

兒茶素溶液的穩定性

陳英玲¹ 林書妍²

摘 要

茶湯中的兒茶素除了自然氧化作用外，表異構化作用應是主要反應之一。利用 HPLC 估算高溫下個別兒茶素的表異構化作用，最主要的變化為由 epi-順式結構轉變為 nonepi-反式結構，逆反應則屬少量。即順式立體結構較反式結構容易產生表異構化作用。由此可知反式結構在自然界較為穩定。茶中的兒茶素絕大多為順式且以 EGCG 及 EGC 為最多，所以兒茶素水溶液因表異構化作用頻繁而難以保存。

粗兒茶素在 pH3~4 溶液中室溫下貯存一個月，其重要兒茶素成分 EGCG 及 EGC 減低率 < 5%；即使在 85°C 下 EGCG 酸性溶液至少能維持 1~2 天無表異構物—GCG 產生。兒茶素在酒精溶液中（15~75%），雖較在純水中安定，但在存放 14~28 天之間可發現兒茶素明顯減少趨勢。

關鍵字：兒茶素溶液、表異構物、穩定性

前 言

茶中的兒茶素類為具有許多保健功效的生理活性物質，包括抗氧化、降血脂、抗菌、抗病毒及防癌等（阮，1995；Dreostic *et al.*, 1997；Jankun *et al.*, 1997；Yang, 1997），其含量約佔綠茶乾重的 6~25%（蔡等，2004）。

綠茶中的兒茶素類主要有七種，分別為(-)-epigallocatechin [(-)-EGC]、(-)-epigallocatechin gallate((-)-EGCG)、(-)-epicatechin gallate [(-)-ECG]、(+)-gallocatechin gallate((+)-GC)、(+)-Catechin gallate((+)-CG)、(-)-epicatechin ((-)-EC)及(+)-catechin ((+)-C)等，其原始結構及其表異構物（epimers）如圖一所示。其中 EGCG、EGC、ECG 及 EC 在高溫加熱時會經 C-2 位置之表異構化作用(epimerization)分別轉變成(+)-gallocatechin gallate((+)-GCG)、GC、CG 及 C，反之則可逆性小（Wang and Helliwell, 2000）。

台灣主要茶樹栽培品種以 EGCG 及 EGC 含量最多，約佔總兒茶素 70%以上，其個別兒茶素含量多寡依序為 EGCG，EGC>>>GC，EC>ECG，C（蔡等，2004）。在茶葉製造過程之發酵作用使兒茶素類發生氧化縮合等化學變化，其終產物在紅茶為茶黃質（theaflavins）及茶紅質（thearubigins）（Bajaj *et al.*, 1987；Davis *et al.*, 1995）。綠茶為不發酵茶，茶菁中的酵素因炒菁或蒸菁而被抑制，兒茶素雖很少發生氧化作用，但表異構化作用仍然會在茶中發生。此種情形在茶飲料中更為明顯（Komatsu *et al.*,

1. 行政院農業委員會茶業改良場 副研究員。台灣 桃園縣。

2. （通訊作者），台灣大學園藝學系 助理。台灣 台北市。

1993)，通常 C-2 位置的表異構化作用在熱溶液中發生 (Kiatgrajai *et al.*, 1982)，而 C-3 位置的表異構化作用只有在氧化去沒食子酸作用 (oxidative degallate) 時才會發生 (Coggon *et al.*, 1973)。

兒茶素的應用性很廣，市場中常見有作為機能性保健食品、飲料、食品添加物、化粧品及日常生活用品（如除臭劑及抑菌劑等）。由於兒茶素為一抗氧化劑，本身容易產生氧化及異構化作用，因此本試驗為探討兒茶素在不同 pH、溫度及不同介質中的變化情形，藉著對兒茶素性質的了解以便在兒茶素純化及應用性方面能有進一步的突破及發展。同時在以 HPLC 分析兒茶素時所使用 0.45 μ m 過濾膜材質對分析準確度及穩定性的影響，一併作詳細之探討。

