약학회지 제40권 제 2 호 225~229(1996)
Yakhak Hoeji Vol. 40, No. 2

녹수초의 항암활성물질의 분리 및 항암력 평가

배기환# · 김환묵* · 이상명
충남대학교 약학대학, *생명공학연구소
(Received December 5, 1995)

Isolation and Evaluation of an Antitumor Constituent from Pyrolae Herba

KiHwan Bae#, HwanMook Kim* and SangMyung Lee
College of Pharmacy, Chungnam National Univ., Taejon 305-764, and
**Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Taejon 305-600, Korea*

Abstract—The cytotoxic effect of Pylorae Herba (*Pyrola japonica* Klenze) against L1210 and K-562 cells was studied *in vitro*. The methanolic extract of Pylorae Radix was added to the culture of L1210 cells and K-562 cells for the cytotoxic activity and the ED50 values of hexane, ethylacetate, buthanol and water fractions from methanolic extract were determined using MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazoliumbromide) assay. The active constituent isolated by bioassay guided fractionation followed by purification gave rise to a yellow needle crystal and was clarified to be chimaphilline by the comparison with the published data. The average life spans with it were not prolonged significantly on tumor growth in hybrid female mouse (BDF1-KIST) inoculated subcutaneously with P388 cells.

Keywords □ Pyrolae Herba, *Pyrola japonica*, L1210 cells, K-562 cells, P-388 cells, cytotoxic activity, hybrid mouse (BDF1-KIST), antitumor activity.

암을 퇴치하기 위한 노력들은 다방면에 걸쳐 이루어지고 있으나 아직도 암을 치료 할 수 있는 가장 이상적인 방법은 제시되지 않고 있다. 현재 진행되고있는 암치료는 외과적수술 (surgery), 방사선치료 (radiation therapy) 및 화학요법(chemotherapy)이 있으며 최근에는 면역요법 (immunotherapy)이 관심을 끌고 있다. 화학요법의 경우 지금까지 많은 연구가 진행되어 왔으나 대부분의 약물은 그 효과에 상응하는 여러가지 부작용을 일으키고 있다. 따라서 부작용이 적고 항암력이 뛰어난 약물을 개발하기 위하여 천연물로 부터 항 종양성 생리활성물질을 찾는 연구가 진행되고 있다. 1940년대 부터 도입된 암치료에서의 화학요법제 개념이 1960년대에 이르러 암에 대한 지식이 쌓여감에 따라 많은 발전을 이루게 되어 암치료에 크게 기여하고 있다. 그러나 현재까지 개발되어진 항암제는 대개가 강한 독성을 보이고 있으며, 특히 조혈 및 면역기능 장애 등 심각한 부작용을 나타낸다. 또한 이들 항암제에 대한 암세포의 내성이 생겨 치료에 한계를 보이고 있다. 그러므로 보다 부작용이 적으면서도 좋은 효과를 발현하는 암치료제의 개발이 절실히 요구된다. 한편, 암 발생 원인과 발생 기전을 해명하여 암을 예방, 치료하고자 하는 많은 연구가 진행되어왔고 면역학 분야의 발전으로 인하여 암백신[1], 면역요법[2], 생물학적제제[3] 등이 암예방 및 치료에 대한 근본적인 가능성을 제시하고 있음에도 불구하고 아직까지 만족할 만한 치료제가 개발되지 않고 있다.

이러한 관점에서 천연물로 부터 새로운 계열의 화합물 즉, 선도화합물(lead compound)을 찾으려는 연구가 세계적으로 진행되고 있다. 천연물은 오랫동안 질병의 예방 및 치료에 사용되어 왔으므로 어떤 면에서는 실질적

본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 042-821-5925 (팩스) 042-821-5903

