

무청으로부터 분리된 이소람네티 3-O-β-D-글루코피라노사이드의 항헤르페스 바이러스 1형(HSV-1) 효과

김호경* · 강봉주 · 박갑주 · 고병섭 · 황완균*
한국한의학연구원 연구부, *중앙대학교 약학대학
(Received July 30, 1998)

Anti-Herpes Simplex Virus type 1 (HSV-1) Effect of Isorhamnetin 3-O-β-D-Glucopyranoside Isolated from *Brassica rapa*

Ho Kyoung Kim*, Bong Joo Kang, Kap Joo Park,
Byoung Seob Ko and Wann Kyun Whang*
Department of Research, Korea Institute of Oriental Medicine, 129-11
Chungdam-dong Chungam Building Kangnam-Ku, Seoul 135-100, Korea
*College of Pharmacy, Chungang University, Seoul 156-756, Korea

Abstract—In the course of our search for anti-Herpes simplex virus type 1 (HSV-1) substances from natural sources, we screened crude drugs for their antiviral activity using SRB assay. The methanol extract from herb of *Brassica rapa* (Cruciferae) was found to inhibit HSV-1. Through bioassay-directed fractionation of the extract, anti-HSV-1 agent was isolated by chromatographic separation using Amberlite XAD-4 and Sephadex LH-20. The structure of compound I was elucidated by spectral means including ¹H-¹H COSY, HMQC and HMBC to be isorhamnetin 3-O-β-D-glucopyranoside (compound I). Compound I was active against HSV-1 with the 50% effective concentration of 0.42 mg/ml and the 50% cytotoxicity of 5.0 mg/ml.

Keywords □ Anti-Herpes simplex virus type 1 (HSV-1), Cruciferae, SRB assay, *Brassica rapa*, Isorhamnetin 3-O-β-D-glucopyranoside.

무청(蕪菁, *Brassica rapa*, Cruciferae)은 유럽과 시베리아의 반온대지방이 원산지이며, 우리나라에는 중국에서 도입되어 고대부터 재배된 채소이다. 잎과 뿌리를 식용으로 이용하고 민간에서 소화불량, 해소천식, 설사 등에 사용되고 있으며 세균, 진균, 기생충제거 효과가 있다.¹⁻³⁾ 무청(蕪菁)에서 지금까지 밝혀진 성분으로는 tri-carballic acid, glyconasturtiin, thellykinine, acetic acid 등이 있다.⁴⁾ 최근에 Herpes simplex virus (HSV-1)의 치료제를 천연물에서 개발하려는 연구가 많이 시도되고 있다. 지금까지 의학적으로 항바이러스제로

사용되는 천연물은 거의 없지만 alkaloids, carbohydrates, flavonoids, phenols, tannins, quinones, terpens, proteins 성분들이 Herpes simplex virus 1형과 2형에 효과가 있기 때문에 천연물로부터 항바이러스제가 개발될 가능성이 높다.⁵⁾ Corthout 등^{6,7)}은 tannin인 geraniin과 galloylgeraniin 및 phenol성 물질인 chlorogenic acid butyl ester가 Herpes simplex virus에 활성이 있다고 보고하였으며 Hirabayashi 등⁸⁾은 glycyrrhizin 유도체, Xu 등⁹⁾은 *Woodwardia orientalis*에서 분리된 woodorien이 HSV-1에 활성이 있다고 보고하였다. 그리고 Kurokawa 등¹⁰⁾은 4종의 생약과 acyclovir를 혼합한 것이 acyclovir 한가지만 사용한 것보다 HSV-1에 효과가 있다고 보고하였다. 기존

* 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 02-3443-1994 (팩스) 02-3442-0220

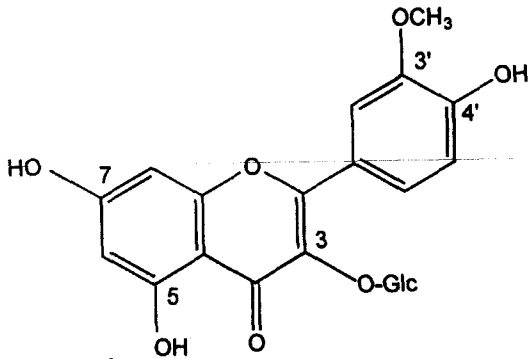


Fig. 1 — Structure of Compound I.