材料與方法

一、試驗材料

(一) 樣品：

1. 兒茶素類

試驗中所採用的低咖啡因粗兒茶素類購自統園企業，成分如表一所示，總兒茶素含量為 88.09%，其中 EGCG 為 52.46%，咖啡因只有 0.42%。

2. 個別兒茶素標準品

試驗中所採用個別兒茶素標準品包括(-)-EC、(-)-EGC、(-)-ECG、(-)-EGCG、(+)-C、(+)-CG 及(+)-GCG 等均購自 Sigma 公司。

(二) 過濾材料

兒茶素類在進行 HPLC 分析前以膜孔為 0.45 μ m 之 26mm 直徑的圓形過濾膜過濾，所選取的材質包括：polyvinylidene fluoride(PVDF)；polytetrafluoroethylene (PTFE) with a hydrophilic coating；polyethersulfone (PES)；polysulfone (PS)；cellulose acetate (CA)；Nylon (NL)；nitrocellulose (NC)等七種。其中 PVDF、PTFE、PES 及 NC 為 Millipore(U.S.A.) 產品；PS 為 Gelman laboratory (Canada) 產品；CA 為 Microfiltration (The Netherlands) 產品，NL 為 Whatman (England) 產品。

二、試驗方法

(一) 過濾膜材質對兒茶素類吸附作用測試

配製適當濃度之兒茶素標準液，同時各以膜孔為 0.45 μ m 不同材質之濾膜過濾後，以 HPLC 分析之。

(二) 兒茶素類之安定性測定

1. 個別兒茶素表異構物之製備

以純水配製 2mM 濃度之個別兒茶素標準品，分別以 60，80 及 100℃加熱 1 小時，立即以冰水冷卻。

2. 兒茶素類在不同 pH 環境下安定性測定

(1) 不同 pH 緩衝液之製備

分別配製 1x 及 10 x 濃度的 pH 2、4、6、8、10、12 之緩衝液並經 121℃，20 分鐘滅菌後備用。其中 1x 的 pH 2 緩衝液為 0.2M HCl/KCl 緩衝液溶液；pH 4 及 pH 6 緩衝液為 0.1M citric acid/0.2M Na₂HPO₄ 溶液，pH 8 緩衝液為 0.1M Tris/HCl 溶液，pH 10 緩衝液為 0.2M Glycine/NaOH 溶液，pH 12 緩衝液為 0.2M KCl/NaOH 溶液。

(2) 同一濃度不同 pH 之粗兒茶素液製備

以純水配製 1%之粗兒茶素溶液 1L。取粗兒茶素液 90mL 分別加入 10x 的 pH 2、4、6、8、10、12 緩衝液及純水並使最後體積為 100mL。

(3) 不同 pH 環境下兒茶素安定性試驗

分別以 pH 2、4、6、8 等 1x 緩衝液配製 0.1%粗兒茶素溶液，以 0.2 μ m 濾膜過濾後在 25°C 下貯存一個月，探討其消長。

(4) 不同酒精濃度中兒茶素之安定性

分別以 0、15、35、55、75%之酒精溶液配製 0.1%之粗兒茶素，以 0.2 μ m 濾膜過濾後，於 25°C 下貯存一個月，觀察其消長。

(5) EGCG 於穩定之 pH 溶液中，在不同溫度下之安定性

以前述試驗所得兒茶素最穩定之 pH 下配製適當之 EGCG 溶液，分別貯存於 5、25、45、65、85°C 下存放一週，觀察 EGCG 之消長。

3. 個別兒茶素之定量分析

參考（區少梅等，1988）之研究報告，加以修正之。

分析條件

Column: Merck 100 RP-18column(250mm×4mm)

Eluent A: 0.1% H_3PO_4 含 0.1% CH_3CN 及%N-N-Dimethyl-formamide.