인 임상실험을 해왔다고 볼 수도 있다. 특히 한국을 비롯한 동양권에서는 천연물에 대한 심오한 철학적 사고가 있으므로 동양적인 사고로 부터 새로운 지식을 얻고 여기에 분석적인 서양식 검색방법이 접목되면 새로운 항암활성물질 창출의 가능성이 높을 것이다. 새로운 항암제를 개발함에 있어서도 천연자원으로 부터 항암활성물질을 가진 물질을 찾아 이를 항암제로 직접 사용하거나 정량적 구조-활성 관계 (Quantitative Structure-Activity Relationship, QSAR) 등을 이용하여 화학구조를 변형하므로서 천연에 존재하는 형태 보다 더욱 효과가 좋은 물질을 얻으려는 연구도 속행되고 있다. 이런 노력의 결과로 탄생된 항암제로는 mitomycin C, adriamycin, vinca alkaloids, podophyllotoxin 유도체 등이 있으며 유망한 항암제로 기대를 모으는 것으로는 서양주목 (*Taxus brevifolia*)의 줄기껍질에서 분리한 taxol이 있다. 본 연구자는 천연물로부터 항암제를 개발할 목적으로 국내 산야에 자생하는 노루발 (*Pyrola japonica* Klenze)을 선정하였다. 노루발의 전초를 Pyrolae Herba라 하며 한방에서는 녹수초(鹿壽草), 녹함초(鹿銜草), 파혈단(破血丹)이라고도 하고 차(茶)대신 마심으로 녹수차(鹿壽茶)라고도 한다.[4] 이 식물은 진달래목(Ericales)의 노루발과(Pyrolaceae)에 속하는 식물로서 보허(補虛), 익신(益腎), 거풍(祛風), 제습(除濕), 조경(調經)의 효능이 있다고 알려져 있다. 이와 같은 효능을 가진 녹수초로 부터 항암활성물질을 분리, 화학구조를 규명하였다. 항암효과는 세포독성 연구와 수명연장효과로 평가하였다. 세포독성실험으로는 생쥐 백혈병의 하나인 L1210세포와 인체의 만성골수성 백혈병세포인 K-562 cell에 대한 *in vitro* 스크리닝 실험을 하였고 수명연장효과는 P388을 이식한 생쥐를 실험대상으로 연구, 그 결과를 보고한다.

실험방법

실험재료 – 실험에 사용된 녹수초는 1994년 10월 – 11월경 계룡산에서 채취한 후 그늘에서 말려서 사용하였다.

시약 및 기기 – column chromatography용 silica gel 60 (Merck, 70~230, 230~400 mesh ASTM), precoated silica gel 60 GF_{254} T.L.C. plate (Merck, 20×20 cm), dimethyl sulfoxide, $NaHCO_3$(Sigma), absolute ethanol (Merck), penicillin G 10만 unit/g, streptomycin 10만 unit/g (Sigma), Fisher's medium, horse serum (GIBCO), RPMI 1640 medium, fatal bovine serum (Flow Lab.) 기타 시약 및 용매는 특급 또는 일급을 사용하였고, 공업용인 경우에는 증류하여 사용하였다. UV/VIS spectrophotometer (Milton Roy Spectronic 3000 Array), IR spectrophotometer (Jasco Report-100), NMR (JEOL JNM-EX90).

L1210 세포와 배양액 – 마우스 백혈병 세포인 L 1210 cell[5]은 생명공학연구소로 부터 분양받았으며, 주 2회 계대 배양하였다. 이 세포는 구형이고 이분법에 의하여 성장한다. 배양액은 증류수에 10.5 g의 Fisher's medium, $NaHCO_3$ 1.125 g, penicillin G (100,000 Units) 그리고 streptomycin (100 mg)을 넣어 용해시키고 pH를 7.2로 조절하여 전체량을 1 로 하였다. 그리고 최종 농도가 10% 되도록 horse serum을 첨가한 후 세균 여과기로 여과하여 사용하였다.

K-562 세포와 배양액 – 인체의 만성골수성 백혈병 세포주인 K-562 cell[6]은 생명공학연구소로 부터 분양받았으며, 주 2회 계대 배양하였다. 배양액은 L-glutamine이 포함된 RPMI 1640 1봉지, $NaHCO_3$ 2 g 및 penicillin G (100,000 unit), streptomycin (100 mg)을 넣어 용해시키고 pH를 7.2로 조절하여 전체량을 1 *l*로 하였다. 그리고 최종농도가 10%가 되도록 fetal bovine serum을 첨가한 후 세균 여과기로 여과하여 사용하였다.

P-388 혈액암세포와 배양액 – 생명공학연구소에서 보관 중인 것으로서 RPMI1640에 10% 비율로 FCS (fetal calf serum)를 첨가한 배지로 계대배양하여 사용하였다.

