

苦豆子多糖 SAP 的结构表征及其对 CT26 抗肿瘤活性研究

陈冠¹, 赵振宇², 傅予¹, 张桂贤¹, 刘庆焕¹, 陶遵威^{1*}

1. 天津市医药科学研究所, 天津 300020

2. 天津市中医药研究院附属医院, 天津 300120

摘要: **目的** 研究苦豆子多糖 SAP 的一级结构及其抗肿瘤活性。**方法** 采用高效凝胶渗透色谱法、红外光谱、GC-MS 结合 NMR 法解析 SAP 的结构; 考察 SAP 对 CT26 荷瘤小鼠的抗肿瘤活性。**结果** SAP 为半乳甘露聚糖, 其相对分子质量为 9.6×10^5 , 以 1,4- β -D-Man 为主链, 在其某些 C-6 的位置上连接 1,6- α -D-Gal 片段, 末端为半乳糖。体内抗肿瘤实验结果表明, SAP 高、中、低剂量组对 CT26 荷瘤小鼠肿瘤生长有抑制作用, 且呈剂量依赖关系, 对 CT26 荷瘤小鼠的抑瘤率可达 44.03%。**结论** SAP 的结构确定为其构效关系研究奠定理论基础, 该多糖有望进一步开发成为高效低毒的抗结肠癌新药。

关键词: 苦豆子多糖; 结构表征; 结肠癌; 抗肿瘤; CT26 荷瘤小鼠

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2017)06-1103-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.06.009

Structural characterization of *Sophora alopecuroides* polysaccharides and study on its antitumor activity of CT26

CHEN Guan¹, ZHAO Zhen-yu², FU Yu¹, ZHANG Gui-xian¹, LIU Qing-huan¹, TAO Zun-wei¹

1. Tianjin Institute of Medical Sciences, Tianjin 300020, China

2. Affiliated Hospital of Tianjin Academy of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300120, China

Abstract: Objective To study the structure of *Sophora alopecuroides* polysaccharides (SAP) and its antitumor activity on CT26 transplanted tumor in mice. **Methods** The structure was characterized by high-performance gel permeation chromatography (HPGPC), gas chromatography-mass spectrometer (GC-MS), infrared spectroscopy (IR), and nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR). And then the anticancer activity of CT26-bearing mice was investigated *in vivo*. **Results** The results showed that SAP was consisted of D-mannopyranose and D-galactopyranose residues. The main chain of the galactomannan comprises β -(1,4)-linked D-mannopyranose residues, with branches of galactose, linked to the carbohydrate core through α -D-Gal (1,6) linkage. SAP could inhibit the tumor proliferation of CT26-bearing mice in a dose-dependent manner with inhibitory rate of 44.03% at high dose. **Conclusion** Structure determination of SAP provides the theoretical basis for structure-activity relationship study. And it is expected to be further developed as a new antitumor drug with high efficiency and low toxicity.

Key words: *Sophora alopecuroides* L. polysaccharides; structural characterization; colon cancer; antitumor activity; CT26-bearing mice

多糖几乎存在于所有生物中, 与维持生物机能密切相关。由于糖链携带着生物信息, 在细胞表面的分子识别过程中起着决定性作用, 因此 Hirabayashi 提出“类似于基因密码, 可能也存在多糖密码”的论点^[1]。多糖作为抗肿瘤、抗炎、降血糖和调血脂等药物已经应用于临床, 其最大特点是毒副作用小, 能改善病人的免疫力, 延长生存期,

提高生存质量, 因此, 寻找高活性的多糖仍然是多糖研究的一大重点。

苦豆子 *Sophora alopecuroides* L. 为豆科 (Leguminosae) 槐属 *Sophora* Linn. 多年生的灌木, 是我国西部几省重要的药用植物资源和自然植被组成部分, 蕴藏量大, 种群优势突出。苦豆子中含有丰富的生物碱类成分, 目前对于苦豆子的研究主要

收稿日期: 2016-06-20

基金项目: 天津市科委抗癌重大科技专项 (12ZCDSY19200); 天津市卫生局科技基金项目 (2012KY30)

作者简介: 陈冠, 女, 助理研究员, 主要从事天然产物研究与开发工作。Tel: 13672009387 E-mail: guanchenren@yahoo.com

