

## 효소 고정화 막을 이용한 Glucose의 정량

金任玉 · 郭庚度 · 河允權<sup>†</sup> · 權奉植<sup>\*\*</sup> · 徐戊龍\*

경상대학교 자연과학대학 화학과

<sup>†</sup>인하대학교 공과대학 화학공학과

<sup>\*\*</sup>충북대학교 사범대학 화학교육과

(1998. 11. 10 접수)

### Determination of Glucose Using Enzyme Immobilized Membrane

Im-Ok Kim, Kyeong-Do Kwak, Youn-Shick Ha<sup>†</sup>, Hyo Shik Kwon<sup>\*\*</sup>, and Moo-Lyong Seo\*

Department of Chemistry, Gyeongsang National University, Chinju 660-701, Korea

<sup>†</sup>Department of Chemical Engineering, Inha University, Inchun 660-701, Korea

<sup>\*\*</sup>Department of Chemical Edu., Chungbuk National University, Chinju 360-763, Korea

(Received November 10, 1998)

**요 약.** Immobilon-AV 친화성 막에 glucose oxidase[EC1.1.3.4](725units/ mL)를 고정하여 백금 전극에 부착시킨 전극을 사용하여 glucose를 전류법으로 정량하였다. 이때 glucose가 gluconic acid로 산화될 때 전류를 +0.8V vs. Ag/AgCl에서 측정하였다. 효소 고정화된 막을 부착시킨 전극의 감응 특성은 다음과 같다. 직선 감응범위는 0.2 mM에서 20 mM이었으며, 정량한계는  $10^{-3}$  mM이었다. 또한 감응 시간은 12초, 효소 고정화된 막의 최적 pH( $\text{CH}_3\text{COONa}/\text{CH}_3\text{COOH}$ )는 5.5, 그리고 수명은 27일 이었다. 그리고 다른 생리 활성물질의 방해는 없었다. 또한 고구마를 이용하여 AOAC 방법으로 정량한 glucose 측정값을 비교해 본 결과, 그 상대오차는 0.1%였다.

**ABSTRACT.** Enzyme electrodes for amperometric measurement of glucose were prepared by immobilization of glucose oxidase on an Immobilon-AV Affinity membrane and attachment to a Pt electrodes. The electrochemical oxidation of  $\text{H}_2\text{O}_2$  was monitored at +0.8V vs. Ag/AgCl. Response was linear from 0.2 mM to 20 mM. The detection limit was  $10^{-3}$  mM. Response time, the optimum pH and life time of enzyme immobilized membrane was 12 seconds, pH 5.5( $\text{CH}_3\text{COONa}/\text{CH}_3\text{COOH}$ ) and about 27 days, respectively. When the enzyme electrode was applied for the determination of glucose with amperometric method, other physiological materials have not interfered. Also, we compared the result with that from AOAC(Association of Official Analytical Chemists) method, measuring the glucose in sweet potato. The relative error was 0.1%.

### 서 론

1960년대 이후부터 연구자들은 생체물질을 분석하기 위한 감응기기 및 기술의 개발에 대한 연구가 많이 진행되어 왔다.<sup>1,4</sup> 이러한 연구에는 효소가 널리 사용되었는데 그 이유는 효소가 생체 내에서 아주 복잡한 반응을 원활 신속하게 진행시키며 특정 기질과 선택적으로 촉매반응을 하기 때문이다. 그러나 효소는 매우 불안정하고 값이 비싸기 때문에 Hicks<sup>5</sup>,<sup>6</sup> 등은 polyacrylamide gel 속에 glucose oxidase를 넣

은 막을 이용해서 glucose를 전기 화학적으로 측정하였다. 그 후 여러 연구자들에 의해 효소를 고정화시키는 기술이 진보되었다.<sup>7-11</sup>

Glucose는 혈액 · 뇌척수 · 림프액 속에도 조금 들어 있고, 특히 당뇨병 환자의 오줌에는 많은 양이 들어 있기 때문에 glucose 정량은 매우 중요하게 여겨지고 있다. 이러한 glucose를 정량하는 방법에는 여러 가지가 있으나 효소의 특정 기질에 대한 선택성 때문에 효소를 이용한 glucose의 분석 방법이 많이

연구되고 있다.