L1210 세포에 대한 세포독성 실험[9] – 세포 독성 실험에 사용되는 logarithmic phase에 도달한 L1210 세포를 얻기 위하여 실험 24시간 전에, 36~37°C로 가온한 Fischer medium을 넣은 250 m*l* screw-capped Erlenmeyer flask에 L1210 세포를 가해 $2\sim3\times10^5$ cells/m*l* 농도가 되게 조정한 후 배양시켰다(spinner culture). 이렇게 배양한 배양액의 농도는 약 $0.8\sim1.0\times10^6$ cells/m*l*가 된다. 이 spinner culture한 세포를 세포독성 실험을 하기 바로 전에 미리 36~37°C로 가온한 fresh medium으로 희석하여 5×10^4 cells/m*l*의 농도가 되도록 L1210 세포 현탁액(run bottle)을 만들었다. 시료는 실험을 하기 바로 전에 일정 농도의 에탄올 또는

DMSO에 녹여 만들었고, 이 시료용액 0.1 m*l*에 fresh medium 0.9 m*l*를 가해 10배 희석한 후 그 용액 0.1 m*l*을 취해 0.9 m*l*의 fresh medium을 가해 100배 희석하였다. Screw-capped tube에 희석액을 각각 60, 30, 15 μ*l*를 가하고 위에서 조제한 세포 현탁액(run bottle)을 3 m*l*씩 넣고 대조군 tube에는 3 m*l*의 현탁액만을 넣어 37°C, CO_2 incubator (5%)에서 48시간 배양 후 hemacytometer를 사용하여 세포수를 계산하였다.

K-562 세포에 대한 세포독성 실험 - 상기의 L1210 세포에 대한 세포 독성 실험과 마찬가지로 시료를 일정 농도가 되도록 DMSO에 용해시키고, fresh medium을 넣어 100배 희석액을 만들었다. 이 희석액을 각각 10, 20, 40 μ*l*씩을 micropipette로 취하여 각각 2개 씩의 24-well plate에 가한다. 이 culture tube 및 대조군 tube에 10^5 cells/m*l*로 희석한 세포 현탁액 2 m*l*를 가하고 잘 흔든 후, 이들을 37°C, CO_2 incubator(5%)에 넣고 72시간 배양한 후 hemacytometer를 사용하여 세포수를 계산하였다.

ED_{50} 값의 결정과 세포독성의 판단 - ED_{50}값은 대조군의 50% 수준으로 L1210 세포의 성장을 억제하는 시료의 농도 (μg/m*l*)로 주어지며, Thayer등의 방법[7]에 의해 결정하였다.

물질의 물리화학적 분석 - IR, UV/VIS 스펙트럼 측정에 있어서 고체 시료는 2~3%되게 KBr로 희석하여 disk를 만들어 4000~600 cm^{-1}영역의 스펙트럼을 얻었으며, UV cell은 10 mm를 사용하였다. NMR 스펙트럼은 chloroform-d_1, dimethyl sulfoxide-d_6을 용매로 사용하였고, 내부 표준물질로 사용한 tetramethylsilane(TMS)을 기준으로 chemical shift을 δ (ppm)로 나타내었다.

활성물질군의 Screening test - 국내의 산야에 자생하는 녹수초(*Pyrola japónica*)를 건조한 뒤, 40 g을 메탄올로 3시간씩 두번 추출하여 여과한 후, 추출액을 감압농축하여 MeOH엑스를 얻었다. 본 엑스를 물에 현탁하여 헥산, 에틸아세테이트, 부탄올 순으로 추출, 용매를 유거하여 각각 용매분획군을 만들었다. 각 용매분획에 대해 L1210 세포에 대한 독성실험을 행하였다.

세포독성 물질의 분리 - 녹수초 뿌리(170 g)를 메탄올 2 *l*로 환류시키면서 24시간씩 3회 추출하여 여과한 후, 추출액을 감압, 농축하여 25 g의 메탄올 추출물을 얻었다. 이렇게 하여 얻어진 메탄올엑스를 700 m*l*의 증류수에 현탁시킨 후 헥산, 에틸아세테이트, 부탄올 순으로 용매 분획하였다. 각각의 용매 분획층의 *in vitro* 세포독성 검사를 한 결과 Table 2 처럼 나타났고 헥산, 에틸아세테이트층의 TLC 결과 헥산층은 에틸아세테이트층과 거의 같은 물질군으로 나타난다. 따라서 헥산층과 에틸아세테이트층을 합하여 column chromatography하여 물질을 분리하였다.