*通信作者 陶遵威, 男, 研究员, 主要从事化学药物的合成研究。Tel: (022)27236182 E-mail: taozunwei@126.com

集中在生物碱方面,其药理活性包括抗炎、抗病毒、抗肿瘤、增强和调节免疫功能等^[2-3]。而对苦豆子多糖(SAP)及其抗肿瘤作用的研究较少,为了开发和合理利用这种丰富资源,本课题组前期对SAP的提取分离、纯化工艺和抗氧化及抗凝血活性进行了研究^[4-7],为了阐明其发挥活性的物质基础,本实验采用光谱、色谱及核磁共振(NMR)等方法分析其一级结构,并采用小鼠结肠癌细胞CT26移植模型,对SAP体内抗肿瘤作用进行了研究,为进一步探讨其抗肿瘤机制及临床应用奠定基础,也为SAP的构效关系研究提供理论依据。

1 仪器与材料

Nicolet 6700 型傅里叶红外光谱仪(Thermo Electron 公司);Autopol II 旋光仪(Rudolph research Analytical 公司);Avance III 600M 核磁共振仪(Bruker 公司);QQQ7000 气相色谱-质谱联用仪(美国 Agilent 公司);DB-5 石英毛细管柱(30 m×0.25 mm, 0.25 μm);AE240 电子分析天平(梅特勒-托利多仪器有限公司)。

苦豆子多糖(质量分数大于 95%)为本实验室制备;碘甲烷、二甲基亚砜(DMSO)、三氟乙酸(TFA)、乙醚、吡啶、氢氧化钠、硼酸和甲苯均为分析纯,购于天津市化学试剂批发公司。D₂O 购于瑞鼎化学技术(上海)有限公司;右旋糖酐标准品(Sigama 公司);环磷酰胺粉针剂(CTX)购于江苏恒瑞医药股份有限公司,200 mg/支。

实验动物为 SPF 级 BALB/c 小鼠,雌雄各半,体质量 18~20 g,购于中国食品药品检定研究院实验动物资源中心,动物合格证号 SCXK(京)-2013-0017。实验用细胞株为小鼠结肠癌 CT26 细胞株,由天津市医药科学研究所瘤源室提供。

2 SAP 的结构表征

2.1 纯度及相对分子质量(M_w)测定

采用 GPC OHpak SB-804 色谱柱(300 mm×7.9 mm),RID-10A 示差检测器,以 0.05% NaN₃ 为流动相,体积流量为 0.8 mL/min,柱温 30 ℃。分别精密称取右旋糖酐标准品(M_w 1.4×10^6 、 6.7×10^5 、 1.3×10^5 、 8.4×10^4 、 4.1×10^4 、 2.1×10^4 、 7.1×10^3 、 4.6×10^3 、 2.5×10^3)配成 10.0 mg/mL 的标准品溶液,测得各色谱峰保留时间(t),以 t 为横坐标,lg M_w 为纵坐标绘制标准曲线,求得回归方程,根据待测样品的 t ,通过回归方程计算多糖样品的相对分子质量^[8]。

2.2 甲基化分析

称取纯 SAP 样品 40 mg,加 10 mL 无水 DMSO,通氮搅拌至完全溶解后,加入 5 mL DMSO-NaOH 液,室温搅拌 30 min,然后加入 1.5 mL 碘甲烷,并逐渐澄清,直至成为亮黄色,继续搅拌 60 min,加入 5 mL 蒸馏水终止反应,室温减压蒸馏,去尽过量碘甲烷,得糖浆状部分甲基化多糖反应物。反应产物透析后冷冻干燥,继续以上步骤反复 1~4 次,产物在红外光谱 3 300~3 600 cm⁻¹ 处无羟基吸收峰,证明为完全甲基化多糖产物^[9]。

GC-MS 条件:进样口 split-splitless,温度 250 ℃;DB-5 石英毛细管柱(30 m×0.25 mm, 0.25 μm),体积流量 1 mL/min;升温程序为 120 ℃保持 3 min,8 ℃/min 升至 250 ℃,保持 10 min;EI 源,电离电压 70 eV;检测器为 FID,温度 220 ℃。载气为 He;进样量 0.5 μL,分流比 30:1,扫描范围 m/z 20~600。待测样品干燥后,用 1 mL 三氯甲烷溶解,进行 GC-MS 分析。

2.3 SAP 的 IR 分析

将待测样品研磨均匀,取微量样品置于 IR 检测台上,在 4 000~800 cm⁻¹ 进行扫描,观察谱峰情况。

2.4 SAP 的 NMR 分析

称取 SAP 样品 50 mg,用 D₂O 溶解,加入 1 滴氘代丙酮作为内标,进行 NMR 分析。

3 SAP 对 CT26 荷瘤小鼠肿瘤抑制作用的初步研究

3.1 小鼠实体瘤模型的建立^[10]

