

藏木香根的抗菌活性成分研究

李晓强, 李智勤, 孟宪华, 郝忠言

甘肃奇正藏药有限公司, 甘肃 兰州 730000

摘要: 目的 对藏木香 *Inula racemosa* 根中的抗菌活性成分进行研究。方法 应用多种柱色谱技术对藏木香根进行分离纯化, 并通过波谱和化学方法鉴定化合物结构。对化合物进行体外抗大肠杆菌 *Escherichia coli* 和金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* 活性测试。结果 从藏木香根乙醇提取物的醋酸乙酯萃取部分分离得到 12 个化合物, 分别鉴定为去氢木香内酯 (1)、1 α , 5 α H-13-羟基愈创木-4(15), 10(14), 7(11)-三烯-6 α , 12-内酯 (2)、1 α , 5 α , 7 α , 11 α H-愈创木-4(15), 10(14)-二烯-6 α , 12-内酯 (3)、1 α , 5 α , 7 α H-3 β -羟基愈创木-4(15), 10(14), 11(13)-三烯-6 α , 12-内酯 (4)、1 α , 5 α , 7 α , 11 β H-3 β -羟基愈创木-4(15), 10(14)-二烯-6 α , 12-内酯 (5)、吉马烷-1(10), 4(5), 11(13)-三烯-6 α , 12-内酯 (6)、(E)-3-(4-羟基苯基) 丙烯酸 (7)、7-羟基香豆素 (8)、香草醛 (9)、3 β -羟基-5 α , 8 α -二氧环麦角甾-6, 22-二烯 (10)、 β -谷甾醇 (11)、1 α , 5 α H-2 α , 6 α -二-(4-羟基-3, 5-二甲氧基苯基)-3, 7-二氧双环 [3.3.0] 辛烷 (12)。结论 化合物 2~5、10、12 为首次从该植物中分离得到, 对分得的 12 个化合物进行抗菌实验, 其中化合物 1、4 及 6 显示较强的抗菌活性。

关键词: 藏木香; 去氢木香内酯; 1 α , 5 α H-13-羟基愈创木-4(15), 10(14), 7(11)-三烯-6 α , 12-内酯; 吉马烷-1(10), 4(5), 11(13)-三烯-6 α , 12-内酯; 7-羟基香豆素; 抗菌活性

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2012)12-2342-04

Study on antibacterial components in roots of *Inula racemosa*

LI Xiao-qiang, LI Zhi-qin, MENG Xian-hua, HAO Zhong-yan

Gansu Cheezheng Tibetan Medicine Co., Ltd., Lanzhou 730000, China

Abstract: Objective To study the antibacterial components in the roots of *Inula racemosa*. **Methods** The compounds were isolated by various chromatographic methods and elucidated on the basis of spectroscopic data and their antibacterial activities for *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* were tested. **Results** Twelve components were obtained from EtOAc fraction in the ethanol extract from the roots of *I. racemosa* and identified as dehydrocostus lactone (1), 1 α , 5 α H-13-hydroxyguaia-4(15), 10(14), 7(11)-trien-6 α , 12-olide (2), 1 α , 5 α , 7 α , 11H-guaia-4(15), 10(14)-dien-6 α , 12-olide (3), 1 α , 5 α , 7 α H-3 β -hydroxyguaia-4(15), 10(14), 11(13)-trien-6 α , 12-olide (4), 1 α , 5 α , 7 α , 11 β H-3 β -hydroxyguaia-4(15), 10(14)-dien-6 α , 12-olide (5), germacra-1(10), 4(5), 11(13)-trien-6 α , 12-olide (6), (E)-3-(4-hydroxyphenyl)-propenoic acid (7), 7-hydroxycoumarin (8), vanillin (9), 3 β -hydroxy-5 α , 8 α -epidioxy ergosta-6, 22-dien (10), β -sitosterol (11), and 1 α , 5 α H-2 α , 6 α -bis-(4-hydroxy-3, 5-dihydroxyben)-3, 7-dioxabicyclo[3.3.0]octane (12). **Conclusion** Compounds 2—5, 10, and 12 are reported to be obtained from the roots of *I. racemosa* for the first time. Antibacterial activity results of all the compounds show that compounds 1, 4, and 6 have strong antibacterial activity.