Table I — Cytotoxicity of the fractions against L1210 cells[a]

fractions	ED_{50} values (μg/m*l*)[b]
hexane	0.70±0.04
ethylacetate	1.23±0.33
buthanol	>20.00
water	>20.00

[a] The cells (5×10^4 cells/m*l*) were cultured in 5% CO_2 incubator at 37°C for 24 hrs., and then each extracts was mixed and incubated at 37°C for 48 hrs.
[b] Cytotoxicity of these fractions was evaluated bythe procedure of Thayer *et al*[7].

Table II — ED_{50} values of the consituents from *Pyrola japonica*

Compounds	ED_{50} vdalues (μg/m*l*)	
	L1210 cells	K-562 cells
constituent 1	1.17±0.20	0.88±0.07

L1210 cells were cultured in same condition as shown in Table I and K-562 cells cultured for 72 hrs.

P-388 혈액암 모델을 이용한 생체 항암활성시험 - 실험동물은 KIST 생명공학연구소에서 사육하고 있는 BDF1 hybrid 생쥐(BDF1-KIST)를 사용하였으며, 실험방법 및 결과의 판정은 미국 NCI 실험방법에 준하였다.[8-9] 약물의 암세포 성장 억제 효과를 보기 위해 약물처리 하루전에 생쥐 혈액암인 P388 세포 10^6 cells을 생쥐 한 마리씩에 복강주사하여 복수암을 유발시켰다. 시료는 0.5% Tween 80으로 현탁액을 만들어 복강내로 주사하였으며, BDF1 생쥐 암컷 5마리씩을 각각 약물무처리군, 용매 처리군 및 3개 용량의 약물처리군 (10, 30, 100 mg/kg)으로 나누어 투여하였다. 약물의 투여는 P 388 혈액암 세포를 주사한 후 1, 3, 5일째에 각 처리군에 투여하였으며, 24시간 마다 생쥐의 사망여부를 관찰하였다.

결과 및 고찰

활성물질군의 세포독성 - 실험 재료를 메탄올로 추출, 항암활성물질을 효율적으로 분리하기 위하여 용매

로 분획을 만들었다. 각 용매분획을 L1210 세포에 대한 세포독성을 실험한 결과 (Table I), 헥산분획과 에틸아세테이트분획에 세포독성이 있었으며 ED_{50}값이 각각 0.70과 1.23 μg/m*l*이었다. 헥산분획물과 에틸아세테이트 분획물을 TLC로 비교한 결과 거의 같은 물질군으로 판정되었기에 분획물을 합하여 물질의 분리에 들어갔다. NCI manual에 따르면 L1210 세포에 대한 세포독성 평가는 식물 추출물인 경우 20 μg/m*l*이하, 합성품인 경우 4 μg/m*l*이하일 경우 항암작용이 있다고 규정하고 있으므로[11], 이 두분획의 세포독성작용은 유의성이 있다고 판단된다.

세포독성물질의 분리 - 메탄올엑스를 물 700 m*l*에 현탁시켜 에틸아세테이트 500 m*l*를 가하여 분획하고, 농축하여 에틸아세테이트분획물(10 g)을 얻었다. 이것을 silica gel column chromatography (hexane-EtOAc 4 : 1~2 : 1)하여 fr. 1, 2, 3, 4를 얻고 세포독성을 측정하였다. 그 결과 fr. 2 (3.5 g)에서 세포독성을 관찰할 수 있었으므로 이 분획물을 silica gel column chromatography (hexane-EtOAc 4 : 1)하여 조결정을 얻고, 같은 조건으로 다시 컬럼에 걸어 황색의 침상결정을 얻었다. 이 물질은 benzene/acetone (4 : 1)의 용매 조건하에 TLC한 결과 단일 물질로 확인되었고, mp는 113.5~114.5°C이었다. 이 물질 이외에도 강한 세포독성이 있는 물질이 있었으나 미량인데다 불안정하여 분리하지 못했다.