Eluent B: CH_3CN

Gradient Program:

Min.	%	
	Eluent A	Eluent B
0	99.0	1.0
5.0	90.0	10.0
12.0	85.0	15.0
20.0	80.0	20.0

Flow rate: 1mL/min

Detector: Thermo UV6000LP

Wave length: 280nm

Injection volume: 10 μ L

結果與討論

一、不同濾膜材質對兒茶素分析之影響

兒茶素在進行 HPLC 定量分析前為保護分離管，所有樣品需用膜孔為 0.45 μ m 的圓形濾膜過濾，以除去大顆粒分子。該膜的材質對兒茶素是否具有吸附作用，可能會造成分析結果誤差，甚至失去定量上的意義。

根據前人報告(Goto *et al.*, 1996)兒茶素分別經 PTFE、PVDF 及 Regenerated cellulose 三種材質濾膜過濾後，發現 PVDF 材質對 ECG 及 EGCG 兩種酯型兒茶素的影響很大，其回收率分別為 21%及 43.5%，因此建議在兒茶素定量分析時應採用 PTFE 之濾膜為佳。

表二為市面上常見的七種過濾材質，測試其對兒茶素過濾後情形，其結果與前述報告並不符合。其中以 NC 濾膜回收率最佳，對八種個別兒茶素的吸著率最小（其中 GC、EGC、EC、EGCG、GCG 及 ECG 為茶葉中含量較多之兒茶素）。PVDF 及 PTFE 分別對 EGCG 及 ECG 的回收率>95%。PES 及 PS 對酯型兒茶素回收率較差，CA 對 GCG、ECG 及 CG 回收率< 90%；Nylon 是所有膜材質中對兒茶素有強烈吸附作用者，其回收率<70%，究其合成原料為 polyamide，由於該物質對兒茶素有專一性的

吸附作用，所以在定量上是極不適用的濾膜。在所有測試的膜材質中以 NC、PDF、PTFE 三種為分析兒茶素時可考慮採用的濾膜，因其對茶葉中主要個別兒茶素的回收率大都在 90%以上。

二、兒茶素標準品的表異構化作用

以 2mM 個別兒茶素的標準品在 40、60、80 及 100℃ 下加熱二小時，觀察兒茶素表異構化作用，發現在 80℃ 以下幾無表異構化作用發生，而 100℃ 時加熱 20 分鐘即有表異構物產生。表三為在 80℃ 經 2 小時加熱後，個別兒茶素表異構化之情形。兒茶素分子立體結構中為(-)epi-forms 者(即 *cis-forms*) 比(+)forms 者(即 2,3-*trans-forms*)具有較高之表異構物轉換比例。*trans-forms* 一般被認為較 *cis-forms* 穩定 (Komatsu *et al.*, 1993; Wang and Helliwell, 2000)。表異構化轉變前後之量合計無法達到 100%，因此認為伴隨有其他氧化或分解作用 (Seto *et al.*, 1997)，這些不明產物在表三中以其它 (others) 表示之。EGCG 經 80℃ 以上溫度加熱會轉變為 GCG 及其它產物，但逆向反應的發生率卻很少。此即表示 GCG 比 EGCG 穩定，但其化性有差別。表三中之 EGC 及 EC 的轉變中除了表異構物之外其它產物偏高，此可能為此二物質為茶黃質 (theaflavin) 的前驅物 (precursors) 有關 (Nakabayashi, 1991)。

三、溶液的酸鹼度對兒茶素類之影響

(一) pH 對兒茶素安定性的影響

兒茶素為一種抗氧化劑，本身很容易氧化分解，因此環境中的酸鹼、溫度及壓力均會造成其變化。表四為同一濃度的粗兒茶素在不同 pH 溶液中放置不同時間後，HPLC 所測出的濃度。由結果可知短時間內 (如 1~2 天)，在 pH 2、4、6 之兒茶素溶液中，個別兒茶素含量與對照組 (兒茶素溶於純水) 相比，並無太大變化；當溶液之 pH 提高為 8 時，EGCG 含量比對照組幾乎少了 80%以上，推測在鹼性溶液中兒茶素發生氧化分解所致。因此在定量兒茶素樣品，溶液 pH 需維持在中性及微酸性環境中才適合。