의 항바이러스제가 가지는 부작용을 최소화하고 숙주세포에는 그 약리작용이 전혀 미치지 않는 이상적인 항 Herpes 바이러스 1형 (HSV-1) 활성물질을 탐색하기 위한 연구의 일환으로 한방 및 민간에서 사용되고 있는 80종의 생약들을 대상으로 그들의 메탄올 추출물과 열수 추출물에 대하여 일차 검색을 실시하여 무청을 포함한 10여종 생약의 메탄올 추출물들이 높은 억제 효과를 나타낸다는 사실을 보고한 바 있다.¹¹⁾ 본 연구에서는 활성을 나타낸 생약 중 무청의 메탄올 추출물로부터 항 Herpes 바이러스 1형 (HSV-1)에 활성을 나타내는 flavonoid 배당체인 isorhamnetin 3-O-β-D-glucopyranoside (compound I)를 분리, 동정하였기에 보고하고자 한다.

재료 및 방법

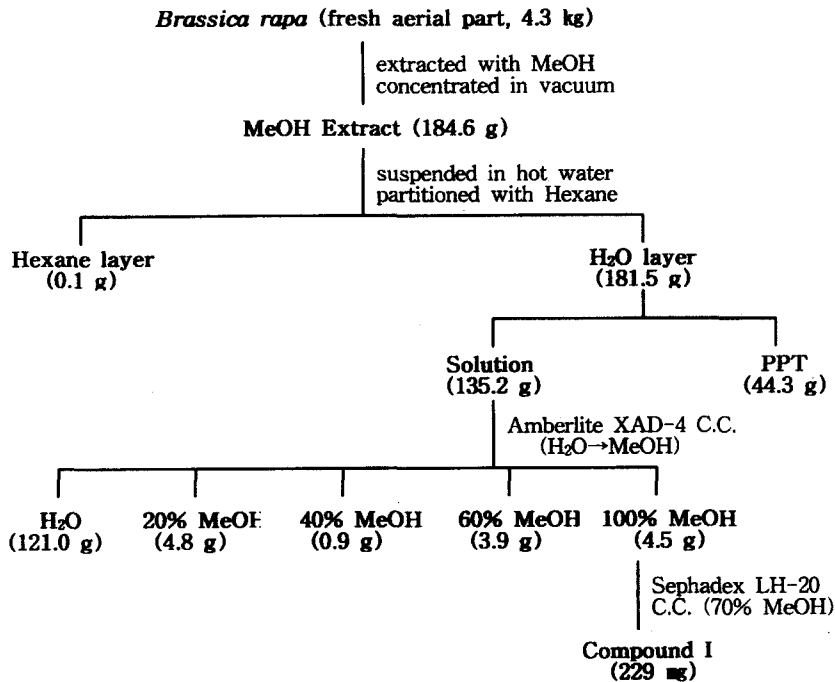
실험재료 - 본 실험에 사용한 무청(燕薺)은 1996년 12월 강화도에서 구입하여 식물학적 감정을 거친 후 신선한 상태에서 실험재료로 사용하였고 이 생약의 표본은 한국한의학연구원 연구부에 보관되어 있다. Column chromatography용 담체는 Amberlite XAD-4(Sigma), Lipophilic Sephadex LH-20(Pharmacia)를 사용하였고, TLC plate는 Kieselgel 60 F₂₅₄(Merck)를 사용하였다. 바이러스는 국립보건원 후천성 면역결핍과에서 분양받은 Herpes simplex virus type 1 strain F(American type culture collection, ATCC VR-733, Rockville, MD)를 사용하였고 숙주 세포는 한국 세포주 은행으로부터 분양받은 Vero 세포주 (African green monkey kidney cell, ATCC CCL81)를 사용하였다. 생리활성실험에 사용한 시약들

은 Sigma의 특급시약을 사용하였으며, 배지는 GibcoBRL사의 제품을 사용하였다.