在无菌条件下,取出小鼠腹腔内 CT26 实体瘤的腹水(已传代 7 d),用无菌生理盐水洗涤 2 次,调细胞浓度为 3×10^6 个/mL,接种在小鼠右前肢腋窝皮下,每只鼠 0.2 mL,约含活瘤细胞数 6×10^5 个。

3.2 动物分组及给药方法

接种肿瘤细胞后 24 h,将小鼠随机分为 5 组,每组 10 只,雌雄各半,空白对照组为 ig 蒸馏水 0.2 mL/10 g;阳性对照组为 ip 50 mg/kg;SAP 高、中、低剂量组为 ig 500、250、125 mg/kg,每天给药 1 次。

连续给药 27 d,第 28 天称质量并处死动物,剥离小鼠右腋下皮下组织,摘出肿瘤,称瘤质量,按下式计算抑瘤率。

$$\text{抑瘤率} = 1 - \frac{\text{实验组平均瘤质量}}{\text{对照组平均瘤质量}}$$

3.3 脾及胸腺指数

在小鼠给药后第 28 天,将小鼠称质量后处死,分离小鼠肿瘤、脾和胸腺,称质量,按下式计算脾指数与胸腺指数。

$$\text{脾(胸腺)指数} = \frac{\text{脾(胸腺)质量}}{\text{小鼠体质量}}$$

4 结果

4.1 SAP 的结构表征

4.1.1 高效凝胶渗透色谱 (HPGPC) 测定 SAP 的相对分子质量 结果 (图 1) 显示 SAP 为对称性良好的单一峰, 根据标准曲线 $\lg M_w = -0.006\,391\,t^3 + 2.179\,109\,1\,t^2 - 25.303\,768\,t + 105.654\,421$, $D = 0.063$, 得出其相对分子质量为 9.6×10^5 。

4.1.2 甲基化分析结果 由 GC-MS 结果 (图 2 和表 1) 得知, 甘露糖 (Man)-半乳糖 (Gal) 的比例约为 2:1, 与本课题组前期用液相色谱所测的糖基组成比例基本一致, 证明此方法完全适用于 SAP 的甲基化分析。SAP 中 Gal 具有非还原末端和 1,4- 两种连接方式, Man 具有 1,4- 及 1,4,6- 两种连接方式, 其中 Man 1,4- 为主要键型。结合红外光谱和 GC-MS 结果分析, 初步推断 SAP 为半乳甘露聚糖, Man 通过 1,4-糖苷键连接形成主链, 分支点在 Man 的 O-6 位上, Gal 通过 1,4-糖苷键形成侧链而构成多分枝的聚糖, Gal 为非还原末端。Man 和 Gal 的比例约为 2:1。

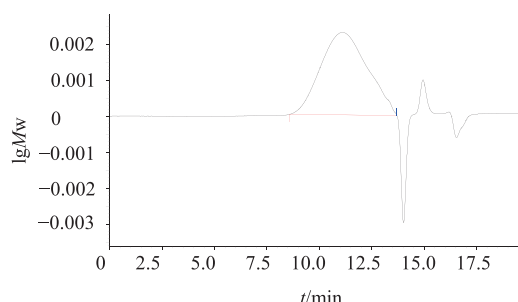


图 1 SAP 的 HPGPC 色谱图

Fig. 1 HPGPC profile of polysaccharide SAP

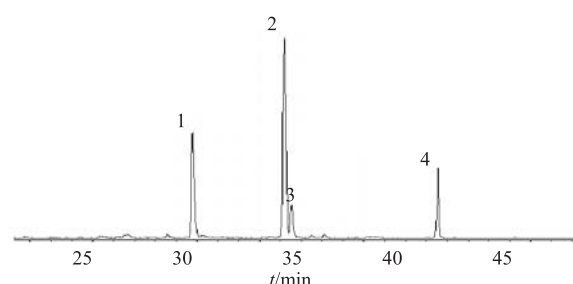


图 2 SAP 甲基化产物的 GC-MS 总离子流图

Fig. 2 GC-MS total ion chromatogram of SAP methylation

表 1 SAP 的甲基化分析结果

Table 1 Analysis of SAP methylation

峰号	t/min	摩尔比	连接方式	主要离子碎片
1	29.769	2.85	Gal (1→	43, 71, 87, 101, 117, 129, 145, 161, 204
2	34.167	5.32	Man (1→4	43, 71, 87, 101, 117, 129, 143, 173, 233
3	34.506	0.50	Gal (1→4	43, 71, 87, 99, 101, 117, 129, 161, 233
4	41.552	1.33	→4,6) Man (1→	43, 71, 85, 101, 117, 127, 161, 261

