

生藥陳皮의 心血管系에 대한 藥理作用*

延世大學校 醫科大學 藥理學教室

李 炳 學 · 趙 台 淳 · 李 宇 柱

=Abstract=

Pharmacological Actions of Extracts of *Citrus unshiu Pericarpium* on Cardiovascular System

Byung Hak Lee, Tai Soon Cho and Woo Choo Lee

Department of Pharmacology, Yonsei University College of Medicine
Seoul, Korea

Citrus unshiu Marc., a family of Rutaceae, has been used as antitussives, antiemetics, expectorants, spasmolytics, stomachics and digestants in oriental medicine. But there is few reports on the pharmacological effects of *Citrus unshiu pericarpium*. Present experiment was performed to observe the effects of the water extract of *Citrus unshiu* on isolated auricle and intestine in rabbits and blood pressure in rats and also to study on the active component on the cardiovascular system by means of thin layer chromatography and spectrophotometer.

1. The water extract showed positive inotropic and positive chronotropic effect in the concentration of 1×10^{-4} g/ml, 5×10^{-4} g/ml, and 1×10^{-3} g/ml.
2. The motility of isolated rabbit intestine was significantly depressed by the water extract.
3. The blood pressure was markedly increased by the water extract.
4. The blood vessel of rabbit ear was constricted by perfusion of the ether extract.
5. The purified alkaloid of *Citri pericarpium* by ion exchange resin showed the same Rf value with *l*-synephrine on thin layer chromatography.
6. The purified alkaloid of *Citri pericarpium* by thin layer chromatography showed the same absorption curve with *l*-synephrine in the ultraviolet scanning.

緒 論

陳皮는 薔香科(Rutaceae¹⁾)에 속하는 귤(*Citrus unshiu* Marc.)의 껍질을 1年以上 말린 것이며 漢方²⁾에서는 芳香性健胃劑, 鎮咳, 鎮痙, 去痰, 消化不良, 食慾不振 등에 많이 使用하고 있다.

지금까지 알려진 陳皮의 成分은 精油로서 limonen과 flavonoid 配糖體로서 hesperidin³⁾등이 報告되어

* 본 論文은 第25回 大韓藥理學會(1973. 11. 2)에서 發表하였음. 본 연구는 延世醫大 柳韓研究費 YH73-14로 이루어졌음.

있고 alkaloid 로서는 Jahns(1896)⁴⁾에 의하여 同屬植物인 *Citrus vulgaris*에서 stachydrin 이 分離되었고 또한 Stewart(1964)^{5,6)}등에 의해 Citrus속인 Tangerine 잎, Grape fruit 잎에서 *l*-synephrine 이 分離되었으며 Meyer lemon(*Citrus* sp.)의 잎과 즙에서 *l*-octopamine 이 分離되었고 T.A. Wheaton(1965)⁷⁾등에 의해서 Grape fruit(*Citrus paradisi*)잎에서 feruloylputrescine 이 分離되었다. 그러나 陳皮에서 alkaloid를 分離한 報告는 없었다. 또한 陳皮에 대한 藥理學的 作用이 아직 報告되어 있지 않아 陳皮水浸液이 家兔 및 쥐의 心血管系에 미치는 藥理作用과 그 作用을 일으키는 成分을 究明하고자 本實驗을 試圖하여 興味있는 知見을 얻었

기에 報告하는 바이다.

著者は 漢方에서 使用하고 있는 陳皮를 물로 抽出하여 Meyer 試藥과 silicotungstic acid 로 alkaloid 反應을 보니 모두 陽性을 나타내었다. 또한 陳皮水浸液으로 家兔의 剔出心房과 腸管에 대한 作用과 쥐의 血壓에 대한 作用을 標品 l-synephrine 과 比較하였고 陳皮水浸液을 alkali 性에서 ether 로 移行시킨 alkaloid 로 推定되는 物質을 가지고 家兔耳血管灌流實驗을 實施하였다. 한편 化學的 方法으로 作用成分을 推定하기 爲하여 陳皮水浸液을 다시 ion exchange resin 을 通過시켜 精製하고 標品 l-synephrine 과 함께 thin layer chromatography 로 展開시켜 比較하였으며 紫外線部에서 標品 l-synephrine 과 吸收曲線을 比較하였다.