(二) 粗兒茶素在中酸性溶液中存放的安定性

將粗兒茶素類分別貯存在 pH 2、3、4、5、6、7 等緩衝液中一個月 (25℃)，由前述試驗已知在短時間內沒有變化，但貯存至一週後 pH 7 的溶液外觀顏色逐漸加深；內容物分析亦有明顯變化。表五以茶中含量最多的兩種兒茶素 EGCG 及 EGC 為代表，在中、酸性緩衝液中貯存的消長情形。結果顯示 EGCG 在 pH 2 或 pH 6 兩種溶液中時，經七天後其含量都有逐漸遞減趨勢。但 pH 6 比 pH 2 減少更為顯著；在 pH 4 溶液之變化最少，表示最為穩定。EGC 在 pH 2 及 pH 4 溶液中都很安定，但在 pH 6 溶液中與前述 EGCG 結果類似。其他兒茶素 (GC、EC、C 及 ECG) 亦有類似的變化趨勢 (數據未列出)，由此可證明兒茶素在 pH 3 或 pH 4 溶液中最能保持安定。

(三) 兒茶素在不同濃度之酒精溶液中的安定性

EGCG 及 ECG 在水及不同濃度酒精溶液中的消長由表六結果可知，不管在水中或酒精溶液中，兒茶素均會逐漸減少，但在酒精溶液中兒茶素似乎比在純水中稍為安定；尤其前 14 天酒精溶液中之兒茶素並沒有明顯變化，但從 14~28 天之間兒茶素減少卻很顯著，由此可知酒精並非可用來作穩定兒茶素的溶劑。

四、EGCG 在最適 pH 水溶液中，溫度對其安定性的影響：

用 pH 4 緩衝液配製適當濃度之 EGCG 標準品，分別在 25、45、65 及 85℃ 下存放一週。由表七可知即使在 65 及 85℃ 下貯存兩天，只產生微量的 GCG，且無其他產物生成，至第四天起可測出 7ppm 的 GCG 出現，由此更可證明酸性 pH 對兒茶素表異構化有安定的作用。

結 論

兒茶素的應用日益增加，因此如何保存此類具有生理活性的物質是一重要課題。本研究的結果，可以總結下列數點結論，供各界參考：

1. 在進行兒茶素分析或加工時所採用的濾膜須避免使用 polyamide 或 Nylon 材質，以免兒茶素被膜吸附而低估分析值。
2. 兒茶素在水溶液中加熱至 80℃ 以上易發生表異構化作用。其立體結構中組態為 2R, 3R 者較 2S, 3R 易發生異構化轉變，所以兒茶素應在低溫下進行保存。
3. pH 3 或 4 之兒茶素溶液在室溫下貯存一個月，其 EGCG 或 ECG 的消失率 < 5%，可知兒茶素應儘可能在 pH 3~4 之酸性環境中保存。