4.1.3 SAP 的 IR 分析 红外光谱显示, SAP 具有典型多糖的特征吸收: $3\,344\,\text{cm}^{-1}$ 较强的宽峰, 为糖分子中 O-H 的伸缩振动; $2\,925\,\text{cm}^{-1}$ 处为糖分子中 C-H 键的伸缩振动吸收峰; 但其没有 $1\,700\,\text{cm}^{-1}$ 左右糖醛酸特征吸收峰, 表明 SAP 不含糖醛酸。 $1\,624\,\text{cm}^{-1}$ 处的吸收峰可能是由于样品结合水引起的; 在 $1\,200 \sim 1\,000\,\text{cm}^{-1}$ 处强的吸收峰为 C-O 伸缩振动引起的, 并且推断糖环为吡喃型; 其在 $871\,\text{cm}^{-1}$ 处有 β -D-Man 的特征吸收峰^[6], 而 $811\,\text{cm}^{-1}$ 为 α -D-Gal 的特征吸收峰^[11-12]。

4.1.4 SAP 的 NMR 分析 ^{13}C -NMR (150 MHz, D_2O) δ : 101.5 (M-1), 100.0 (M-1'), 99.7 (G-1), 77.7 (M-4), 77.7 (M-4'), 77.0 (M-5), 75.4 (M-5'), 73.1 (M-3), 72.7 (G-4), 71.5 (G-3), 71.4 (G-5), 70.6 (G-2), 70.4 (M-2), 68.3 (M-6'), 62.5 (G-6), 61.5 (M-6)。由 ^{13}C -NMR 可以辨认异头碳类型, $\delta_{\text{C}}\,90 \sim 110$ 是异头碳的共振范围, 其中大于 $\delta_{\text{C}}\,100$ 的为 β 型异头碳, 小于 $\delta_{\text{C}}\,100$ 的是 α

型异头碳。在 $\delta_{\text{C}}\,90 \sim 110$ 有 3 个主要的信号, 分别为 $\delta_{\text{C}}\,101.46$ 、 100.00 和 99.71 , 说明 SAP 由含有 α 和 β 两种构型的单糖基组成, 此与 IR 谱结论一致。其中, $\delta_{\text{C}}\,101.46$ 和 100.00 归属为 β -D-Man 的异头碳, $\delta_{\text{C}}\,99.71$ 归属为 α -D-Gal 的异头碳。

$\delta_{\text{C}}\,60 \sim 70$ 为 C-6 位移范围, 为了更准确地区分 CH_2 的 C-6 信号, 结合 DEPT 谱分析, 可以明显看见 $\delta_{\text{C}}\,62.51$ 、 61.50 以及 68.34 的倒峰, 其中 $\delta_{\text{C}}\,62.51$ 、 61.50 分别归属为 α -D-Gal 和无支链 β -D-Man 的 C-6, $\delta_{\text{C}}\,68.34$ 为 C-6 发生 O 取代, 化学位移向低场位移, 故 $\delta_{\text{C}}\,68.34$ 应该为有支链的 β -D-Man^[13-14]。这与甲基化分析其具有 1,4,6-连接片段的结果吻合。

出现在 $\delta_{\text{C}}\,76 \sim 85$ 区域的化学位移, 表明 C-2、3、4 某个碳上发生了取代。 $\delta\,77.74$ 和 72.67 分别表示 β -D-Man 或者 α -D-Gal C-4 发生 O 取代, 这也验证了甲基化的分析结果, 即 SAP 具有 1,4- 连接片段。

通过甲基化后的 GC-MS 和 NMR, 并辅助 IR 分析, 初步推断 SAP 在其某些 C-6 的位置上连接 1,6- α -D-Gal 的片段, 末端为半乳糖, 此结构的半乳糖甘露聚糖为典型的“梳子 (comb)”结构, 见图 3^[14]。