實驗材料 및 方法

1. 實驗材料

市販 陳皮 1kg 을 蒸溜水로 2回 溫浸한 다음 冷時에 濾過하고 濾液을 水浴上에서 蒸發濃縮하여 200g 의 黑褐色 濃縮物을 얻었다. 이 濃縮物을 實驗 1)~3)에 使用하였다.

다음 alkaloid 抽出法⁸⁾에 의해 濃縮物을 蒸溜水 500 ml 로 稀釋하고 황산용액을 가하여 pH 3으로 맞춘 다음 10 ml 의 ether 로 5回 반복振盪하여 分離한 水溶液層을 탄산소다를 가하여 pH 9로 조절한 다음 ether 로 반복 9回 振盪하였다. 이 ether 層을 pH 3의 묽은 황산으로 振盪하여 alkaloid 로 推定되는 水溶液 5 ml 을 얻었다. 이것을 實驗 4)에 使用하였다.

Ion exchange resin 法⁹⁾에 의해 Dowex 50-X4 ion exchange resin (200~400 mesh, Baker analyzed reagent)에 1N-NaOH 용액을 通過시키고 물로 씻은 다음 4% HCl 용액을 通過시키고 물로 씻었다. 다시 1N-NaOH 용액을 通過시킨 후 물로 씻은 溶出液이 pH 8~9가 되도록 하고, 陳皮濃縮物 10g 을 50 ml 의 물에 稀釋하여 암모니아수를 가하여 pH 8.5로 맞춘 液을 通過시키고 methanol 과 물로 씻고 난뒤 2N-암모니아수 용액으로 alkaloid 를 溶出시켜 實驗 5), 6)에 使用하였다.

2. 實驗方法

實驗 1) 家兔剔出心房에 대한 作用

體重 2kg 內外의 家兔心房을 剔出하여 muscle chamber 에 懸垂시켜 心房的 規則運動을 polygraph (grass model 7)에 描記하였다. 使用한 營養液은 tyrode 液이

며 38°C 를 維持하면서 O₂ (95%)와 CO₂ (5%)의 混合 gas 를 繼續 通해 주었다.

實驗 2) 家兔剔出腸管에 대한 作用

體重 2kg 內外의 家兔腸管을 剔出하여 muscle chamber 에 懸垂시켜 그 自動運動을 實驗 1)과 같은 方法으로 描記하였다.

實驗 3) 흰쥐 血壓에 대한 作用

250g 內外의 숫쥐를 20% urethane 용액(1.5 g/kg)을 皮下注射하여 麻醉시킨후 頸部の 鬚를 깎아내어 正中線으로 2~3 cm 切開하여 頸動脈과 頸靜脈을 各各 分離하여 水銀 manometer 에 連結된 polyethylene tube 를 頸動脈에 挿入하고 血壓의 變動을 kymograph 에 描記하였다. 이때 heparin 溶液(生理 食鹽水 100 ml 中 heparin 20,000 unit)을 polyethylene tube 에 注入하여 血液凝固을 防止하였다.

藥物은 頸靜脈에 挿入한 polyethylene tube 를 通해 注入하였다.

實驗 4) 家兔耳血管灌流實驗

Krawkow-Pissemski 法에 의하여 家兔의 耳低部를 切斷한 후 耳殼動脈을 結合組織에서 分離하고 室溫의 Ringer 液이 담긴 Marriot 병과 polyethylene tube 를 連結하여 tube 先端의 氣泡을 제거한 후 耳殼動脈에 挿入하였다. Marriot 병의 灌流壓이 30~40 cm H₂O가 되도록 높이를 調節하고, 灌流滴數가 1분에 30~35滴이 되도록 調節하였다. 藥物의 注入量은 0.1 ml 로 하고 注入 壓力이 血管에 미치지 않도록 하기 위해 Marriot 병의 逆方向으로 注入하였다.