Key words: *Inula racemosa* Hook. f.; dehydrocostus lactone; 1 α , 5 α H-13-hydroxyguaia-4(15), 10(14), 7(11)-trien-6 α , 12-olide; germacra-1(10), 4(5), 11(13)-trien-6 α , 12-olide; 7-hydroxycoumarin; antibacterial activity

藏木香 *Inula racemosa* Hook. f. 又名青木香、祁木香, 藏文名“玛奴”, 为多年生菊科草本植物, 以其根茎入药。藏木香味辛、苦, 性温, 有健脾和胃、调气解郁止痛、安胎等功效。主要用于慢性胃炎、胃肠功能紊乱、肋间神经痛、胸壁挫伤和岔气作痛、胎动不安等症。此外, 藏木香还用于清血热、祛风; 治疗风热症、血热症^[1]。文献调研发现对藏

木香的化学成分和生物活性的研究报道较少^[2]。在前期对天然抗菌化合物的研究中发现, 藏木香根乙醇提取物的醋酸乙酯萃取部分对大肠杆菌 *Escherichia coli* (Migula) Castellani et Chalmers 和金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* Rosenbach 有较强的抑制作用。为进一步阐明藏木香的活性成分, 本实验对藏木香的根进行了研究, 从中分离得

收稿日期: 2012-09-18

作者简介: 李晓强 (1977—), 男, 工程师, 从事中药研发、中药制剂的研究。Tel: (0931)8558426 E-mail: lixq@qzh.cn

到 12 个化合物, 分别鉴定为去氢木香内酯 (dehydrocostus lactone, **1**)、**1a**, **5aH**-13-羟基愈创木-4(15), 10(14), 7(11)-三烯-6 α , 12-内酯 [**1a**, **5aH**-13-hydroxyguaia-4(15), 10(14), 7(11)-trien-6 α , 12-olide, **2**]、**1a**, **5a**, **7a**, **11aH**-愈创木-4(15), 10(14)-二烯-6 α , 12-内酯 [**1a**, **5a**, **7a**, **11H**-guaia-4(15), 10(14)-dien-6 α , 12-olide, **3**]、**1a**, **5a**, **7aH**-3 β -羟基愈创木-4(15), 10(14), 11(13)-三烯-6 α , 12-内酯 [**1a**, **5a**, **7aH**-3 β -hydroxyguaia-4(15), 10(14), 11(13)-trien-6 α , 12-olide, **4**]、**1a**, **5a**, **7a**, **11 β H**-3 β -羟基愈创木-4(15), 10(14)-二烯-6 α , 12-内酯 [**1a**, **5a**, **7a**, **11 β H**-3 β -hydroxyguaia-4(15), 10(14)-dien-6 α , 12-olide, **5**]、吉马烷-1(10), 4(5), 11(13)-三烯-6 α , 12-内酯 [germacra-1(10), 4(5), 11(13)-trien-6 α , 12-olide, **6**]、(*E*)-3-(4-羟基苯基) 丙烯酸 [(*E*)-3-(4-hydroxyphenyl)-propenoic acid, **7**]、7-羟基香豆素 (7-hydroxycoumarin, **8**)、香草醛 (vanillin, **9**)、3 β -羟基-5 α , 8 α -二氧环麦角甾-6, 22-二烯 (3 β -hydroxy-5 α , 8 α -epidioxy ergosta-6, 22-dien, **10**)、 β -谷甾醇 (β -sitosterol, **11**)、**1a**, **5aH**-2 α , 6 α -二-(4-羟基-3, 5-二甲氧基苯基)-3, 7-二氧双环 [3.3.0]-辛烷 (**1a**, **5aH**-2 α , 6 α -bis-(4-hydroxy-3, 5-dihydroxyben)-3, 7-dioxabicyclo [3.3.0]-octane, **12**)。其中化合物 **2**~**5**、**10**、**12** 为首次从该植物中分得。抗菌活性测试结果表明化合物 **1**、**4** 及 **6** 显示较强的抗菌活性。