誌 謝

本研究試驗期間獲茶業改良場蔡憲宗先生協助統計工作，特此誌謝。

參考文獻

1. 阮逸明. 1995. 茶葉的保健功效. 茶業技術推廣手冊 (製茶篇). P 109. 台灣省茶業改良場。
2. 區少梅、蔡永生及張如華. 1988. 包種茶酚類化合物分析方法之比較與評估. 台灣茶業研究彙報, 7: 43-61。
3. 蔡永生、劉世綸、王雪芳及區少梅. 2004. 台灣主要茶樹栽培品種兒茶素含量與抗氧化活性之比較. 台灣茶業研究彙報, 23: 115-131。
4. Bajaj, K. L., Anan, T., Tsushida, T., and Ikegaya, K. 1987. Effect of (-)-epicatechin on oxidation of theaflavins by polyphenol oxidase from tea leaves. Agric. Biol. Chem. 51: 1767-1772.
5. Coggon, P., Moss, G. A., Graham, H. N., and Sanderson, G. W. 1973. The biochemistry of the tea fermentation: oxidative degallation and epimerization of the tea flavanol gallates. J. Agric. Food Chem. 21: 727-733.
6. Davis, A. L., Cai, Y., and Davis, A.P. 1995. H-1 and C-13 NMR assignment of theaflavin, theaflavin monogallate and theaflavin digallate. Magnetic Resonance in Chemistry. 33: 549-552.
7. Dreosti, I. E., Wargovich, M. J., and Yang, C. S. 1997. Effect of water quality, pH and metal ions on the color and polyphenol content of oolong tea infusion. Food Sci. 24: 331-347.
8. Goto, T., Yoshida, Y., Kiso, M. and Nagashima, H. 1996. Simultaneous analysis of individual catechins and caffeine in green tea. J. Chromatogr. A. 749: 95-299.
9. Jankun, J., Selman, S.H., Swiercz, R., and Skrzypczak-Jankun, E. 1997. Why drinking green tea could prevent cancer. Nature 387: 561.
10. Kiatargjai, P., Wellons, J. D., Gollob, L., and White, J. D. 1982. Kinetics of epimerization of (-)-catechin and its rearrangement to catechinic acid. J. Org. Chem. 47: 2910-2912.
11. Komatsu, Y., Suematsu, S., Hisanobu, Y., Saigo, H., Matsuda, R., and Hara, K. 1993. Effect of pH and temperature on reaction kinetics of catechins in green tea infusion. Biosci. Biotech. Biochem. 57: 907-910.
12. Wang, H. and Helliwell, K. 2000. Epimerization of catechins in green tea infusions. Food Chem. 70: 337-344.
13. Yang, C. S. 1997. Inhibition of carcinogenesis by tea. Nature 389: 134-135.

The Stability of the Solution of Catechins

Ying-Ling Chen¹ Shu-Yen Lin²

Summary

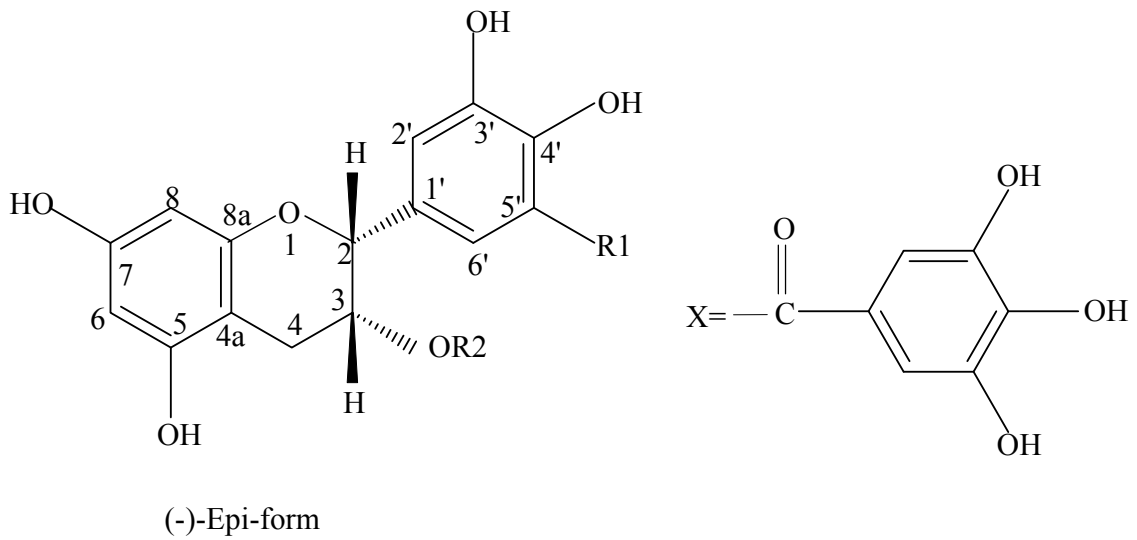
Tea catechins undergo many chemical reactions in pure water such as spontaneous oxidation and epimerization. The predominant change appears to be epimerization from the epistructure to the nonepistructure. Catechins with 2R, 3R configuration (*cis-form*) are easier to achieve epimerization than that of 2R, 3S (*trans-form*). It was shown that the configuration of 2R, 3S is more stable in nature. Among eight individual catechins, the contents of EGCG and EGC were above 70% of total catechins. Tea catechins which almost to be *cis-forms* are difficult to be stored in pure water because of their frequent epimerization.