세포독성물질의 구조분석 (Constituent 1)[10-16] - UV/VIS 스펙트람에서 253 및 338 nm에서 극대흡수파장을 나타냈는데 이는 naphtoquinone계의 특징을 암시한다. IR 스펙트럼에서 3040 cm^{-1}의 =CH, 2958~2920 cm^{-1}에서 aliphatic CH, 1660 cm^{-1}에서 C=O, 1598 cm^{-1}에서 C=C의 피크가 나타났다. ^{1}H-NMR 스펙트럼은 7.95에서 5번 탄소에 위치한 1개의 수소가 6번 탄소에 위치한 1개의 수소에 의해서 doublet(J=8.1 Hz)으로 짝지워져 나타나며 7.90에서 8번 탄소에 위치한 1개의 수소가 singlet, 7.52에서 6번 탄소에 위치한 1개의 수소가 이웃한 5번 위치의 1개의 수소에 의해서 doublet(J=8.1 Hz)으로 짝지워져 나타나며 6.79에서 3번 탄소에 위치한 1개의 탄소가 11번 탄소에 위치한 3개의 탄소에 의해서 quartet (J=1.7 Hz)로 짝지워져 나타난다. 또한 2.49에서 12번 탄소에 위치한 3개의 수소가 singlet로 나타나며 2.17에서 11번 탄소에 위치한 3개의 수소가 doublet(J=1.7 Hz)로 나타난다. ^{13}C-NMR spectrum은 16.3, 21.8에서 12번, 11번 2개의 CH_3 탄소의 피크가 확인되며 δ126.2, δ126.8, δ134.3, δ135.7에서 3, 5, 6, 8번 탄소의 피크가 각각 나타나며 δ131.4, δ132.2, δ144.6, δ147.9에서 2, 7, 9, 10번 탄소가 각각 나타난다. 이상의 분광학적 자료를 종합한 결과, 세포독성을 나타내는 constituent 1은 2,7-dimethyl-1,4-naphthoquinone인 chimaphiline으로 확인하였다(Fig. 1).

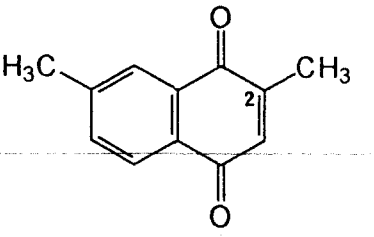

Fig. 1 — *The chemical structure of chimaphilline.*

Table III — Antitumor effect of chimaphiline in hybrid female mouse (BDF1-KIST) implanted with P388 cells *in vivo*

Dose (mg/kg)	Median Survival day	T/C (%)
control	10.3	
solvent	9.5	100
chimaphilline 10	10.5	110
chimaphilline 30	10.0	105
chimaphilline 100	10.2	107

Hybrid female mice (BDF1-KIST) were implanted *ip* with 10^6 cells of P388 and chimaphilline was administered for 10 days after tumor inoculation. The average life spans of treated animals were determined.

세포독성 평가 - constituent 1의 L1210과 K562에 대한 세포독성을 조사한 결과는 Table II와 같다. 즉, constituent 1은 L1210과 K-562에 대한 ED_{50}값이 1.17과 0.88 μg/m*l*이었으며 이 값은 강활에서 분리한 bisabolagenone[17]과 유사한 세포독성을 보였다.

P388 혈액암 모델을 이용한 생체 항암활성시험 - 항암활성효과를 관찰하기 위하여 투여군을 약물무처리군, 용매처리군, 약물처리군(chimaphilline 10, 30, 100 mg/kg)으로 구분하였고 실험의 결과는 처리군의 평균생존일을 대조군의 평균생존일로 나눈 백분율로 나타낸 T/C 값으로 표현하였다(Table III). chimaphilline 10 mg/kg 처리군에서는 대조군과 처리군의 생존일을 비교한 T/C 값이 110% 로서 125% 이상을 보통활성이 있는 것으로 규정한 미국 NCI 기준을 참고할

때 본 시료는 항암활성 효과가 약한 것으로 나타났다. 30, 100 mg/kg처리군에서도 대조군과 처리군의 생존일을 비교한 T/C 값이 각각 105% 및 107%로서 항암활성 효과가 거의 없었다.

결 론

이상과 같은 실험결과, 녹수초의 세포독성물질에 대하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. L1210 및 K-562세포에 대한 녹수초의 중요한 세포독성물질은 chimaphiline (2,7-dimethyl-1,4-naphthoquinone) 이었으며 L1210 cells과 K-562 cells에 대한 ED_{50}값이 1.17과 0.88 μg/m*l*이었다.