1 仪器与材料

X—4 数字显微熔点仪; Agilent1100 LC /MSD Trap SL 型质谱仪 (Agilent 公司); Varian Mercury plus-400 (400 MHz) 和 Varian Mercury-300BB (300 MHz) 型超导核磁共振仪 (Varian 公司); 柱色谱硅胶 (200~300 目) 以及薄层色谱硅胶 GF₂₅₄ 均为青岛海洋化工厂出品; Sephadex LH-20 (Pharmacia 公司)。

藏木香 *Inula racemosa* Hook. f. 根于 2010 年 8 月采自甘南夏河, 标本 (20100805) 由兰州大学生命科学学院张国梁教授鉴定。大肠杆菌 *Escherichia coli* (Migula) Castellani et Chalmers 和金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* Rosenbach 由华南农业大学生命科学院提供。

2 提取与分离

干燥的藏木香根 (3 kg) 粉碎后, 用 4 L 甲醇室温浸泡提取 3 次, 每次 7 d, 减压浓缩得总浸膏 300 g, 将浸膏悬浮于 1 L 蒸馏水 (50 °C), 依次用石油醚、醋酸乙酯、正丁醇萃取。醋酸乙酯部分 (85

g) 经硅胶柱色谱以石油醚-丙酮 (100:1、50:1、30:1、10:1、5:1) 梯度洗脱, 得到 5 个组分。其中组分 1 经反复硅胶柱色谱分离, 重结晶纯化, 得到化合物 **1** (50 mg) 和 **6** (10 mg)。组分 2 经硅胶柱色谱、凝胶柱色谱反复分离得到化合物 **3** (10 mg) 和 **12** (6 mg)。组分 3 经硅胶柱色谱、凝胶柱色谱反复分离得到化合物 **4** (8 mg)、**5** (10 mg)、**8** (6 mg) 和 **11** (5 mg)。组分 4 经硅胶柱色谱、凝胶柱色谱反复分离得到化合物 **2** (11 mg)、**7** (7 mg)、**9** (8 mg) 和 **10** (4 mg)。

3 结构鉴定

化合物 **1**: 无色块状晶体, mp 103~104 °C; ESI-MS *m/z*: 231 [M+H]⁺。¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ : 6.13 (1H, d, *J* = 3.3 Hz, H-13a), 5.42 (1H, d, *J* = 3.3 Hz, H-13b), 5.01 (1H, brs, H-15a), 5.20 (1H, brs, H-15b), 4.74 (1H, brs, H-14a), 4.86 (1H, brs, H-14b), 3.92 (1H, t, *J* = 9.9 Hz, H-6), 2.92 (1H, m, H-5), 2.91 (1H, m, H-1); ¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃) δ : 44.8 (C-1), 30.2 (C-2), 36.4 (C-3), 149.1 (C-4), 51.7 (C-5), 85.2 (C-6), 47.4 (C-7), 30.6 (C-8), 32.5 (C-9), 139.6 (C-10), 151.1 (C-11), 170.0 (C-12), 120.1 (C-13), 109.4 (C-14), 112.4 (C-15)。以上数据与文献报道一致^[3], 故鉴定化合物 **1** 为去氢木香内酯。

化合物 **2**: 无色油状物, ESI-MS *m/z*: 269 [M+Na]⁺。¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ : 5.17 (1H, brs, H-15a), 5.15 (1H, brs, H-15b), 4.98 (1H, brs, H-14a), 4.94 (1H, brs, H-14b), 4.69 (1H, d, *J* = 11.2 Hz, H-6), 4.37 (2H, brs, H-13); ¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃) δ : 48.7 (C-1), 29.6 (C-2), 30.6 (C-3), 149.1 (C-4), 51.1 (C-5), 81.2 (C-6), 165.5 (C-7), 28.7 (C-8), 30.5 (C-9), 148.9 (C-10), 125.3 (C-11), 172.2 (C-12), 54.8 (C-13), 113.5 (C-14), 109.7 (C-15)。以上数据与文献报道一致^[4], 故鉴定化合物 **2** 为 **1a**, **5aH**-13-羟基愈创木-4(15), 10(14), 7(11)-三烯-6 α , 12-内酯。