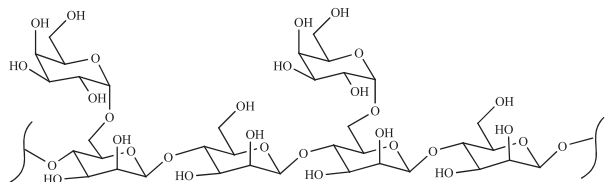
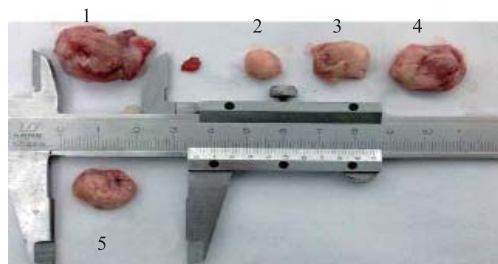


图 3 SAP 的结构单元

Fig. 3 Constraction unit of SAP

4.2 SAP 对移植性 CT26 小鼠肿瘤抑制作用的初步研究

4.2.1 SAP 对荷 CT26 小鼠的抑瘤作用 从瘤块的大体比较可以看出 (图 4), CTX 组瘤块最小, 给药组与空白对照组相比瘤块均有不同程度缩小, 中剂量和低剂量组大小基本一致, 这与其抑瘤率结果一致, 高剂量组瘤块较中、低剂量组要明显变小。通过称量瘤质量计算抑瘤率可得出, SAP 对小鼠结肠癌生长具有明显的抑制作用。其中 SAP 125、250、



1-空白 2-CTX 3-SAP 高剂量 4-SAP 中剂量 5-SAP 低剂量组

1-control 2-CTX 3-SAP high-dose 4-SAP mid-dose 5-SAP low-dose

图 4 不同组别瘤块比较

Fig. 4 Comparison on tumor size in different groups

500 mg/kg 剂量对结肠癌的抑制率分别为 3.17%、6.69%、40.03%, 结果见表 2。

4.2.2 SAP 对结肠癌小鼠脾指数、胸腺指数的影响 CTX 组脾指数和胸腺指数与空白对照组比较显著降低 ($P < 0.05$), SAP 低剂量 (125 mg/kg) 组与空白对照组比较无显著性差异 ($P > 0.05$), SAP 中、高剂量 (250、500 mg/kg) 组的脾指数和胸腺指数与空白对照组比较均显著增高 ($P < 0.05$ 、0.01)。结果见表 3。

表 2 SAP 对 CT26 荷瘤小鼠体质量及瘤质量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Effect of SAP on body weight and tumor weight of CT26-bearing mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	体质量增量/g	瘤质量/g	抑瘤率/%
空白对照	—	10.21 ± 1.11	3.09 ± 1.19	—
CTX	50	3.79 ± 0.30***	0.64 ± 0.54***	79.40
SAP	125	8.96 ± 1.04	3.00 ± 0.90	3.17
	250	9.75 ± 1.35	2.89 ± 1.51	6.69
	500	8.96 ± 1.97	1.73 ± 0.98*	44.03

与空白对照组比较: * $P < 0.05$ *** $P < 0.001$

* $P < 0.05$ *** $P < 0.001$ vs control group

表 3 SAP 对荷 CT26 小鼠脾指数、胸腺指数的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 3 Effect of SAP on spleen and thymus indexes of CT26-bearing mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	脾指数	胸腺指数
空白对照	—	10.43 ± 1.13	3.37 ± 0.50
CTX	50	9.11 ± 0.80*	2.74 ± 0.44*
SAP	125	11.76 ± 1.38	4.06 ± 0.78
	250	12.44 ± 1.29*	4.11 ± 0.41*
	500	12.26 ± 1.41*	4.55 ± 0.76**

与空白对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group

5 讨论

多糖的生物活性与其结构有着密切的关系, 构效关系的研究是寻找高活性多糖及深入研究多糖作用机制的基础, 本实验通过光谱、色谱及 NMR

分析, 初步确定 SAP 为半乳糖甘露聚糖 (GM)。GM 作为增稠剂、稳定剂和生物材料等已经广泛应用于食品、医药、造纸等行业^[16-17], 但其抑瘤作用尚无报道, 本课题组首次考察了苦豆子来源 GM 的抗肿瘤活性, 其对小鼠 CT26 瘤增殖具有良好的抑制作用。