예를 들면 Bertrand와 Vadgama 등 여러 연구자들은<sup>12,14</sup> glucose가 O<sub>2</sub>와 glucose oxidase의 존재 하에서 반응하여 gluconic acid와 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>가 되는 반응을 이용하여 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 검출하는 방법을 이용하여 glucose를 정량하는 방법을 제안하였으며, Anold 등<sup>15</sup>은 polarographic oxygen analyzer로 O<sub>2</sub>의 소비 속도를 측정하므로써 혈액 속의 glucose를 측정하였다.

따라서 본 연구에서는 효소인 glucose oxidase[EC 1.1.3.4](725units/mL)를 Immobilon-AV 친화성 막에 고정화시킨 다음, 이 막을 Pt 전극에 부착시켜 전극을 제작하고 이 전극을 이용하여 전류법으로 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>가 산소로 분해될 때의 전류를 측정함으로써 glucose를 간접적으로 정량하는 방법에 대하여 연구하였다.

### 실험

**장 치.** EG&G instruments의 Scanning Potentostat Model 362를 사용하여 +0.8 volt vs. Ag/AgCl의 일정 전위<sup>16,17</sup>에서 전류를 측정하였고, BAS CV-50 W을 사용하여 순환전압전류곡선을 얻어서 일정전위를 조사했다. 이때 작업전극으로는 Pt 전극을 사용하였으며 보조전극으로는 완충용액중의 용액저항에 의한 IR 강하를 자동 보정해 주기 위하여 Pt 선을 사용하였다. 에어뎀 2100을 사용하여 O<sub>2</sub> 공급을 하였다. 또한 TPS PTY. LTD. 90-C model을 사

용하여 pH를 측정하였다.

**시 약.** 본 실험에 사용한 분석물질 β-D-glucose는 시그마사 제품을 사용했고 용매로는 CH<sub>3</sub>COONa/CH<sub>3</sub>COOH 완충용액을 pH 5.5으로 만들어서 사용했다. Glucose 표준용액으로는 1 mM과 10 mM을 저장 용액으로 조제하여 실험 직전에 적당한 농도로 묽혀서 사용하였다. 방해물질 조사실험에 사용한 β-lactose, β-D-fructose, α-D-galactose, L-ascorbic acid는 모두 시그마사 제품을 사용했고 2 mM로 제조해서 사용했는데 용매는 역시 CH<sub>3</sub>COONa/CH<sub>3</sub>COOH 완충용액을 사용했다.

**효소고정화 전극의 제작과 측정.** Pore size가 0.65 μL인 Immobilon-AV 친화성 막(Millipore Corporation, Bedford MA 01730; cat. No. IASD0005)을 고무 O-링을 이용하여 tip 면적이 약 0.78 cm<sup>2</sup>되는 전극자켓에 부착시킨다. 여기에 10 μL의 glucose oxidase[EC 1.1.3.4](725units/mL)를 membrane 위에 취하여 4°C에서 1~2시간 말린다. 이런 조작을 3회 하여(총 30 μL) 효소를 막에 고정시켰다. 이 때 고정화된 막을 4°C의 완충용액에 넣어 보관하였다. 또한 측정할 때는 전극면적이 1.8 mm<sup>2</sup>인 Pt 전극을 전극자켓에 조심스럽게 끼운 다음, +0.8 volt vs. Ag/AgCl의 일정전위에서 전류를 측정하였다.