기기 - M.P. apparatus는 Electrothermal Engineering의 Melting point 9100(Canada), Polarimeter는 Jasco DIP-370 Digital Polarimeter(Japan), IR Spectrophotometer는 Bruker IFS 48(Germany), FAB-Mass Spectrometer는 VG70-VSEQ(England), ¹H-NMR Spectrometer는 Bruker AM-500, 500MHz(Germany), ¹³C-NMR Spectrometer는 Bruker AM-500, 125MHz(Germany)를 사용하였고 Microplate reader(molecular devices)는 Spectra MAX 340(USA)를 사용하였다.

활성물질의 분리 - 강화도에서 구입한 무청(燕薺)을 식물학적 감정을 거친 후 신선한 상태에서 실험재료로 사용하였다. 무청 4.3 kg을 천연물 약품화학적 실험방법에 따라 60°C oven에서 MeOH 15 l로 24시간 3회 반복 추출한 후 저온에서 감압농축하여 엑스 184.6 g을 얻은 후 활성을 검색한 결과 항HSV-1 효과를 나타냈다. 이 메탄올 추출물을 물에 현탁시킨 후 여과한 여액을 Hexane으로 비극성물질을 분획(0.1 g)한 다음 수용성분획의 여액 135.2 g을 비이온성교환수지인 Amberlite XAD-4 column에 흡착시킨 후 용매 MeOH을 증량시켜 극성을 변화시키면서 column chromatography를 실시하여 H₂O(121 g), 20% MeOH(4.8 g), 40% MeOH(0.9 g), 60% MeOH(3.9 g) 및 100% MeOH 층(4.5 g)으로 분획하였다(Scheme D). 이들 중에서 100% MeOH분획이 활성을 나타낸 반면 나머지 분획들은 활성을 보이지 않았다. 활성이 있는 100% MeOH분획을 Sephadex LH-20과 70% MeOH을 사용한 column chromatography를 실시하여 compound I(229 mg)을 분리한 후 항HSV-1 활성을 검색한 결과 효과가 있었다.

화합물 I - yellow amorphous power, mp: 215~218°, $[\alpha]_D^{23} = -21.7^\circ$ (c. 0.06 in MeOH), IR ν_{max}^{KBr} cm⁻¹: 3304(OH), 2926(C-H), 1658(C=O), 1606, 1457(C=C), 1507(C-C), 1178, 1124(C-O), 1066(glycosidic O), 991, 814(aromatic ring), FAB-Mass(m/z): 477[M-H]⁻, 315[M-glc-H]⁻, ¹H-NMR(500 MHz, CD₃OD) δ : 3.93(3H, s, -OCH₃), 5.42(1H, d, J=7.6 Hz, glc anomeric H), 6.17(1H, d, J=2.1Hz, H-6), 6.36(1H, d, J=2.1Hz, H-8), 6.89(1H, d, J=8.4Hz, H-5'), 7.56(1H, dd, J=2.1, 8.4Hz, H-6'), 7.92(1H, d, J=



Scheme I — Extraction and Isolation of Compound from the Herbs of *Brassica rapa*.

2.1Hz, H-2'). ¹³C-NMR(125MHz, CD₃OD) δ: 158.5 (C-2), 135.3(C-3), 179.3(C-4), 163.0(C-5), 99.8(C-6), 165.9(C-7), 94.7(C-8), 158.4(C-9), 105.7(C-10), 123.0 (C-1'), 114.3(C-2'), 148.3(C-3'), 150.8(C-4'), 115.9 (C-5'), 123.7(C-6'), 103.6(C-1''), 75.9(C-2''), 78.5 (C-3''), 71.4 (C-4''), 78.0(C-5''), 62.5(C-6''), 56.7(-OCH₃).

세포배양 - 실험에 사용된 Vero세포의 배양액은 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM, GibcoBRL)이었으며, Fetal bovine serum(FBS, GibcoBRL), Gentamicin(100 units/ml) 등을 첨가하였다. Vero세포는 배양 3일 간격으로 배양세포 표면을 phosphate buffered saline(PBS) 용액으로 씻어 준 후 50 ml flask당 1 ml의 0.25% trypsin-EDTA 용액을 넣고 실온에서 1분간 처리한 다음 trypsin-EDTA용액을 버리고 37°C에서 5분간 보관하여 세포를 탈착시켜 계대배양하였다. 탈착된 세포는 5% FBS가 첨가된 DMEM배지 10 ml에 부유시킨 다음 새로운 배양용기(25 cm² culture flask, Nunc)에 옮겨 1:20의 split ratio로 CO₂ 배양기(37°C, 5% CO₂)에서 배양하였다.