化合物 **3**: 无色晶体, mp 106~107 °C; ESI-MS *m/z*: 233 [M+H]⁺。¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ : 5.18 (1H, brs, H-15a), 5.02 (1H, brs, H-15b), 4.85 (1H, brs, H-14a), 4.76 (1H, brs, H-14b), 4.01 (1H, t, *J* = 9.3 Hz, H-6), 2.86 (1H, m, H-5), 2.66 (1H, m, H-1), 1.17 (3H, d, *J* = 8.1 Hz, H-13); ¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃) δ : 44.9 (C-1), 30.2 (C-2), 36.3 (C-3), 149.1 (C-4), 51.8 (C-5), 84.5 (C-6), 41.6 (C-7), 30.5 (C-8), 32.3 (C-9), 139.6 (C-10), 54.5 (C-11), 179.2

(C-12), 17.1 (C-13), 109.4 (C-14), 112.4 (C-15)。以上数据与文献报道一致^[5], 故鉴定化合物 **3** 为 1 α , 5 α , 7 α , 11 α -愈创木-4(15), 10(14)-二烯-6 α , 12-内酯。

化合物 **4**: 无色油状物, ESI-MS m/z : 269 [M+Na]⁺。¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ : 6.20 (1H, d, J = 3.3 Hz, H-13a), 5.48 (1H, d, J = 3.3 Hz, H-13b), 5.44 (1H, brs, H-15a), 5.33 (1H, brs, H-15b), 5.01 (1H, brs, H-14a), 4.94 (1H, brs, H-14b), 4.56 (1H, dd, J = 7.8, 6.9 Hz, H-3), 4.09 (1H, t, J = 9.3 Hz, H-6), 2.92 (1H, m, H-5), 2.87 (1H, m, H-1), 2.82 (1H, m, H-7); ¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃) δ : 44.1 (C-1), 39.1 (C-2), 73.6 (C-3), 153.1 (C-4), 49.8 (C-5), 83.9 (C-6), 45.7 (C-7), 30.5 (C-8), 34.1 (C-9), 147.9 (C-10), 139.7 (C-11), 170.2 (C-12), 120.2 (C-13), 114.5 (C-14), 111.2 (C-15)。以上数据与文献报道一致^[6], 故鉴定化合物 **4** 为 1 α , 5 α , 7 α -H-3 β -羟基愈创木-4(15), 10(14), 11(13)-三烯-6 α , 12-内酯。

化合物 **5**: 无色油状物, ESI-MS m/z : 271 [M+Na]⁺。¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ : 5.48 (1H, brs, H-15a), 5.35 (1H, brs, H-15b), 4.94 (1H, brs, H-14a), 4.91 (1H, brs, H-14b), 4.55 (1H, dd, J = 7.8, 6.9 Hz, H-3), 4.01 (1H, t, J = 9.9 Hz, H-6), 2.88 (1H, m, H-5), 2.77 (1H, m, H-1), 2.83 (1H, m, H-7), 1.22 (3H, d, J = 6.9 Hz, H-13); ¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃) δ : 43.4 (C-1), 38.6 (C-2), 73.5 (C-3), 153.1 (C-4), 50.8 (C-5), 83.7 (C-6), 49.5 (C-7), 32.3 (C-8), 35.8 (C-9), 148.8 (C-10), 42.1 (C-11), 178.6 (C-12), 13.2 (C-13), 113.5 (C-14), 110.9 (C-15)。以上数据与文献报道一致^[7], 故鉴定化合物 **5** 为 1 α , 5 α , 7 α , 11 β -H-3 β -羟基愈创木-4(15), 10(14)-二烯-6 α , 12-内酯。