Crude catechins in pH 4 buffer of which EGCG and EGC decrease under about 5% have been stored at 25°C for 30 days. EGCG also had not been found its epimer-GCG in pH 4 buffer at 85°C for one or two days. Catechins in alcoholic solution are more stable than that of in pure water. It was found that catechins had decreased significantly to be stored from the fourteenth to twenty-eighth days.

Key words: Catechin solutions, Epimers, Stability

1. Associate Agronomist, Tea Research and Extension Station, Taoyuan, Taiwan, R.O.C.

2. Corresponding author, Research Assistant, Department of Horticulture, National Taiwan University, Taipei, R.O.C.



(-)-Epicatechin: $R1=R2=H$

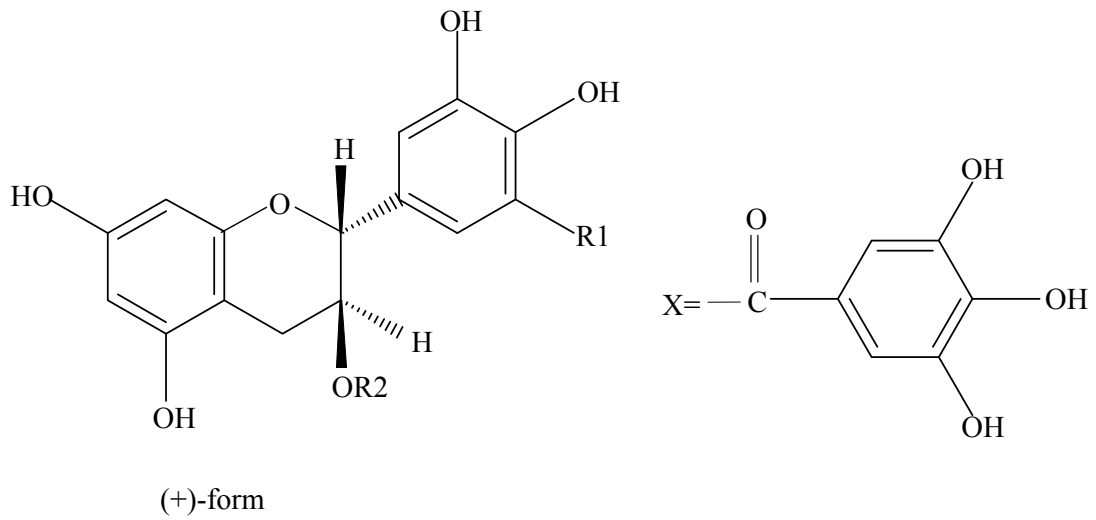
(-)-Epigallocatechin: $R1=OH, R2=H$

(-)-Epicatechin gallate: $R1=H, R2=X$

(-)-Epigallocatechin gallate: $R1=OH, R2=X$

圖一、茶葉兒茶素類及其表異構物化學結構

Fig. 1. Chemical structures of tea catechins and their epimers



(+)-Catechin: R₁=R₂=H

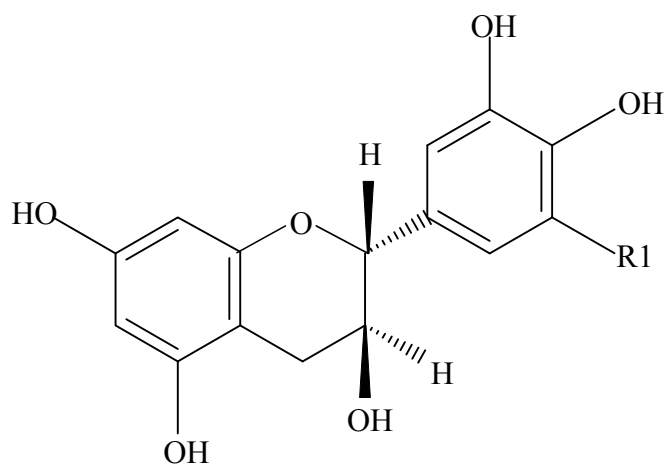
(+)-Gallocatechin: R₁=OH, R₂=H

(+)-Catechin gallate: R₁=H, R₂=X

(+)-Gallocatechin gallate: R₁=OH, R₂=X

(續圖一)

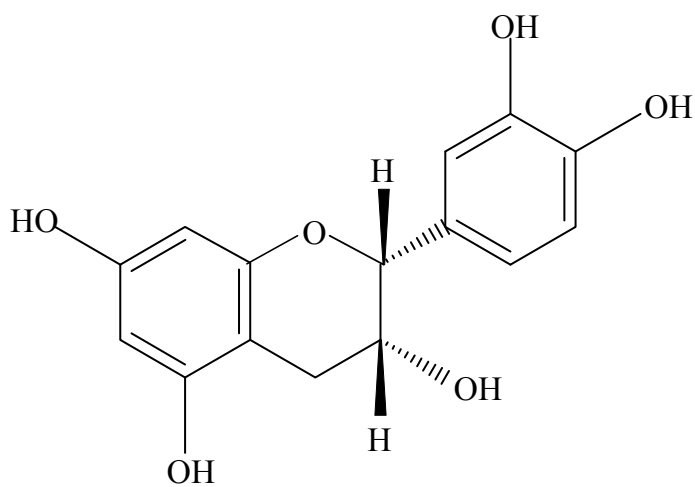
Fig. 1. (continued)



(+)-form

(+)-Catechin: R1=H