측정 조작은 glucose을 포함하는 용액에 효소고정화 막전극을 넣고, O<sub>2</sub>로 포화시킨 다음, +0.8 volt vs. Ag/AgCl의 일정 전위를 걸어준다. 이 때의 전류변화

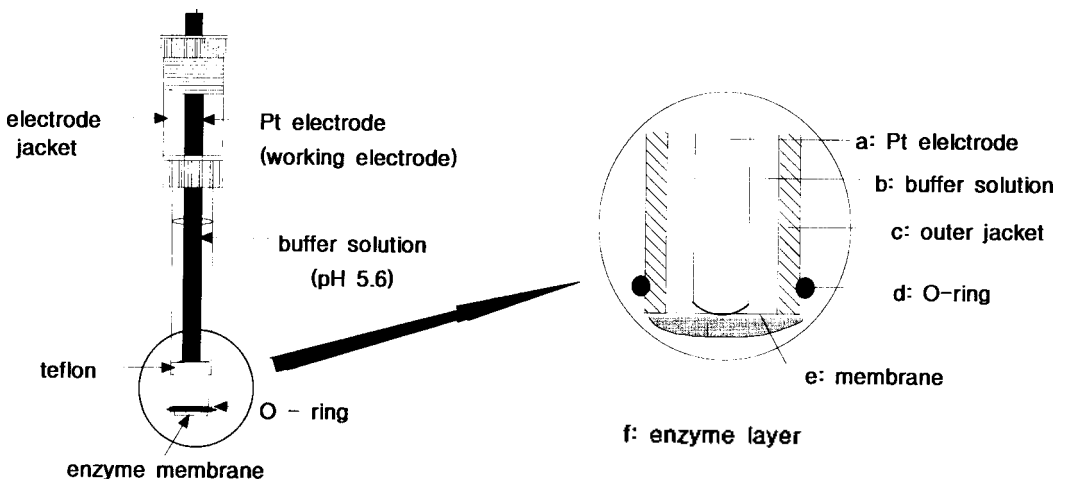
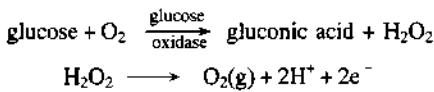


Fig. 1. Pt electrode with immobilized enzyme membrane.

를 측정하여 glucose의 농도를 결정하였다. 또한 이 때 시료용액의 전체 부피를 35 mL로 고정하였다. Fig. 1은 본 실험에서 사용한 작업 전극의 모형과 3-전극계를 나타낸 그림이다.

**결과 및 고찰**

**측정 원리.** 시료 속의 glucose는 O<sub>2</sub>와 함께 glucose oxidase가 존재할 때 gluconic acid와 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 분해되고 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>는 다시 O<sub>2</sub>로 산화 분해된다. 이 때의 반응은 다음과 같다.



이 반응에서 glucose가 산화되어 생긴 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>가 +0.8 volt vs. Ag/AgCl의 일정 전위에서 물과 산소로 전기 분해될 때 흐르는 전류를 측정함으로써 간접적으로 glucose를 정량할 수 있다.

**효소 고정화 전극의 감응 특성.** 효소고정화 전극을 이용하여 glucose를 정량할 때, 이 전극의 감응 특성을 나타내기 위하여 필요한 효소의 양,<sup>18</sup> 감응시간,<sup>19</sup> 일정 전위를 찾기 위한 순환전압 전류곡선을 조사하였다.

Fig. 2는 일정전위를 조사하기 위하여 10 mM glucose 용액에 glucose oxidase를 넣어서 얻은 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 순환전압 전류곡선이다. 그림에서 알 수 있듯이

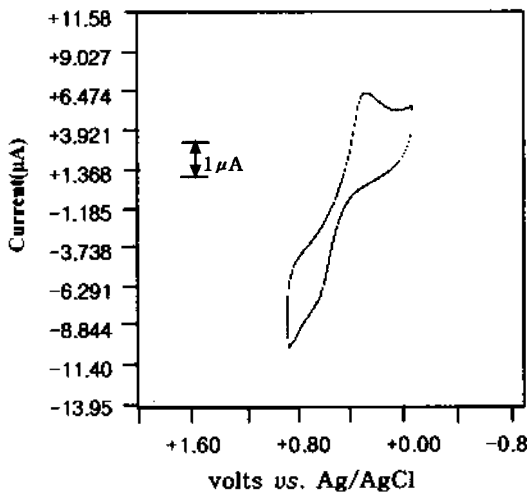


Fig. 2. Cyclic voltammogram of 10 mM glucose.; glucose solution added GOD.