化合物 **6**: 无色柱状晶体, mp 113~114 °C。¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ : 6.20 (1H, d, J = 3.3 Hz, H-13a), 5.48 (1H, d, J = 3.3 Hz, H-13b), 4.78 (1H, dd, J = 11.4, 4.5 Hz, H-1), 4.69 (1H, d, J = 9.9 Hz, H-5), 4.52 (1H, dd, J = 9.9, 8.7 Hz, H-6), 1.64 (3H, s, H-15), 1.36 (3H, s, H-14); ¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃) δ : 126.7 (C-1), 27.9 (C-2), 40.9 (C-3), 141.3 (C-4), 127.2 (C-5), 81.6 (C-6), 50.3 (C-7), 26.1 (C-8), 39.4 (C-9), 136.8 (C-10), 139.9 (C-11), 170.2 (C-12), 119.4 (C-13), 15.8 (C-14), 17.1 (C-15)。以上数据与文献报道一致^[8], 故鉴定化合物 **6** 为吉马烷-1(10), 4(5), 11(13)-三烯-6 α , 12-内酯。

化合物 **7**: 无色油状物。¹H-NMR (300 MHz,

CDCl₃) δ : 7.56 (2H, d, J = 8.0 Hz, H-2, 6), 6.94 (2H, d, J = 8.3 Hz, H-3, 5), 7.73 (1H, d, J = 15.4 Hz, H-7), 6.40 (1H, d, J = 15.4 Hz, H-8); ¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃) δ : 126.1 (C-1), 130.2 (C-2, 6), 115.8 (C-3, 5), 145.5 (C-4), 139.3 (C-7), 115.1 (C-8), 160.4 (C-9)。以上数据与文献报道一致^[9], 故鉴定化合物 **7** 为 (*E*)-3-(4-羟基苯基) 丙烯酸。

化合物 **8**: 无色油状物。¹H-NMR (300 MHz, CD₃COCD₃) δ : 7.88 (1H, d, J = 9.6 Hz, H-4), 7.52 (1H, d, J = 8.1 Hz, H-5), 6.84 (1H, dd, J = 8.1, 2.1 Hz, H-6), 6.75 (1H, d, J = 2.1 Hz, H-8), 6.17 (1H, d, J = 9.6 Hz, H-1); ¹³C-NMR (75 MHz, CD₃COCD₃) δ : 161.9 (C-2), 112.8 (C-3), 144.6 (C-4), 130.4 (C-5), 113.7 (C-6), 157.0 (C-7), 103.3 (C-8), 112.9 (C-9)。以上数据与文献报道一致^[10], 故鉴定化合物 **8** 为 7-羟基香豆素。

化合物 **9**: 无色油状物。¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ : 7.44 (1H, dd, J = 8.0, 1.6 Hz, H-5), 7.42 (1H, d, J = 1.6 Hz, H-2), 7.05 (1H, d, J = 8.0 Hz, H-4), 3.97 (3H, brs, -OCH₃), 9.79 (1H, s, -CHO)。以上数据与文献报道一致^[11], 故鉴定化合物 **9** 为香草醛。

化合物 **10**: 无色油状物。¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ : 6.50 (1H, d, J = 8.5 Hz, H-7), 6.24 (1H, d, J = 8.5 Hz, H-6), 5.18 (2H, m, H-22, 23), 3.97 (1H, m, H-3), 1.00 (3H, d, J = 6.6 Hz, H-21), 0.91 (3H, d, J = 6.7 Hz, H-28), 0.88 (3H, s, H-19), 0.83 (3H, d, J = 6.8 Hz, H-27), 0.82 (3H, d, J = 6.7 Hz, H-26), 0.80 (3H, s, H-18)。以上数据与文献报道一致^[12], 故鉴定化合物 **10** 为 3 β -羟基-5 α , 8 α -二氧环麦角甾-6, 22-二烯。

化合物 **11**: 无色片状晶体, mp 140~142 °C; EI-MS m/z : 414 [M]⁺ (12), 399 (19), 381 (13), 27 (53)。以上数据与文献报道一致^[12], TLC 检测发现该化合物与 β -谷甾醇对照品的 R_f 值相同, 且两者混合熔点不下降。故鉴定化合物 **11** 为 β -谷甾醇。