實驗 5) Thin layer chromatography 에 의한 陳皮의 Rf 值 測定

ion exchange resin 을 通過한 溶液을 標品 l-synephrine 과 2 cm 間隔으로 點滴하여 室溫에서 말린 후 展開溶媒의 先端이 10 cm(3時間)가 될때까지 展開시킨후 27°C에서 말린 다음 ninhydrin 溶液으로 噴霧하여 80°C에서 1時間동안 放置시켰다. 이때 使用한 溶媒는 0.5N-HCl 포화 n-butanol¹⁰⁾을 使用하였고 thin layer chromatography paper 는 chromatogram sheet 6060 (made by division of Eastman Kodack Co.) 14×4 cm 를 使用하였으며 發色劑는 0.2% acetone ninhydrin 溶液을 使用하였다.

實驗 6) 紫外線部 吸光度 測定

Dowex 50-X4 ion exchange resin 에 通過시켜 얻은 陳皮精製液을 標品 l-synephrine 및 neosynephrine 과 함께 T.L.C.에 의해 展開시킨 후에 ninhydrin 溶液으로 標品만 發色시킨 후에 同一한 Rf 值에 해당되는

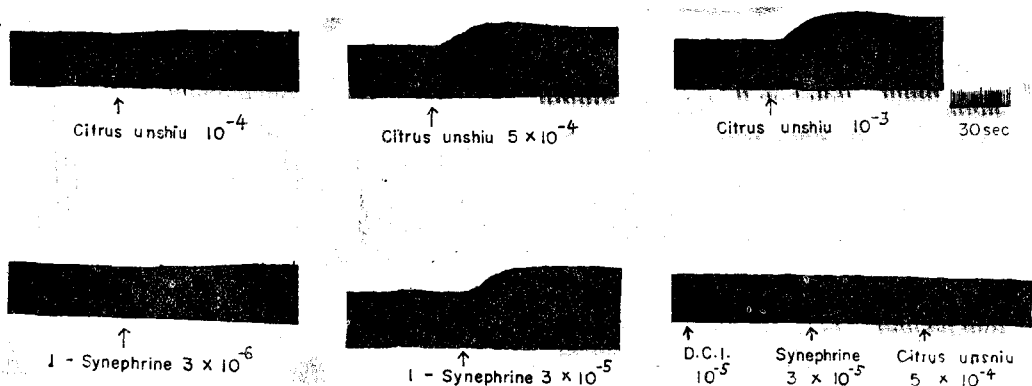


Fig. 1. Effect of *Citrus unshiu* and synephrine on motility of isolated rabbit auricle.

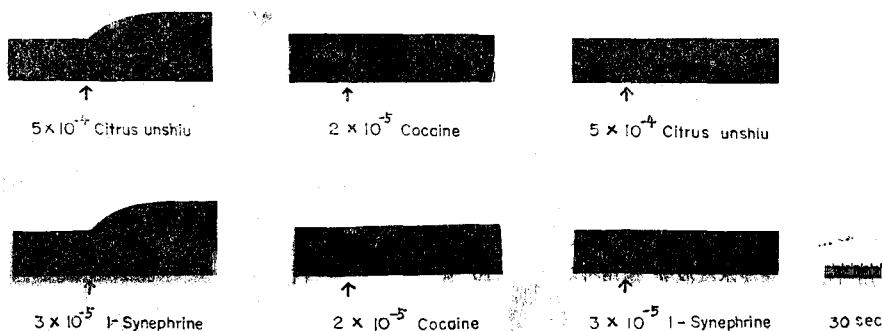


Fig. 2. Effect of *Citrus unshiu* and synephrine on motility of isolated rabbit auricle pretreated with cocaine.

陳皮展開部를 chromatogram에서 分離하고 50% ethanol 5 ml로 水浴上에서 2時間 抽出한 다음 spectrophotometer (Varian® 635D)로 吸收曲線을 測定하였다. 이때 標品으로 50% ethanol에 溶解한 synephrine(10^{-5} g/ml) 및 neosynephrine (10^{-5} g/ml)을 使用하였으며 blank로는 50% ethanol을 使用하였다.