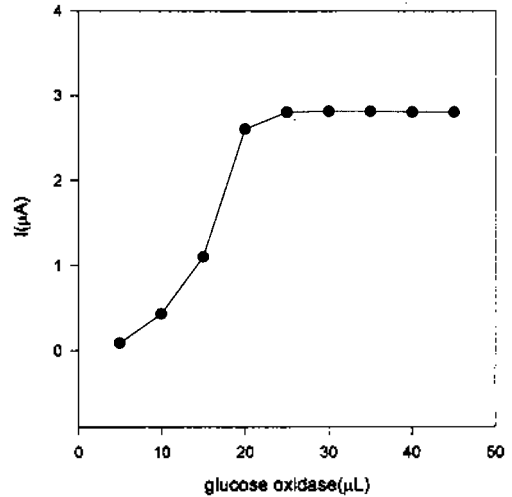


Fig. 3. The effect of GOD[EC 1.1.3.4.](725units/mL) amounts on enzymatic reaction (10 mM glucose).

+0.7V~+0.8V에서 산화 봉우리가 나타나고 있기 때문에 본 실험에서는 일정전위를 +0.8 volt vs. Ag/AgCl로 하였다.

이론적으로 효소의 양은 반응 속도에 비례하고 효소의 양이 아주 증가하게 되면 속도는 양에 무관하게 된다. 이 때 속도가 최대가 될 때 효소의 양을 알아보기 위해 다음과 같은 실험을 수행하였다. 고정시킨 막 위에 glucose oxidase[EC 1.1.3.4.](725units/mL) 용액을 5 µL에서 부터 5 µL씩 증가시켜 45 µL 까지 떨어뜨려, 효소 고정화 막을 만들었다. 이것을 4°C에서 12시간정도 말린 후 각각 일정 전위 +0.8V vs. Ag/AgCl에서 전류를 측정하였다.

Fig. 3은 막에 고정화시킨 효소의 양에 따른 전극 감응 특성을 나타낸 것이다. Fig. 3에서 알 수 있는 바와 같이 725units/mL의 glucose oxidase를 25 µL 이상 고정화시켰을 때 전극감응은 일정한 값에 도달하였다. 따라서 본 실험에서는 725units/mL의 glucose oxidase를 30 µL 취하여 막에 고정하여 실험에 사용하였다.

최적의 생체전극 작용은 짧은 감응시간을 가지는 것이다. 본 실험에서는 시료 용액의 농도는 10 mM로 하고 시간에 따른 전류값을 측정하였는데 Fig. 4에 나타나듯이 12초 후부터는 일정한 전류값을 나타내고 있다. 즉 막의 감응 시간은 12초로 조사되었다.

**전극 감응에 미치는 용액의 pH 영향.** 산화·환원 과정의 대부분은 pH 지배적이며 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 산화가

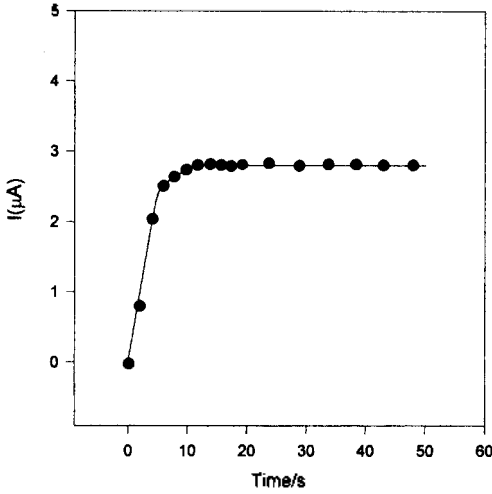


Fig. 4. Response time of immobilized enzyme electrode.

