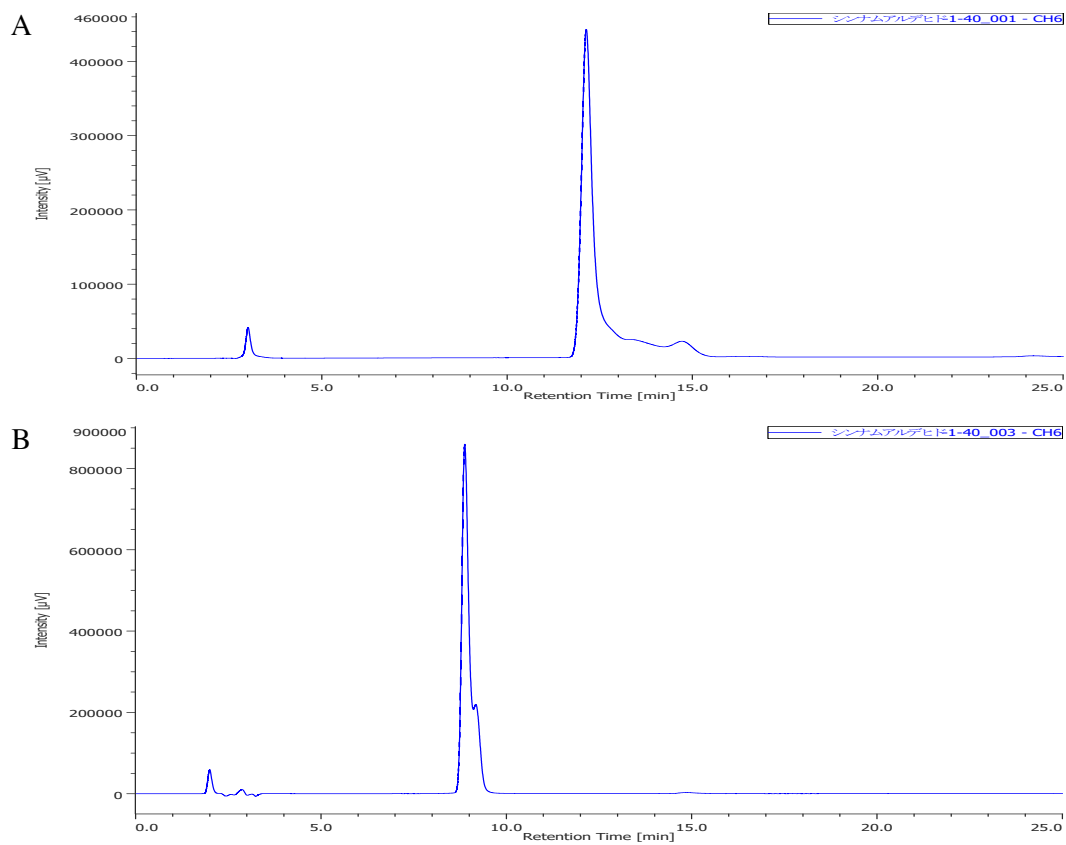


Fig. 8 Cinnamaldehyde 試薬の HPCL クロマトグラム

A は MeOH-H₂O 系の溶媒で展開したときのクロマトグラム, B は CH₃CN-H₂O 系の溶媒で展開したときのクロマトグラム.