(+)-Gallocatechin: R1= OH



(-)-form

(-)-Epicatechin

(續圖一)

Fig. 1. (continued)

表一、樣品中兒茶素類之組成

Table 1. Composition of the catechin sample

Chemical component	Contents (% dry wt.)
Gallic acid	0.69
GC	2.40
EGC	6.42
C	1.30
EC	5.06
EGCG	52.46
GCG	6.90
ECG	12.68
CG	0.87
TC	88.09
Caffeine	0.42

TC=Total catechins=GC+EGC+C+EC+EGCG+GCG+ECG+CG

表二、茶葉中主要兒茶素經過濾處理後之回收率

Table 2. Recovery of major tea catechins after filtration (%)^a

Membrane material ^b	GC	EGC	C	EC	EGCG	GCG	ECG	CG
PVDF	96.8	98.3	97.9	100	97.9	96.0	95.5	85.9
PTFE	97.8	99.2	99.0	100	96.8	95.2	94.1	92.9
PES	94.1	96.4	94.7	97.6	78.2	69.8	64.2	54.3
PS	94.7	94.5	92.5	95.7	98.3	78.7	79.7	63.2
CA	95.0	95.0	94.3	96.3	93.3	85.1	89.6	77.2
NL	67.5	69.3	63.0	67.8	60.2	52.8	50.4	39.1
NC	100.5	100	100.6	101	100.7	98.9	100.5	99.8

^a Data have been corrected according to the certification of chemicals & reagents from Sigma.^b PVDF : polyvinylidene fluoride

PTFE : polytetrafluoroethylene with a hydrophilic coating

PES : polyethersulfone

PS : polysulfone

CA : cellulose acetate

NL : nylon

NC : nitrocellulose

表三、個別兒茶素於 80°C 下加熱 2 小時之轉變程度

Table 3. Degree of conversion for individual catechin standards at 80°C about 2 hrs