實驗成績

1. 家兔別出心房에 대한 作用

家兔別出心房이 規則運動을 하고 있을때 陳皮水浸液 10^{-4} g/ml 濃度에서 心房的 收縮高는 $15.2 \pm 5.35\%$ 가 增加되었으며, 陳皮水浸液 5×10^{-4} g/ml 濃度에서 心房的 收縮高는 $48.6 \pm 6.23\%$ 의 增加를 나타냈으며 搏動數는 $28.7 \pm 9.9\%$ 로 增加하였다. 陳皮水浸液 10^{-3} g/ml 濃度에서는 $58.6 \pm 5.25\%$ 로 收縮高가 增加되었으며 搏動數는 $30.3 \pm 8.5\%$ 가 增加하였다(Fig. 1).

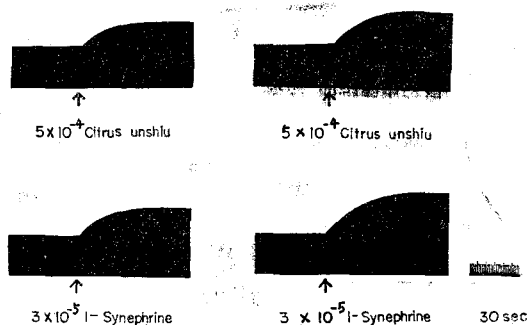


Fig. 3. Effect of *Citrus unshiu* and synephrine on motility of isolated rabbit auricle pretreated with reserpine.

다음에 synephrine은 3×10^{-6} g/ml 濃度에서 $11.5 \pm 3.45\%$ 로 收縮高가 增加되었으며, 3×10^{-5} g/ml 濃度에서 $50.3 \pm 4.21\%$ 의 收縮高와 $29.2 \pm 10.1\%$ 의 搏動數增加를 나타내었다(Fig. 1).

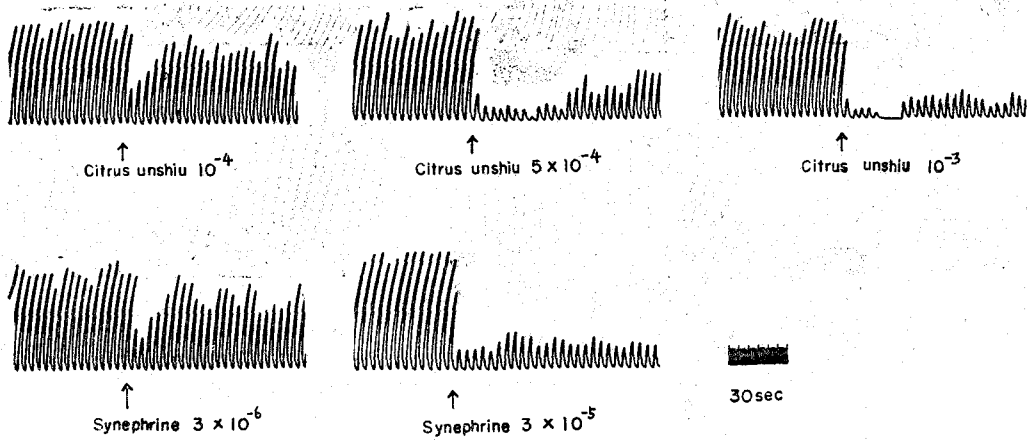


Fig. 4. Effect of *Citrus unshiu* and synephrine on motility of isolated rabbit intestine strip.

D.C.I. (dichloroisoproterenol) $10^{-5}M$ 을 適用시킨후 陳皮水浸液 $5 \times 10^{-4}g/ml$ 와 synephrine $3 \times 10^{-5}g/ml$ 에 의한 心運動興奮作用은 모두 封鎖되었다(Fig. 1).

Bretylium $5 \times 10^{-4}M$ 이나 cocaine $2 \times 10^{-5}M$ 을 剔出心房에 適用시킨후 陳皮水浸液을 適用시킨바 $5 \times 10^{-4}g/ml$ 에 의한 心運動興奮作用이 封鎖되었다. 이와 마찬가지로 synephrine을 適用했을 때도 $3 \times 10^{-5}g/ml$ 에 의한 心運動興奮作用이 封鎖되었다(Fig. 2).