그 대표적인 예이다. pH의 정밀한 조절은 최적의 감응을 위해 필요하다. 그러나 고정화된 생촉매 부근의 pH는 Weatall<sup>20</sup>에 의하면 용액의 pH로부터 달라진다고 했다. 본 실험에서는 고정화된 효소 막을 사용하여 glucose을 정량할 때 용액의 최적 pH를 조사하기 위해 0.1M HCl과 0.1M NaOH를 사용하였고, pH를 5~11까지 변화시키면서 10 mM glucose 용액의 전류를 측정하였다. 이 때 glucose는 증류수에 녹여서 실험을 하였다.

Fig. 5은 pH를 5~11까지 변화시키면서 얻은 전류

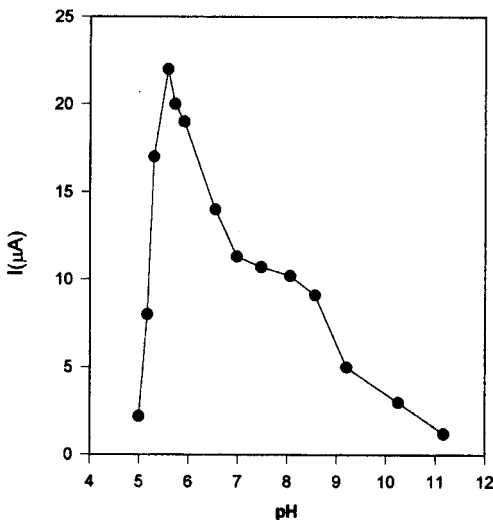


Fig. 5. The effect of pH on the enzymatic reaction of GOD.

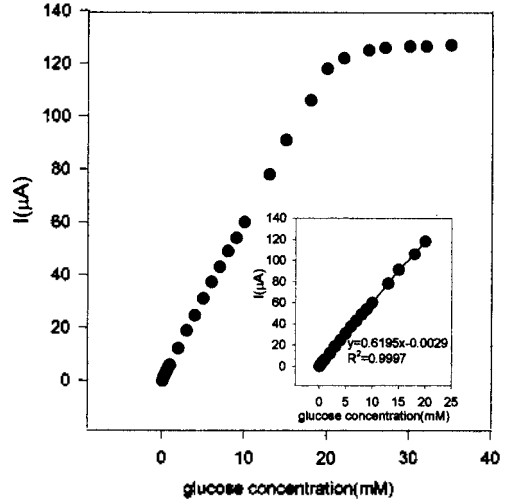


Fig. 6. Calibration curve for the determination of glucose.

값을 나타낸 그림이다. 그림에서 알 수 있듯이 pH 5.5 부근에서 가장 큰 전류값을 보였다. 따라서 본 실험에서는 완충용액(CH<sub>3</sub>COONa/CH<sub>3</sub>COOH)의 pH를 5.5 ± 0.1으로 하여 사용하였다.

**Glucose 정량을 위한 검정곡선.** 앞에서 측정된 최적 실험 조건 하에서 본 방법으로 glucose을 정량함에 있어서 측정 가능한 농도 범위와 검출 한계를 조사하기 위하여 다음과 같이 검량 곡선을 구하여 Fig. 6에 나타내었다.

시료 용액의 농도는 표준 용액 1 mM, 10 mM, 20 mM, 40 mM 각각 4개를 저장 용액으로 제조한 뒤 0.1 mM~35 mM로 시료를 묹힌 후 실험을 하였다. 묹힌 후 시료 용액 35 mL가 +0.8 V vs. Ag/AgCl에서 gluconic acid로 산화되어 생긴 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>가 다시 산화될 때의 전류를 측정하여 glucose를 정량하였다. Fig. 6에서 알 수 있듯이 효소 고정화 전극을 사용하여 glucose를 전류법으로 정량할 때의 정량범위는 0.2 mM~20 mM이고, 검출한계는 1 × 10<sup>-3</sup> mM이었다. 상관계수도 R<sup>2</sup>=0.9997로 매우 좋은 값이었다.