SRB법에 의한 세포증식능 측정 - SRB법에 의한 세

포증식능 측정은 Alley 등과 Skehan 등^{12,13}의 방법을 응용하여 사용하였다. 5% FBS가 첨가된 DMEM배지에서 3일간 배양하고 배양배지를 제거한 후, PBS로 세포표면을 세척하고 0.25% trypsin-EDTA 1 ml를 첨가하여 1분간 반응시킨 후, 0.25% trypsin-EDTA를 제거하고, 5% FBS가 첨가된 DMEM 배양액 5 ml를 첨가하여 피펫팅하고 세포부유(cell suspension) 대 trypan blue(1%)=1:1로 혼합하여 haemocytometer로 세포수를 계산하여 5×10⁴ cells/ml로 부유시켰다. 세포부유액 100 μl씩을 96 well plate의 각 well에 분주하여 well당 Vero 세포를 2.0×10³ cells로 조절한 다음 5% CO₂ incubator(5% CO₂, 37°C)에서 24시간 배양하여 세포를 부착시킨 후, 0.1 MOI(multiplicity of infection)의 HSV-1을 감염시키고 각 well에 각 농도별로 희석하여 검액시료를 첨가하였다. 이상과 같이 처리한 후, CO₂ incubator에서 4일간 배양하여 배양이 끝난 세포에 trichloroacetic acid(TCA, Sigma)를 최종 농도가 10%로 되게 첨가하고 4°C에서 1시간 배양하여 세포를 고정시킨 후, 증류수로 5회 반복하여 세포를 세척하였다. 건조된 plate의 각 well에 1% acetic acid로 용해시킨 0.1% SRB용액 100 μl씩 가하여 상온에서 30분동안 충분히 염색시킨 후 1% acetic acid

로 5회 세척하여 공기중에서 건조시켰다. 완전히 건조 되면 10 mM unbuffered Tris(pH 10.5) 용액을 각 well에 첨가하여 세포단백질에 부착된 SRB dye를 10분간 잘 용해시키고 균일하게 만든 후 microplate reader에서 564 nm의 파장으로 흡광도를 측정하여 세포의 증식정도를 측정하였다.

결과 및 고찰

항바이러스 활성 - 무청(蕪菁)의 메탄올 추출물은 0.8 mg/ml 농도에서 항HSV-1 활성을 나타냈다. 이 메탄올 추출물을 물에 현탁시킨 후 여과한 여액을 hexane으로 비극성물질을 분획한 다음 수용성분획의 여액을 비이온성교환수지인 Amberlite XAD-4 column에 흡착시킨 후 용매 MeOH를 증량시켜 극성을 변화시키면서 column chromatography를 실시하여 H₂O, 20% MeOH, 40% MeOH, 60% MeOH 및 100% MeOH 층으로 분획하였다. 이들 중에서 100% MeOH분획이 0.045~0.13 mg/ml 농도에서 활성이 나타난 반면 나머지 분획들은 활성을 보이지 않았다. 활성이 있는 100% MeOH 분획을 Sephadex LH-20과 70% MeOH을 사용한 column chromatography를 실시하여 compound I(229 mg)를 분리하여 활성을 검색한 결과 0.13~0.41 mg/ml 농도에서 활성을 나타냈다(Table I).

HSV-1에 대한 compound I의 EC₅₀는 0.42 mg/ml이고 CC₅₀는 5.0 mg/ml였으며 CC₅₀/EC₅₀로 나타낸 선택지수(selectivity index)는 11.9로서 compound I은 항바이러스 효과가 있었다(Table II).