Reserpine 3mg/kg을 實驗 24時間前에 腹腔內에 注射한 家兔剔出心房에 대해서는 陳皮水浸液과 synephrine에 의한 心運動興奮作用이 正常心房보다 增加된 狀이 있었다(Fig. 3).

2. 家兔剔出腸管에 대한 作用

家兔剔出腸管의 運動이 일정해진 다음 陳皮水浸液을 適用시키면 $10^{-4}g/ml$ 濃度에서 自動運動은 약간 弛緩作用을 나타내고 $5 \times 10^{-4}g/ml$ 濃度에서 현저한 弛緩作用을 나타냈다. $10^{-3}g/ml$ 濃度에서는 急激한 弛緩作用을 나타냈다(Fig. 4).

한편 synephrine도 $10^{-4}g/ml$, $5 \times 10^{-4}g/ml$, $10^{-3}g/ml$ 濃度에서 各各 腸管의 自動運動이 濃度에 비례하여 弛緩되었다(Fig. 4).

3. 원쥐의 血壓에 대한 作用

원쥐 頸靜脈에 陳皮水浸液 5mg/100g을 注入했을때 正常血壓 $102 \pm 9.3 mmHg$ 에서 $138.4 \pm 6.7 mmHg$ 로 血壓이 上昇하였으며 10mg/100g을 注入했을 때는 $154.9 \pm 9.5 mmHg$ 으로 血壓上昇作用을 나타냈다.

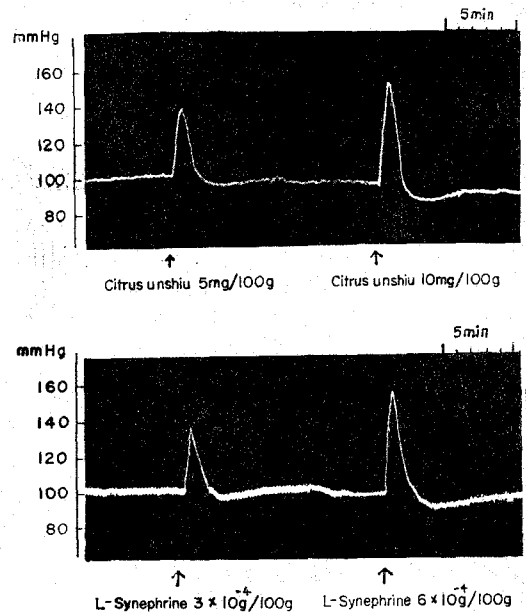


Fig. 5. Effect of *Citrus unshiu* and synephrine on the blood pressure of rat.

한편 synephrine도 $3 \times 10^{-4}g/100g$, $6 \times 10^{-4}g/100g$ 을 注入했을때 各各 $139.6 \pm 8.5 mmHg$ 와 $158.8 \pm 10.1 mmHg$ 로 血壓上昇作用을 나타냈다(Fig. 5).

이들 血壓上昇作用은 phentolamine $10^{-3}g/100g$ 前處置에 의하여 封鎖되었다.