体内抗肿瘤实验结果表明, SAP 高、中、低剂量组对小鼠 CT26 有抑瘤作用, 且呈剂量依赖关系; 与空白对照组相比, SAP 各剂量组在抑制小鼠肿瘤生长的同时对小鼠体质量无显著影响, 而 CTX 组则显著抑制了小鼠体质量的生长; SAP 各剂量组与 CTX 组相比显著提高小鼠免疫器官的质量。实验结果表明, SAP 在具有抗肿瘤作用的同时, 能显著提高小鼠的脾指数、胸腺指数, 具有一定的免疫调节作用。

本研究确定了 SAP 的一级结构,并考察了其抗肿瘤作用,这为将其开发成为抗肿瘤药物提供了理论依据,并且 SAP 在抗肿瘤的同时对免疫器官有保护作用,有望进一步开发为高效低毒的抗结肠癌新药。

参考文献

- [1] Hirabayashi K, Iwata S, Ito M, *et al.* Inhibitory effect of a lichen polysaccharide sulfate, GE-3-S, on the replication of human immunodeficiency virus (HIV) *in vitro* [J]. *Chem Pharm Bull*, 1989, 37(9): 2410-2412.
- [2] Chang A, Cai Z, Wang Z, *et al.* Extraction and isolation of alkaloids of *Sophora alopecuroides* and their anti-tumor effects in H₂₂ tumor-bearing mice [J]. *Afr J Tradit Complement Altern Med*, 2014, 11(2): 245-248.
- [3] Lu X, Lin B, Tang J G, *et al.* Study on the inhibitory effect of total alkaloids of *Sophora alopecuroides* on osteosarcoma cell growth [J]. *Afr J Tradit Compl Altern Med*, 2014, 11(1): 172-175.
- [4] 王文彤, 张 岩, 陶遵威. 正交试验优化苦豆子多糖的双氧水脱色工艺研究 [J]. *现代药物与临床*, 2014, 11(29): 1234-1237.
- [5] 郑 夺, 张 岩, 王文彤, 等. 响应面分析法优化苦豆子多糖的醇沉工艺 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2013, 19(16): 27-29.
- [6] 申林卉, 刘丽侠, 陈 冠, 等. 苦豆子多糖羧甲基化修饰及其抗氧化活性的研究 [J]. *天津中医药大学学报*, 2014, 33(3): 157-160.
- [7] 陈 冠, 程 琳, 张 岩, 等. 硫酸苦豆子多糖构象及抗凝血活性研究 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2015, 21(17): 32-35.
- [8] Hu H B, Liang H P, Wu Y. Isolation, purification and structural characterization of polysaccharide from *Acanthopanax brachypus* [J]. *Carbohydr Polym*, 2015, 127(20): 94-100.
- [9] Wu Y, Ai L Z, Wu J H, *et al.* Structural analysis of a pectic polysaccharide from boat-fruited sterculia seeds [J]. *Int J Biol Macromol*, 2013, 56(5): 79-82.
- [10] 张秀娟, 杨姗姗. 半枝莲多糖体内抗肿瘤及其免疫调节作用的实验研究 [J]. *亚太传统医药*, 2008, 4(2): 54-56.
- [11] Barker S A, Bourne E J, Stacey M, *et al.* Infra-red spectra of carbohydrates. Part I. Some derivatives of D-glucopyranose [J]. *J Chem Soc*, 1954, 1: 171-176.
- [12] 张 继. 沙蒿多糖结构及降血糖作用研究 [D]. 兰州: 西北师范大学, 2005.
- [13] Tamaki Y, Teruya T. The chemical structure of galactomannan isolated from seeds of *Delonix regia* [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2010, 74(5): 1110-1112.
- [14] Muschin T, Yoshida T. Structural analysis of galactomannans by NMR spectroscopy [J]. *Carbohydr Polym*, 2012, 87(3): 1893-1898.
- [15] Jiang J X, Jian H L, Cristhian C, *et al.* Structural and thermal characterization of galactomannans from genus *Gleditsia* seeds as potential food gum substitutes [J]. *J Sci Food Agric*, 2011, 91(4): 732-737.
- [16] 叶文斌, 樊 亮, 王都留, 等. 苦豆子多糖与大黄和黄连提取液复合涂膜对鸡蛋常温贮藏的影响 [J]. *甘肃农业大学学报*, 2014, 49(3): 141-145.
- [17] Flávia C A B, Sidinéa C F, Antônio S E, *et al.* Effects of tropical fruit pulps and partially hydrolysed galactomannan from *Caesalpinia pulcherrima* seeds on the dietary fibre content, probiotic viability, texture and sensory features of goat dairy beverages [J]. *LWT-Food Sci Technol*, 2014, 59(1): 196-203.