Compound I - 황색 분말상 결정으로 FeCl₃ 반응과 Mg+HCl 반응에 양성이며, IR spectrum에서 3304(OH), 2926(C-H), 1658(C=O), 1606, 1457(C=C), 1507(C-C), 1178, 1124(C-O), 1066(glycosidic O) 및 991, 814(aromatic ring) cm⁻¹ 등의 흡수대가 나타나는 것으로 보아 flavonoid계 배당체로 추정되었다. 또한, FAB(-)MS spectrum에서는 m/z 477에서 M-H의 molecular ion peak를, m/z 315에서 glucose가 탈락된 fragment ion peak를 관찰할 수 있었다. ¹H-NMR spectrum에서 δ3.93 ppm에서 methoxyl에 기인하는 3H의 signal이 singlet으로 나타나며 δ5.42 ppm에서 glucose의 anomeric proton signal이 doublet(J=7.6Hz)으로 나타나고 있음을 알 수 있었다. 이 외의 aromatic field에서는 δ6.17 ppm에서 H-6 signal이 doublet(J=2.1 Hz)으로 H-8과 meta coupling하는 것을 관찰할 수 있었고 δ6.89 ppm에서 H-5' signal이 doublet(J=8.4 Hz)으로 H-6'과 ortho coupling하고 있음을 알 수 있었으며 δ7.56 ppm에서 H-6'은 double doublet(J=2.1, 8.4 Hz)으로 H-2'와 meta coupling하고, H-5'와는 ortho coup-

Table I— Inhibitory effects of *Brassica rapa* against HSV Type I by SRB method

Medicinal Herb	Fractions	Concentration (mg/ml)					
		0.010	0.045	0.130	0.410	0.800	1.230
<i>Brassica rapa</i>	fr. 1	-	-	-	-	++	-
	fr. 2	-	++	++	-	-	-
	compound I	-	-	++	++	-	-

+++ : 80% Cell Survival of HSV-1 infection *in vitro*, ++ : 50% Cell Survival of HSV-1 infection *in vitro*, + : 30% Cell Survival of HSV-1 infection *in vitro*

* fractions: **fr. 1** MeOH extracts, **fr. 2** Amberlite 100% MeOH layer.

Table II— Anti-HSV type I activity of compound I

Medicinal Herb	Family	Chemical name	EC ₅₀ (mg/ml) ^{a)}	CC ₅₀ (mg/ml) ^{b)}	SI ^{c)}
<i>Brassica rapa</i>	Cruciferae	Isorhamnetin 3-O-β-D-glucopyranoside (compound I)	0.42	5.0	11.9
<i>Mallotus japonicus</i>	Euphorbiaceae	Butyrylmallotochromanol ¹⁶⁾	0.23×10 ⁻³	2.5×10 ⁻³	10.9
<i>Mallotus japonicus</i>	Euphorbiaceae	Isomallotochroman ¹⁶⁾	0.97×10 ⁻³	8.8×10 ⁻³	9.1

^{a)} 50% Effective concentration means dose required to achieve 50% protection of the cells against the cytotoxic effect of HSV-1.

^{b)} 50% Cytotoxic concentration means dose required to reduce the number of viable uninfected cells by 50%.

^{c)} Selective index means the ratio of CC₅₀ to EC₅₀.

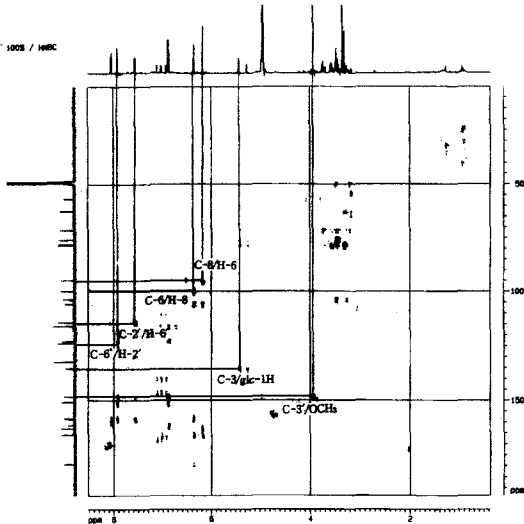


Fig. 2 — HMBC Spectrum of Compound I.

ling하고 있음을 확인할 수 있었다. 또한, $\delta 7.92$ ppm에서 H-2'는 doublet($J=2.1$ Hz)으로 H-6'와 meta coupling하고 있음을 확인할 수 있어 isorhamnetin glycoside로 추정하였다.