4. 家兔耳血管灌流實驗

家兔耳殼靜脈에 陳皮 ether浸出液($10^{-1}g/ml$) 0.1ml를 注入했을때 血管은 약간 收縮하여 注入前 32.3 ± 1.5

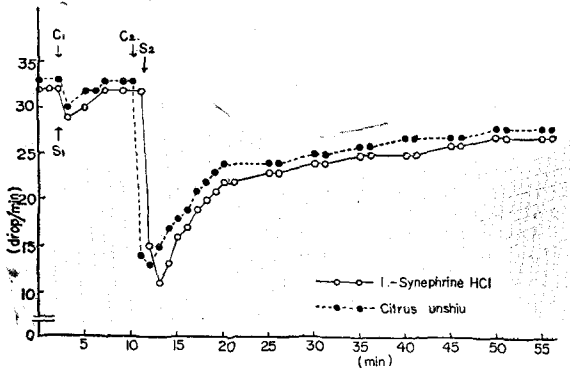
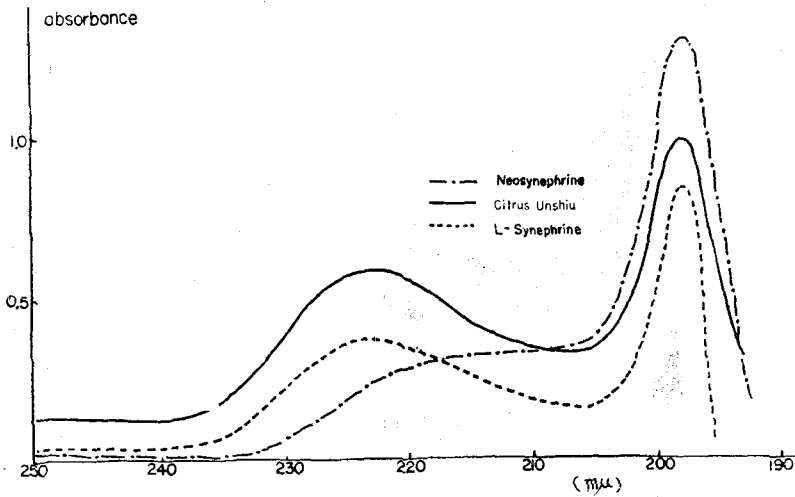


Fig. 6. Rabbit ear perfusion (Krawkow-Pissemski method) of *Citrus unshiu* and synephrine.
 C₁: Ether extract of *Citrus unshiu* 10⁻¹g/ml
 C₂: Ether extract of *Citrus unshiu* 1g/ml
 S₁: Synephrine 3×10⁻⁴g/ml
 S₂: Synephrine 3×10⁻³g/ml
 (Each solutin: 0.1 ml injection)



Fig. 7. The spots detected from sample and standard by T.L.C.
 C: *Citrus unshiu*, S: Synephrine



Absorption curves of *Citrus unshiu*, Synephrine and Neosynephrine in the U.V. range.

Fig. 8. Absorption curves of *Citrus unshiu*, synephrine and neosynephrine in the U.V. range.

drops/min에서 29.1±1.3 drops/min으로 低下되었으며 10배 濃度(1g/ml)의 용액·0.1 ml을 注入했을때 血管은 急激히 收縮하여 방울수는 13.4±2.7 drops/min으로 低下되었다(Fig. 6).

한편 synephrine은 3×10⁻⁴g/ml중에 0.1 ml을 注入했을때 28.8±1.5 drops/min으로 低下되었으며 10배 濃度の 3×10⁻³g/ml중에 0.1 ml를 注入했을때 11.5±3.8 drops/min으로 低下되었다(Fig. 6).

5. Thin layer chromatography에 의한 陳皮의 Rf 值 測定

T.L.C.에 의하여 陳皮精製液과 標品 *l*-synephrine을 展開하여 0.30±0.02의 同一한 Rf 值를 얻었다(Fig. 7).

6. 紫外線部 吸光度 測定

紫外線部에서 標品 *l*-synephrine 과 neosynephrine을

chromatogram에서 分離한 陳皮精製品과 吸收曲線을 比較한바 陳皮는 198 m μ 에서 peak를 나타냈고 synephrine은 197.6 m μ 에서 neosynephrine은 198 m μ 에서 peak를 나타냈으나 side peak가 neosynephrine만 이 달랐다(Fig. 8).

考 察

陳皮는 漢方에서 많이 쓰이는 生藥이지만 아직 成分 및 藥理作用이 究明되지 않은채 使用되고 있었다. 金(1970)¹¹⁾등은 Meyer 試藥과 silicotungstic acid로 버섯의 alkaloid 成分은 究明한바 있었는데 陳皮도 이 두 試藥에 의해 陽性反應을 나타내었다. Alkaloid는 生體에 대하여 特有한 藥理作用을 나타내므로 우선 心血管系 및 腸管에 대한 藥理實驗을 實施하였다.