**방해물질의 영향.** 효소가 생체 관련 물질의 분석 시약으로 널리 쓰이는 이유 중의 하나는 특정한 기질에 대하여 선택성이 매우 뛰어나기 때문이다. 따라서 본 실험에 사용한 고정화시킨 효소가 다른 당계의 화합물에 대하여 나타내는 선택성을 조사하기 위하여 2 mM glucose만 있을 때와 여기에 2 mM의 β-D-fructose, β-lactose, α-D-galactose, L-ascorbic

Table 1. Effect of interference materials on the determination of glucose

Materials (2 mM)	Current ( $\mu$ A)	Rel. error(%)
$\beta$ -D-glucose	5	0%
$\beta$ -lactose	5	0%
$\beta$ -D-fructose	5	0%
$\alpha$ -D-galactose	5	0%
L-ascorbic acid	5	-10%

acid을 방해물질<sup>21-24</sup>로 첨가한 용액에 대하여 전류를 측정해 본 결과를 Table 1에 나타내었다. Table 1에서 알 수 있는 바와 같이 이들은 거의 영향을 미치지 않는다. L-ascorbic acid에 대해서는 상대오차가 10%가 나왔다. 일반적으로 우리가 시다고 느끼면서 마시는 일반 오렌지 주스에는 glucose:L-ascorbic acid의 농도비가 1000:1<sup>25</sup> 정도이기 때문에 농도비를 1:1로 실험한 이 data는 생체내에서의 상대라고 고려할 때 전혀 문제가 되지 않을 것으로 생각된다. 따라서 glucose oxidase는 기질인 glucose에 대하여 매우 뛰어난 선택성을 갖고 있음을 알았다.

**효소 고정화 membrane의 수명.** 앞에서 언급했듯이 고정화시킨 효소는 가용성 효소보다도 열, 방해물질 등의 여러 인자에 영향을 적게 받기 때문에 보다 안정한 것으로 알려져 있다. 따라서 본 실험에 사용한 glucose oxidase를 고정화시킨 10 mM의 glucose 용액에 대하여 적용했는데 효소 고정화막의 시

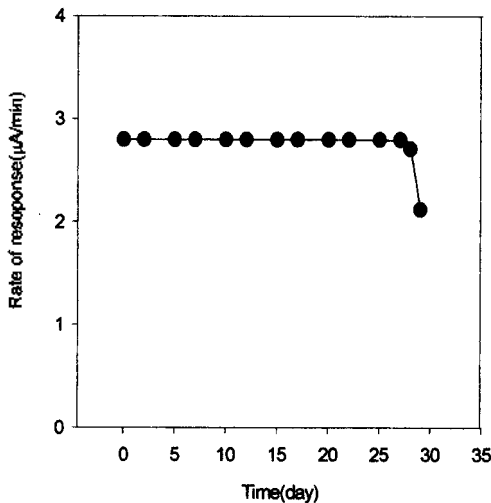


Fig. 7. Life time of the immobilized enzyme membrane (30  $\mu$ L of 725units/mL of GOD was immobilized).

Table 2. Precision test for amperometric determination of glucose

Concentration (mM)	Current ( $\mu$ A) ( $x \pm s$ )	Rel. Std. Dev. (%)
0.2	0.128 $\pm$ 0.02	6.67
0.6	0.378 $\pm$ 0.01	1.34
2	1.256 $\pm$ 0.07	3.46
6	3.774 $\pm$ 0.07	1.32

간 변화에 따른 전류를 측정하여 전극의 수명을 조사하고 그 결과를 Fig. 7에 나타내었다. Fig. 7에 나타낸 바와 같이 효소 고정화된 막전극은 제작 후 약 27일 동안은 감응 특성의 변화가 거의 없었다. 이러한 결과는 가용성 효소전극의 수명이 일반적으로 약 7일 정도밖에 되지 않는다는 Nikelelis<sup>26</sup>의 연구 결과에 비하여 수명이 훨씬 더 연장되었음을 알 수 있다.