2. P388 혈액암 모델을 이용한 생체 항암활성시험에서 chimaphiline 10, 30, 100 mg/kg 처리군에서는 대조군과 처리군의 생존일을 비교한 T/C 값이 110% 이하로서 항암활성 효과가 미약하였다.

감사의 말씀

이 논문은 1994년도 한국 학술진흥재단의 공모과제 연구비에 의하여 연구되었다. 이에 깊이 감사드린다.

문 헌

1) Hellman, K., Phil, D. and Carter, S. K.: Fundamental of Cancer Chemother., McGraw Hill Book Co., New York, p. 64 (1987).
2) Giampietri, A.: Drug-mediated increase of tumor immunogenicity in vivo for a new approach to experimental cancer immunothrapy, *Cancer Res.* **41**, 681 (1981).
3) Budd, G. T., Osgood, B., Barna, B., Boyett, J. M., Finke, J., Mdendrop, S. V., Murth, S., Nobak, C., Sergi, J., Tubbs, R. and Bukoski, R. M.: Phase I clinical trial of interleukin 2 and alpha interferon, Toxicity and immunologic effects, *Cancer Res.* **49**, 6432 (1989).
4) 정보섭, 신민교: 圖解 鄕約 大辭典, 영림사, 서울, p. 997, (1990).
5) Low, L. W., Dunn, T. B., Boyle P. J., Miller, J. H.,: *J. Natl. Cancer Inst.* **10**, 179 (1949).
6) Hay, R., Macy, M., Chen, T. R., Mc Clintok, P. and Reid, Y.:American type culture collection catalogue of cell lines and hybridomas, 6th ed., ATCC, Moryland P., 102, p. 132 (1988).
7) Thayer, P. S., Himmelfarb, P. and Watts, G. L.: Cancer Chemother. Rep., (Part 2), 2, 1 (1971) cited from Lee *et al*. Kor. J. Pharmacogn. **17**, 286 (1986).
8) Driscoll, J. S.: The preclinical new drug research program of the National Cancer Institute. *Cancer Treat. Rep.* **68**, 63 (1984).
9) Pierre, A., Kraus-Berthier, L., Atassi, G., Cros, S., Poupon, M-F., Lavielle, G., Berlion, M., and Bizzari, J-P.: Preclinical Antitumor Activity of a New *Vinca* Alcaloid Derivatives, S 12363. *Cancer Res.* **51**, 2312 (1991).
10) Inouye, H., Yokura, K., Tobita, S.: Zur struktur des Pirolatins, *Chem. Ber.* **101**, 4057 (1986).
11) Yazaki, K., Shida, S. and Okuda, T.: Galloylhomoarbutin and related polyphenols from *Pyrola incarnate, Pytochem.* **28**, 607 (1989).
12) Kosuge, T., Yokota, M., Sugiyama, K., Mure, T., Yamazawa, H. and Yamamoto, T.: Study on bioactive substances in crude drugs used for arthrutic diseases in traditional Chinese medicine III. Isolation and identification of anti-anflammatory and analgesic principles from the whole Herb of *Pyrola rotundfolia* L., *Chem. Pharm. Bull.* **33**, 5355 (1985).
13) Low L. W., Dunn T. B., Boyle P. J. and Miller J. H.,: *J. Natl. Cancer Inst.* **10**, 179 (1949).
14) Kagawa, K., Tokura, K., Uchida, K., Kakushi, H., Shike, T., and Nakai, H.: Platelet aggregation inhibitory and inotropic constituents in Pyroae Herba, *Chem. Pharm. Bull.* **40**, 2083 (1992).
15) Lanny S. L., Kenmeth L. G., and Zhang, T.: A strategy for generalization of the regiospecific synthesis of substituted quinones from cyclobutenediones. *J. Org. Chem.* **57**, 4345 (1992).
16) Ryu, C. and Kim, D.: The antimicrobial activities of some 1,4-naphthalenes (III), *Arch. Pharm. Res.* **16**, 161 (1993).
17) Bae, K., Ji, J., Kang, J. and Ahn, B.: A cytotoxic component from Angelicae Koreanae Radix against L1210 and HL60 cells, *Arch. Pharm. Res.* **17**, 45 (1994).