剔出家兔心房은 各種濃度の 陳皮水浸液을 適用했을 때 비례적으로 收縮高와 搏動數가 增加되었다. Moran 및 Perkins(1961)¹²⁾, Nickerson 및 Chan(1963)¹³⁾등은 心臟에서 D.C.I.가 交感神經 刺戟으로 인한 心運動 促進作用과 epinephrine 및 norepinephrine의 強心作用을 特有하게 封鎖함을 證明하였고 Lee 및 Shideman(1959)¹⁴⁾은 D.C.I.는 adrenergic mechanism에 關聯된 제반문제를 研究하는데 使用할 수 있는 藥物임을 證明한바 있었는데 家兔剔出家兔心房에 D.C.I.을 適用시킨 후 陳皮水浸液을 適用시키면 心運動興奮作用이 完全히 封鎖되는 것으로 보아 陳皮水浸液에는 交感神經 興奮性 amine이 含有되었음을 알 수 있었다.

Fleckenstein 및 Stackle(1955)¹⁵⁾등은 交感神經 興奮性 amine을 catecholamine 誘導體, phenylethanolamine 誘導體 및 phenylethylamine 誘導體의 세 種類로 區分할 수 있다고 報告하였고 Lee 및 Yoo(1954)¹⁶⁾는 各種 交感神經 興奮性 amine類中에서 Monohydroxyphenylethylamine과 Nonhydroxyethylamine 誘導體만이 bretylium이나 cocaine에 의해 心運動 興奮作用이 封鎖되었으며 reserpine에 의해서 두 誘導體가 모두 그 作用이 封鎖되었지만 synephrine과 neosynephrine만이 封鎖되지 않은 것을 報告하였는데 本實驗에서 家兔剔出家兔心房의 運動이 bretylium이나 cocaine을 前處置한후에 陳皮水浸液에 의한 心運動 興奮作用이 封鎖되었으며 reserpine을 前處置한 家兔剔出家兔心房에서는 陳皮水浸液에 의하여 心房運動이 reserpine을 前處置하지 않은 心房보다 增強되는 supersensitivity를 나타내었다.

以上的 實驗으로 陳皮水浸液에 含有된 交感神經 興

奮性 amine은 synephrine이나 neosynephrine임을 豫知할 수 있었다.

家兔剔出家兔腸管에 各種濃度の 陳皮水浸液을 適用했을 때 비례적으로 剔出家兔腸管의 自動運動이 抑制되었는데 이 結果는 漢方에서 陳皮를 芳香性 健胃劑, 消化不良等に 使用하고 있으나 多量으로 使用할때 胃腸運動의 抑制作用을 考慮해야 할 것으로 생각된다.

원쥐에 各種濃度の 陳皮水浸液을 注入한 結果濃도에 비례하여 血壓上昇을 나타내었으며 phentolamine의 前處置에 의해 陳皮水浸液의 血壓上昇은 完全히 封鎖되었다.

家兔耳血管灌流實驗에서 陳皮水浸液을 適用했을 때 血管收縮作用을 나타냈으나 水浸液 自體의 粘度 때문에 正確한 實驗이 되지 않아 alkaloid 抽出法에 의해 순수히 抽出한 陳皮 ether 浸出液을 耳殼靜脈에 注入했을 때 濃도에 비례하여 血管은 收縮되었다.

以上的 원쥐 血壓 및 家兔耳血管灌流實驗에서도 陳皮는 血管에 대하여 adrenergic effect가 있다는 것이 確認되었다.

以上的 藥理實驗으로 心血管系에 대하여 adrenergic effect를 일으키는 陳皮의 成分이 l-synephrine이나 neosynephrine임을 推測하고 그 作用成分을 化學的方法으로 究明하기 위해 thin layer chromatography와 spectrophotometer를 利用하여 標品 l-synephrine과 比較하였던바 兩者의 Rf 値가 同一하였고, 紫外線 吸收曲線은 l-synephrine과는 一致하였지만 neosynephrine과는 吸收曲線이 一致하지 않아 l-synephrine임을 推定하였다.

結 論

陳皮水浸液이 家兔 및 원쥐의 心血管系 및 腸管에 미치는 藥理作用을 檢討하고 그 作用成分을 推定한 結果 다음과 같은 結果를 얻었다.