**정확도와 정밀도.** 앞에서 구한 최적 조건에서 glucose를 전류법으로 정량할 때의 정밀도를 조사하기 위하여 0.2 mM~6 mM 범위의 glucose 용액에 대해서 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 산화전류를 5회씩 측정하여 그 결과를 Table 2에 나타내었다. Table 2로부터 알 수 있는 바와 같이 glucose 표준용액에 대해 산화전류의 평균 편차는  $\pm 0.04$  mA였다.

또한 glucose를 정량할 때의 정확도를 구하기 위하여 0.2 mM~6 mM 범위의 glucose 표준용액에 대하여 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 산화전류를 측정하여 점정곡선법으로 구한 glucose의 양과 처음에 넣은 glucose의 양을 비교하여 Table 3에 나타내었다. Table 3으로부터 알 수 있는 바와 같이 평균 회수율은 102.8%이었다.

**AOAC법에 의한 glucose의 정량.** 앞서 소개한 AOAC 방법으로 고구마 속의 glucose를 정량한 값과 효소 고정화막을 이용해서 본 방법으로 고구마속의 glucose를 정량한 값을 Table 4에 나타내었다. 먼저 필요한 시약은 (1) Shaffer-Somogyi carbonate 50

Table 3. Accuracy test for amperometric determination of glucose

Glucose (mM)		Recovery (%)	Rel. error (%)
Added	Found		
0.2	0.211	105.5	+5.5
0.6	0.615	102.5	+2.5
2	2.032	101.6	+1.6
6	6.097	101.6	+1.6

Table 4. Comparison study of the present method with AOAC standard method

Sample	Glucose (ppm)	
	Present method	AOAC method
sweet potato	27.79	27.76

reagent, 5g KI, (2) iodide-oxalate 용액, (3) thiosulfate 용액, (4) 녹말시약 등이다. 처음 단계는 고구마의 겉질을 깨끗하게 제거한 후 잘게 빻은 고구마를  $\text{CaCO}_3$ 가 과포화된 뜨거운 에탄올에 고구마의 녹말 성분이 우려나올 때 까지 둔다. 하루 정도 지난 후 상층액을 시료로 취해서 본 실험에 사용한다. Test tube에 고구마 시료 용액 5 mL와 시약 (1)을 5 mL 넣고 boiling bath에 15분간 방치한다. 그 다음엔 cooling bath에 4분간 방치한다. 후에 시약 (2)를 2 mL씩 첨가하고 이어서 2N 황산 3 mL을 첨가한다. 황산을 넣으면 격렬한 반응이 일어나고 여기서 완전하게 혼합하기 위해서 흔들어서 주어야 한다. 그 후에 다시 cooling bath에 5분간 담구어 두는데 5분 동안에 2번 정도 더 흔들어서 준다. 그런 후에 녹말 시약을 넣고 0.005N  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  표준용액으로 적정한다. Table 4에서 나타낸 바와 같이 상대오차 0.1%로 아주 만족할 만한 값을 나타내었다.

## 결 론

효소 고정화 막을 부착시킨 전극을 이용하여 glucose를 정량 분석하기 위한 최적 조건을 요약하면 다음과 같다. 전류법으로 glucose를 정량하기 위한  $\text{H}_2\text{O}_2$ 의 산화전위를 참고로 하여 고정전위 +0.8V vs. Ag/AgCl에서 모든 실험을 수행하였고 모든 용액의 pH는 5.5으로  $\text{CH}_3\text{COONa}/\text{CH}_3\text{COOH}$  완충용액을 사용하였다. 막에 고정화시킨 효소 glucose oxidase [EC 1.1.3.4.](725units/mL)의 양은 30  $\mu\text{L}$ 였고 이 고정화막의 감응시간은 12초였다. 그리고 직선 감응 범위는 0.2 mM-20 mM이었고 검출한계는  $10^{-3}$  mM이었다. 또한 방해종의 영향 조사 실험에서도 별 다른 방해효과는 없었고 이 효소 고정화 막의 수명은 27일이었다. 막의 정밀도와 정확도에 있어서도 그 표준 편차와 재현성에 있어서 만족할 만한 값이었다. AOAC method와 비교해 본 결과 본 방법은 0.01%의 상대오차를 나타내었다.