化合物 **12**: 无色油状物。¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ : 6.58 (4H, brs, H-1', 5', 1'', 5''), 5.50 (2H, brs, -OH), 4.73 (2H, d, J = 3.6 Hz, H-2, 6), 4.28 (2H, dd, J = 9.0, 3.6 Hz, H-4a, 8a), 3.89 (2H, brd, J = 9.0 Hz, H-4b, 8b), 3.90 (12H, s, 4 $\times$ -OCH₃), 3.09 (2H, m, H-1, 5)。以上数据与文献报道一致^[13], 故鉴定化合物 **12** 为 1 α , 5 α -H-2 α , 6 α -二-(4-羟基-3, 5-二甲氧基苯基)-3, 7-二氧双环 [3.3.0]-辛烷。

4 抗菌活性考察

采用琼脂平板法测定化合物 **1**~**12** 对大肠杆菌

和金黄色葡萄球菌的抑制活性,测试样品用 DMSO 溶解,用 2 倍稀释法将其稀释为 0.1~500 $\mu\text{mol/L}$ 的溶液。无菌条件下,将 1 mL 菌悬液加入约 15 mL 融化并冷却至 50~60 $^{\circ}\text{C}$ 的 YPDA 固体培养基中,充分摇匀后倒平板,待琼胶凝固后,用灭菌的镊子将牛津杯 (Oxford cup, 0.8 cm $\times$ 1.0 cm) 轻放于凝固的平板上,使间距相等。用移液枪吸取上述不同浓度的溶液 200 μL ,逐个加入牛津杯中。将加样完毕的培养皿置于 28 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中培养约 12 h 后观察结果。活性测试结果表明化合物 **1**、**4** 和 **6** 有较好的抑菌活性,其 IC_{50} 值分别为 4.8、3.2 和 3.2 $\mu\text{g/mL}$ 。

参考文献

- [1] 江苏新医学院. 中药大辞典 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1977.
- [2] Zhang T, Chen R Y. Study on chemical constituents in roots of *Inula racemosa* [J]. *Chin Pharm J*, 2011, 46: 1159-1162.
- [3] Chhabra B R, Gupta Jain S M, Kalsi P S. Sesquiterpene lactones from *Saussurea lappa* [J]. *Phytochemistry*, 1998, 49: 801-804.
- [4] Fronczek F R, Vargas D, Fischer N H. Structure of the guaianolide dehydrocostus lactone [J]. *J Nat Prod*, 1984, 47: 1036-1039.
- [5] Hikino H, Meguro K, Kusano G, *et al.* Structure of mokko lactone and dehydrocostus lactone [J]. *Chem Pharm Bull*, 1964, 12: 632-634.
- [6] Spring O, Buschmann H. Sesquiterpene lactone chemistry of *Zaluzania grayana* from on-line LC-NMR measurements [J]. *Phytochemistry*, 1995, 39: 609-612.
- [7] Tan R X, Jakapovic J, Bohlmann F. Sesquiterpene lactones from *Vladimiria souliei* [J]. *Phytochemistry*, 1990, 29: 1209-1212.
- [8] 于德全, 杨峻山. 分析化学手册 (核磁共振波谱分析) [M]. 北京: 化学工业出版社, 2002.
- [9] Nielsen B E. The structure of two new coumarins from the roots of *Lomatium columbianum* [J]. *Phytochemistry*, 1976, 15: 1049-1051.
- [10] Cussans N J, Hucker T N. Carbon- ^{13}C NMR spectroscopy of heterocyclic compounds-IV [J]. *Tetrahedron*, 1975, 31: 2719-2731.
- [11] Tsutomu W, Mie I, Toshio M, *et al.* Sesquiterpene glycosides from *Ixeris debilis* and *Ixeris repens* [J]. *Phytochemistry*, 1990, 29: 3217-3219.
- [12] 严小红, 宋国强, 周秀红, 等. 一种南海海绵 (*Acanthella* sp.) 的化学成分研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2003, 15: 199-202.
- [13] Barbara V, Otto S, Hildebert W. Synthesis of biologically active tetrahydro-furofuranlignan-(syringin, pinorensin)-mono- and bis-glucosides [J]. *Phytochemistry*, 1991, 30: 3087-3089.