^{13}C -NMR spectrum에서는 isorhamnetin과 비교했을 때 C-2, C-4 carbon이 각각 저자장 shift되어 관찰되고 C-3이 고자장 shift 되어 관찰되므로 C-3에 당이 치환되어 glycosylation shift가 일어난 것을 확인할 수 있었고 $\delta 179.3$ ppm에서 C-4의 carbonyl기를 관찰할 수 있었다.^{14,15)} 또한, $\delta 150.8, 148.3$ ppm에서 C-3', 4' signal이 관찰되어 C-3', 4' 위치의 proton이 치환되어 있음을 알 수 있었으며 $\delta 56.7$ ppm에서 methoxyl carbon, $\delta 103.6$ ppm에서 glucose anomeric carbon signal을 확인할 수 있었다. ^{13}C - ^1H COSY spectrum으로 C와 H를 서로 귀속시킨 후 ^1H - ^1H COSY spectrum을 측정한 결과 compound I이 isorhamnetin에 glucose 1분자가 결합되어 있는 화합물임을 추정할 수 있었다. 한편, 당의 결합위치를 확인하기 위하여 HMBC의 NMR기법을 이용하여 분석한 결과 $\delta 5.42$ ppm의 glucose anomer proton이 $\delta 135.3$ ppm의 carbon signal과 long range coupling하고 있어 C-3에 glucose가 결합되어 있음을 알 수 있었다. Aromatic field의 HMBC spectrum을 보면 $\delta 3.93$ ppm의 methoxyl proton이 $\delta 148.3$ ppm의 carbon signal과 coupling하고 있어 methoxyl이 C-3'에 결합되어 있음을 확인할 수 있었다(Fig. 2).

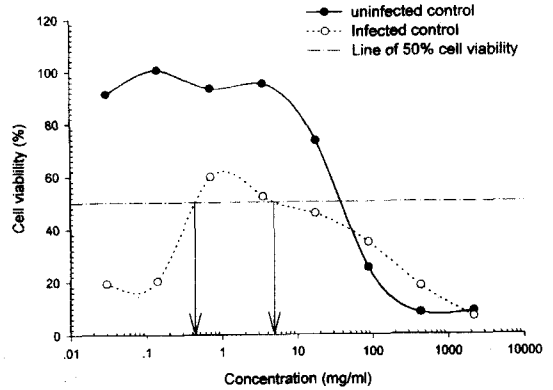


Fig. 3 — Quantitation of cell viability in the herbs of *Brassica rapa* treated culture of Vero cells.

이상의 기기분석 결과와 문헌^{17,18)}과의 비교로 compound I은 분자식 $\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{O}_{12}$ 이고 mp $215\sim 218^\circ\text{C}$ 인 isorhamnetin 3-O- β -D-glucopyranoside로 확인, 동정하였다.

결 론

본 연구는 항바이러스물질을 천연물로부터 개발하기 위한 HSV 1형에 대한 항바이러스 활성시험에서 강한 활성을 나타내는 무청(蕪菁)의 배당을 추출물에 대한 각종 column chromatography를 실시하여 항 HSV-1 활성물질인 compound I을 단리하고 IR, MS, ^1H -NMR, ^{13}C -NMR, ^1H - ^1H COSY, HMQC 및 HMBC의 spectral data를 이용하여 isorhamnetin 3-O- β -D-glucopyranoside로 동정하여 활성을 검색한 결과 $0.13\sim 0.41$ mg/ml 농도에서 활성을 나타냈다. HSV-1에 대한 compound I의 EC_{50} 는 0.42 mg/ml이고 CC_{50} 는 5.0 mg/ml였으며 $\text{CC}_{50}/\text{EC}_{50}$ 로 나타낸 선택지수(selectivity index)는 11.9로써 compound I은 항바이러스 효과가 있었다(Fig. 3). 무청에서 분리된 isorhamnetin 3-O- β -D-glucopyranoside가 HSV-1에 대해 활성이 있다는 것이 본 연구에서 처음으로 밝혀졌다.

감사의 말씀

본 연구는 보건복지부의 지원으로 수행된 보건의료기술연구개발사업 (HMP-96-M-5-0044)의 연구결과의 일부이며 이에 감사드립니다.