Starting compound	Configuration	Epimer	Converted(%)	Unconverted(%)	Others(%)
(-)-EGCG	2R,3R	(+)-GCG	29.2	67.8	3.00
(-)-EGC	2R,3R	(+)-GC	15.9	62.7	21.4
(-)-ECG	2R,3R	(+)-CG	22.4	70.8	6.80
(-)-EC	2R,3R	(+)-C	12.5	55.7	31.8
(+)-GCG	2R,3S	(-)-EGCG	8.60	85.4	6.0
(+)-GC	2R,3S	(-)-EGC	5.60	82.4	11.0
(+)-C	2R,3S	(-)-EC	2.50	90.0	7.50

表四、pH 值兒茶素樣品對分析結果的影響

Table 4. Effect of pH on the analysis results of the catechin sample

pH	Contents (% Dry wt.)						
	GC	EGC	C	EC	EGCG	GCG	ECG
Check(water pH 5.8)	2.37	6.63	1.34	5.44	52.5	9.24	0.126
2	2.47	6.57	1.12	1.65	52.9	9.03	0.196
4	2.45	6.35	1.31	5.48	52.7	9.10	0.181
6	2.24	6.63	1.35	5.68	51.0	8.93	0.129
8	2.77	4.98	2.23	8.97	10.4	7.00	0.839
10	2.55	4.11	1.19	1.43	8.21	4.44	0.714
12	2.55	1.24	0.213	0.546	1.02	2.02	0.896

表五、兒茶素在不同 pH 溶液中之安定性

Table 5. Stability of catechins in various pH solution stored at 25°C (mg/100mL)

Days	EGCG			EGC		
	pH2	pH4	pH6	pH2	pH4	pH6
0	121 ^a	112 ^a	104 ^a	20.1 ^a	20.2 ^{ab}	18.6 ^a
7	103 ^b	105 ^{ab}	59.1 ^b	19.3 ^a	19.0 ^b	11.6 ^b
14	96.8 ^d	103 ^{ab}	38.4 ^c	20.1 ^a	20.2 ^{ab}	9.01 ^c
21	99.9 ^e	102 ^b	28.6 ^d	21.2 ^a	19.1 ^b	8.83 ^e
28	95.5 ^{cd}	110 ^{ab}	10.4 ^e	21.8 ^a	21.6 ^a	8.42 ^c

註：表中同一行小英文字母不同者為多變域測定差異 5%顯著。

Note : Means within same column followed by different letter are significantly different at the 5% level using the Duncun's multiple range test.

表六、兒茶素在不同酒精濃度中之安定性

Table 6. Stability of catechins in various alcoholic concentration stored at 25°C (mg/100mL)

Days	EGCG					EGC				
	0	15%Alc.	35%Alc.	55%Alc.	75%Alc.	0	15%Alc.	35%Alc.	55%Alc.	75%Alc.
0	96.3 ^a	102 ^a	103 ^a	113 ^a	120 ^a	20.9 ^a	20.7 ^a	20.8 ^a	23.9 ^a	22.8 ^a
14	90.5 ^b	98.4 ^a	101 ^a	110 ^a	119 ^a	20.7 ^a	19.7 ^a	18.3 ^a	20.4 ^a	20.6 ^a
28	79.2 ^c	86.7 ^b	87.4 ^b	94.6 ^b	98.0 ^b	17.5 ^b	15.9 ^b	13.6 ^b	14.9 ^c	16.6 ^b

註：表中同一行小英文字母不同者為多變域測定差異 5%顯著。

Note : Means within same column followed by different letter are significantly different at the 5% level using the Duncun's multiple range test.

表七、溫度對 EGCG (pH 4) 穩定性的影響
Table 7. Effect of temperature on the stability of EGCG in pH 4 solution (ppm)

Temperature (°C)	Days							
	0		2		4		6	
	EGCG	GCG	EGCG	GCG	EGCG	GCG	EGCG	GCG
25	250	—	252	—	254	—	256	—
45	254	—	254	—	250	—	252	—
65	249	—	253	—	244	3.0	239	5.7
85	252	—	255	0.5	239	7.2	228	11.6