본 연구는 1998년도 경상대학교 기초과학연구소 연구비의 지원으로 이루어졌으며 이에 깊은 감사를 드립니다.

## 인 용 문 헌

1. Guilbault, G. G. *Handbook of Enzymatic Methods of Analysis, Clinical and Biochemical Analysis*; Marcel Dekker: New York, U.S.A., 1976; Vol. 4.
2. Nelson, J. M.; Griffin, E. G. *J. Am. Chem. Soc.* 1916, 38, 1109.
3. Vasta, B.; Usdin, V. *Immobilized Enzymes*; Melpar, Inc.: Falls church, Va., Final Report, Contract DA 18-108-405-CML.
4. Guilbault, G. G.; Kramer, D. M. *Anal. Chem.* 1966, 37, 1675.
5. Hicks, G. P.; Updike, S. J. *Anal. Chem.* 1966, 38, 726.
6. Updike, S. J.; Hicks, G. P. *Science* 1967, 158, 270.
7. Rony, P. R. *Biotechnol. Bioeng.* 1971, 13, 431.
8. Silman, I. H.; Katchalski, E. *Ann. Rev. Biochem.* 1966, 35, 873.
9. Goldfeld, M. G.; Vorobeve, E. S.; Poltorak, O. M. *Zh. Fiz. Khim.* 1966, 40, 2594.
10. C. Bertrand, C.; Coulet, P. R.; Gautheron, D. C. *Anal. Chim. Acta.* 1981, 23, 126.
11. Assolant-Vinet, C. H.; Coulet, P. R. *Analytical Letters.* 1986, 19(7&8), 875.
12. Bertrand, C.; Coulet, P. R.; Gautheron, D. C. *Anal. Chim. Acta.* 1981, 23, 126.
13. Pankaj, M. V.; William, H. Mullen.; Fiona H. K.; Stephen J. Churchouse *Analytica Chimica Acta.* 1986, 183, 59.
14. Ikea, T.; Hamada, H.; Miki, K.; Senda, M. *Agrile Biol. Chem.* 1985, 49(2), 541.
15. Kadish, A. H.; Robert L. L.; James C. S. *Clin. Chem.* 1968, 14, 116.
16. Poyard, S.; Jaffrezic-Renault, N.; Martelet, C.; Labbe, P.; Cosnier, S. *Transducers 1995, '95.Euro-sensors IX.*
17. Tatsuma, T.; Watanabe, T. *Analytica Chimica Acta.* 1991, 242, 85.
18. Seo, M. L.; Kim, J. S.; Lee, S. S.; Bae, Z. U.; Lee, H. L.; Park, T. M. *J. Kor. Chem. Soc.* 1993; Vol. 37, p 939.
19. Benjamin G. Milagres; Lauro T. K.; Neto, G. O. *Electroanalysis.* 1996, 5, 492.
20. Weetall, H. H. *Anal. Chem.* 1974, 46, 602A.
21. Yabuki, S.; Mizutani, F. *Biosensors & Bioelectronics.* 1995, 10, 353.

22. Wang, J.; Chen, L.; Lia, J.; Lu, F. *Electroanalysis* **1996**, *12*, 1127.
23. Sampath, S.; Lev, O. J. *Electroanalytical Chemistry* **1997**, *426*, 131.
24. Moser, L.; Jobst, G.; Svasek, P.; Varahram, M.; Urbam, G.; Schmidt, J.; Leist, C. *Euroensors* **1995**, IX,
25. Yabuki, S.; Mizutani, F. *Biosensors & Bioelectronics* **1995**, *10*, 356.
26. Nikelelis, D. S.; Parastathopoul.; Hadyioannas, J. P. *Anal. Chem. Acta.* **1981**, *126*, 43.
-