문헌

- 1) 新編中藥大辭典, 新文豐出版公司, 中國 p. 2555-2556 (1971).
- 2) 赤松金芳 : 新訂和漢藥, 竹內勝之, 東京 p. 398 (1980).
- 3) 牧野富太郎 : 牧野新日本植物圖鑑, 北隆館, 東京 p. 206 (1985).
- 4) 宋株澤, 鄭炫培, 金炳友, 秦熙成, 金桂英 : 韓國植物寶典, 동신출판사, 서울 p. 177 (1990).
- 5) Vlietinck, A. J. and Vanden Berghe, D. A. : Exploring traditional medicine as source of new antiviral and immunostimulatory drugs. 漢藥和學會誌, **9**, 71 (1992).
- 6) Corthout, J., Pieters, L. A., Claeys, M., Vanden Berghe, D. A. and Vlietinck, A. J. : Antiviral ellagitannins from *Spondias mombin*. *Phytochemistry*, **30**, 1129 (1991).
- 7) Corthout, J., Pieters, L., Claeys, M., Vanden Berghe, D. and Vlietinck, A. : Antiviral caffeoyl esters from *Spondias mombin*. *Phytochemistry*, **31**, 1979 (1992).
- 8) Hirabayashi, K., Iwata, S., Matsumoto, H., Mori, T., Shibata, S., Baba, M., Ito, M., Shigeta, S., Nakashima, H. and Yamamoto, N. : Antiviral activities of glycyrrhizin and its modified compounds against Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) and Herpes simplex virus type 1 (HSV-1). *Chem. Pharm. Bull.*, **39**, 112 (1991).
- 9) Xu, H. X., Kadota, S., Kurokawa, M., Shiraki, K., Matsumoto, T. and Namba T. : Isolation and structure of woodorien, a new glucoside having antiviral activity, from *Woodwardia orientalis*. *Chem. Pharm. Bull.*, **41**, 1803 (1993).
- 10) Kurokawa, M., Nagasaka, K., Hirabayashi, T., Uyama, S., Sato, H., Kageyama, T., Kadota, S., Ohyama, H., Hozumi, T. and Namba, T. : Efficacy of traditional herbal medicines in combination with acyclovir against herpes simplex virus type I infection *in vitro* and *in vivo*. *Antiviral Research*, **27**, 19 (1995).
- 11) Kang, B. J., Yang, K. S., Kim, M. H. and Park, K. J. : Screening of antiviral activities of Korean medicinal herbs and traditional prescriptions against Herpes simplex virus type-1. *J. Korean Soc. Virology*, **27**, 2 (1997)
- 12) Alley, M. C., Scudiero, D. A., Monks, A., Hursey, M. L., Czerwinski, M. J., Fine, D. L., Abbott B. J., Mayo, J. G., Shoemaker, R. H. and Boyd, M. R. : Feasibility of drug Screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. *Cancer Res.* **48**, 589 (1988).
- 13) Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, D. A., Monks, A., McMahan, J., Vistica, A. D., Warren, J. T., Bosesch, H., Kenny, S. and Boyd, M. R. : New colorimetric cytotoxic assay for Anti-cancer Drug Screening. *J. Natl. Cancer Inst.* **82**, 1107 (1990).
- 14) Markham, K. R. and Chari, V. M. : *The Flavonoids: Advances in Research*, Chapman & Hall, London, p. 19 (1982).
- 15) Markham, K. R. : *Techniques of Flavonoid Identification*, Academic Press, London (1982).
- 16) Arisawa, M., Fujita, A., Hayashi, T., Hayashi, K., Ochiai, H. and Morita, N. : Cytotoxic and antiherpetic activity of phloroglucinol derivatives from *Mallotus japonicus* (Euphorbiaceae). *Chem. Pharm. Bull.* **38**, 1624 (1990).
- 17) Kang, S. S., Choi, J. S., Woo, W. S. and Chi, H. J. : Isorhamnetin glycosides from the leaves of *Typha latifolia*. *Kor. J. Pharmacog.* **14**, 137 (1983).
- 18) Marco, J. A., Barbera, J. A., Strack, D. and Wray, V. : Two isorhamnetin triglycosides from *Anthyllis sericea*. *Phytochemistry* **28**, 1513 (1989).