1. 家兔剔出家兔心房에 대하여 陳皮水浸液은 10⁻⁴g/ml, 5×10⁻⁴g/ml 및 10⁻³g/ml 濃度에서 心運動 興奮作用을 나타냈으며 이 作用은 D.C.I., bretylium, cocaine에 의해 封鎖되었으며 reserpine에 의해 增強되었다.
2. 家兔剔出家兔腸管에 대하여 陳皮水浸液은 10⁻⁴g/ml, 5×10⁻⁴g/ml 및 10⁻³g/ml에서 濃도에 비례하여 腸管의 自動運動이 抑制되었다.
3. 원쥐 血壓에 대하여 陳皮水浸液 50 mg/100 g, 100 mg/100 g을 각각 靜脈注射하면 血壓上昇作用이 藥物의 濃도에 비례하여 나타났으며 이 作用은 phentola-

mine에 의해 封鎖되었다.

4. 家兎血管灌流實驗에서 陳皮 ether 浸出液은 10^{-1} g/ml, 1g/ml 용액 0.1 ml을 注入했을때 血管收縮作用이 나타났다.

5. Ion exchange resin을 通過시킨 陳皮精製液과 標品 *l*-synephrine을 T.L.C.로 展開하여 同一한 Rf 値를 얻었다.

6. T.L.C. Chromatogram에서 分離한 陳皮精製液과 標品 *l*-synephrine을 紫外線部에서 吸收曲線을 比較한 結果 一致되는 曲線을 얻었다.

參 考 文 獻

- 1) 李善宙, 李容柱: 生藥學. 東明社, 227, 1971.
- 2) 朴盛洙, 廉泰煥: 現代漢方講座. 靜友社, 118, 1971.
- 3) 朝比奈泰彥, 犬伏元太郎: *Naringin* 및 *Hesperidin*에 對하여. 日本藥學雜誌, 49, 128, 1929.
- 4) E. Jahns: *Vorkommen von Stachydrin in den Blättern von Citrus vulgaris. Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschafte*, 29:11, 1896.
- 5) Stewart, I., Newhall, W.F. and Edwards, G.J.: *The isolation and identification of l-synephrine in the leaves and fruit of Citrus. J. Biol. Chem.*, 239:930, 1964.
- 6) Stewart, I. and Wheaton, T.A.: *l-Octopamine in Citrus: Isolation and identification. Science*, 145, 60, 1964.
- 7) T.A. Wheaton: *Feruloylputrescine isolation and identification from Citrus leaves and fruit. Nature*, 206:620, 1965.
- 8) 禹麟根: 植物成分學. 東明社, 339, 1963.
- 9) J.F. Thompson. C.J. Morris and R.K. Gering: *Purification of plant amino acids for paper chromatography. Anal. Chem.*, 31, 1028, 1959.
- 10) 李宇柱: *Catecholamine*에 關하여(제2편 *Catecholamines*의 測定法). 大韓藥理學雜誌, 8:4, 1972.
- 11) 金炳珏, 金洛斗, 崔南珠, 李泳南: 韓國의 高等菌類의 成分研究(1). 藥學雜誌, 14:15, 1970.
- 12) Moran, N.C. and Perkins, M.E.: *An evaluation of adrenergic blockade of the mammalian heart. J. Pharmacol.*, 133:192, 1961.
- 13) Nickerson, M. and Chan, Go. M.: *Blockade of response of isolated myocardium to epinephrine. J. Pharmacol.*, 133, 192, 1961.
- 14) Lee, W.C. and Shideman, F.E.: *Cardiac activities of several monoamine oxidase inhibitors. J. Pharmacol.*, 133, 180, 1961.
- 15) Fleckenstein, A. and Stockle, D.: *Zum Mechanismus der Wirkungs-Verstärkung und Wirkungs-Abschwächung Sympathomimetischer Amine durch Cocaine und andere Pharmaka. Die Continued Arch. exp. Path. Pharmak.*, 224: 401, 1955.
- 16) Lee, W.C. and Yoo, C.S.: *Mechanism of Cardiac activities of sympathomimetic of isolated auricles in rabbits. Arch. Int. Pharmacodyn.*, 151: 93, 1964.