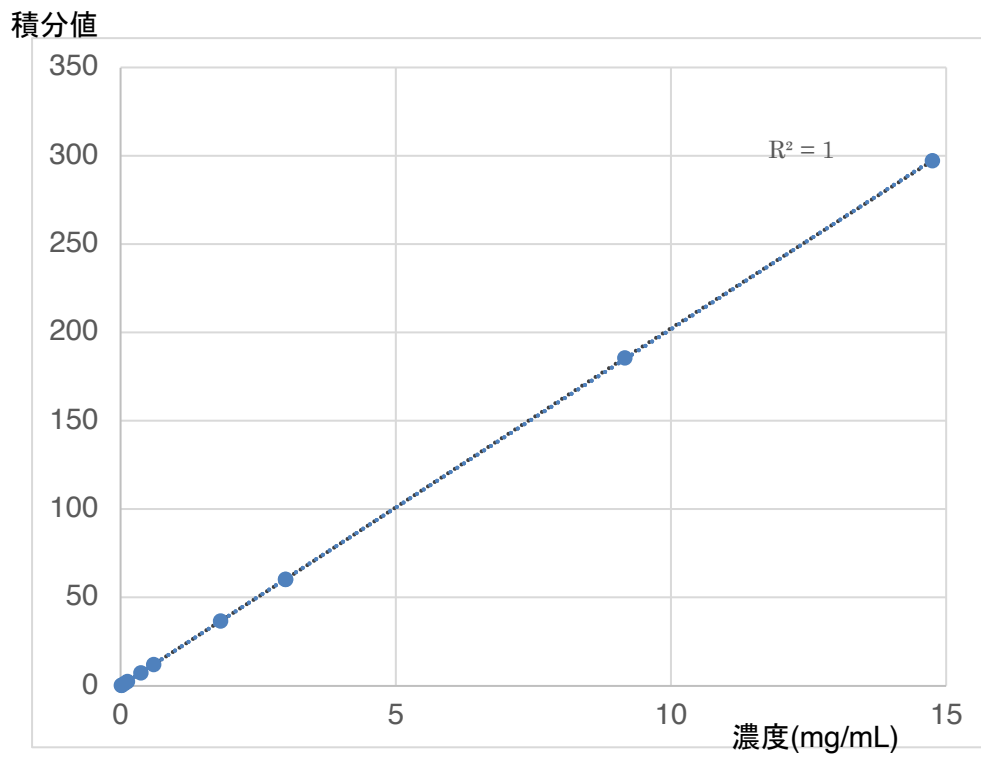


Fig.9 ^1H -qNMR 法での定量における cinnamaldehyde 濃度と積分値との相関

Table 1 ¹H-qNMR スペクトルの測定条件

分光計	日本電子 ECA500
観測範囲	-5 ~ 15 ppm
データポイント数	32000
フリップアングル	90°
パルス待ち時間	60 秒
積算回数	8 回
スピン	なし
プローブ温度	25°C

Table 2 Rosmarinic acid 試薬, ローズマリー葉中及び既存添加物のローズマリー水性抽出物中の rosmarinic acid の含有率

samples	¹ H-qNMR での含有率(%)			HPLC での含有率(%)		
	平均±SEM			平均±SEM		
試薬#	89.18	±1.06	(n = 3)			
ローズマリー葉末	0.35	±0.03	(n = 3)	0.34	±0.03	(n = 3)
ローズマリー水性抽出物	0.60	±0.11	(n = 3)	0.60	±0.13	(n = 3)

試薬の純度表示は>96%

Table 3 Cinnamaldehyde 試薬とケイヒ末中の cinnamaldehyde の含有率

samples	試薬の表示純度	¹ H-qNMR での含有率(%)		
		平均	±SEM	(n)
Cinnamaldehyde 試薬 A	>98% (GC)	98.51	±0.10	(n = 3)
試薬 B	>98% (HPLC)	92.04	±1.03	(n = 3)
試薬 C	>98% (Capillary GC)	97.94	±1.17	(n = 3)
ケイヒ末 A		3.46	±0.04	(n = 3)
ケイヒ末 B		2.39	±0.06	(n = 3)
ケイヒ末 C		2.72	±0.04	(n = 3)

Table 4 Cinnamaldehyde (試薬 A) の各濃度での ¹H-qNMR 測定から算出された純度

濃度 (mg/mL)	純度 (%)
14.74	98.51±0.10
9.16	100.68±0.04
3.00	100.09±0.17
1.81	99.80±0.02
0.60	100.85±0.55
0.37	100.81±1.00
0.12	102.87±6.96
0.07	98.55±1.04
0.02	91.82±3.16
0.01	94.93±6.78