

グアバに含まれるポリフェノールの消長とその特性

誌名	園藝學會雜誌
ISSN	00137626
著者	伊藤, 三郎 松尾, 友明 飯伏, 雄二
巻/号	56巻1号
掲載ページ	p. 107-113
発行年月	1987年6月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター

Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



グアバに含まれるポリフェノールの消長とその特性¹

伊藤三郎・松尾友明・飯伏雄二²・玉利信人³

鹿児島大学農学部 890 鹿児島市郡元一丁目

Seasonal Changes in the Levels of Polyphenols in Guava Fruit and Leaves and some their Properties

Saburo ITOO, Tomoaki MATSUO, Yuji IBUSHI and Nobuto TAMARI

Faculty of Agriculture, Kagoshima University,
Korimoto, Kagoshima 890

Summary

With the purpose of utilizing tropical and subtropical fruits more effectively, abundant polyphenols found in guava (*Psidium guajava* L.) fruit and leaves were examined seasonally in both qualitative and quantitative aspects.

1) The method reported by Peri and Pompei was recognized to be highly useful for determining various polyphenols in crude extracts of guava.

2) Young guava fruit (picked on 18th August and weighting 2.9 g) contained 620 mg of total polyphenols per 100 g fresh weight and 68% of the polyphenols was shown to be condensed tannin. As the fruit grew up, their contents of condensed tannin decreased remarkably.

3) Proanthocyanidin levels in the guava fruit also decreased with the increase in fruit weight from August to October.

4) Gel permeation chromatographic analyses of polyphenols suggest that high molecular weight polyphenols of more than 14,000 disappeared with fruit development.

5) The polyphenol level of guava picked on 3rd August was about 10 times that of young fruit (picked on 18th August) and 84% of the total polyphenols was found to be condensed tannin. The levels decreased markedly at the late of August.

6) (+)-Catechin and (+)-galocatechin were identified by a reversed phase HPLC in the extracts of guava fruit and leaves.

These results indicate that a large percentage of polyphenols in guava fruit and leaves is a type of flavans, especially proanthocyanidin heteropolymers that are composed of (+)-catechin and (+)-galocatechin, and these compounds decrease remarkably at the early stage of fruit development or at the late of August in the leaves.

緒 言

グアバ (*Psidium guajava* L.) は、フトモモ科バンジロウ属に属する熱帯中央アメリカ原産の常緑低木の果樹で、その果実の独特のじゃこう (musky) の香り、風味及び高いビタミンC含量 (約 200~300 mg%)⁽⁵⁾ から生食以外に果汁飲料、ネクター、ピューレー、ゼリーなどに加工されている。

他方、近年、その幼果や葉を乾燥させた健康飲料としてのグアバ茶の生産も盛んになりつつあり、その中にある種の生理活性物質の存在も予想されている。筆者らは、熱帯・亜熱帯性果実の特性、貯蔵及びその有効利用に興味を持ち、一連の研究を続けてきているが、本実験では、グアバの葉・果実に多く含まれているポリフェノールに着目して、その消長と特性について調べたところ、若干の知見を得たので報告する。

材料及び方法

グアバ (*Psidium guajava* L., ピンク種, B-30系統) の果実は、鹿児島大学農学部附属指宿植物試験場産のも

¹ 1986年6月13日受理
亜熱帯果実の品質に関する研究、第4報。

² 現在 鹿児島県経済農協連

³ 現在 鹿児島県庁

Table 1. Guava fruits picked at various stages.

Picked date	Average weight (g)	Average size (cm)	Peel color	Developmental stage
Aug. 18	2.9	2.1×1.6	mature-green	I
Aug. 18	12.7	3.4×2.1	mature-green	II
Sept. 17	27.1	4.4×3.5	green	III
Oct. 14	69.0	5.6×4.8	light-green	IV
Oct. 14	76.1	5.5×5.0	light-yellow	V

Table 2. Guava leaves picked seasonally.

Picked date	Average weight (g)
Aug. 3	2.0
Aug. 23	1.6
Sept. 22	1.7
Oct. 27	2.0

ので、1982年に8月18日、9月17日、10月14日と約4週間間隔で3回にわたり、平均的な大きさの果実を10個から30個採取し材料とした。8月18日に採取した濃緑色の果実は、果実重で2群に分け、それぞれをステージI-IIと名付けた(平均個体重:2.1gと12.7g)。果実の生育とポリフェノールの消長との関連性を調べるために、以後の採取時期により、順次ステージIII(9月17日)・10月14日採取果は果皮色によりステージIV・Vと名付けた。それらの果皮色は、IIIからVのステージにかけて、緑色から淡黄色へと変化した。平均個体重も27.1gから76.1gへと増加した(第1表)。

グアバの葉(ピンク種、B-30系統)は、1983年に8月3日、8月23日、9月22日、10月27日の4回にわたり、各枝の第5葉と第6葉を20~60枚採取した。平均葉重は採取時期によって大きくは変化せず、1.6~2.0gの範囲にあった(第2表)。

ポリフェノールの抽出と分別定量

果実、あるいは葉を包丁で小さく刻んだ後、50gを精秤してホモジナイザーで磨砕し、メタノールに浸漬して4°Cで一昼夜抽出した。ブフナーロードで吸引ろ過後、残渣は、再度メタノールに2日間浸漬した。同様に吸引ろ過後、前回のろ液と合せて、メタノール抽出液とした。

ロータリーエバポレーターで減圧濃縮により、メタノールを完全に除去後、得られた水溶液を約3分の1量の石油エーテルで3回抽出して、色素や脂質などを除いた。この水相を蒸留水で100mlに定容して、ポリフェノールの分別定量用の試料とした。

どのようなタイプのポリフェノール成分がどんな割合で含まれているかを大まかに調べるために、Periと

Pompei(13)の分別定量方法を一部改変して用いた。この方法は、(I)高分子タンニンがシンコニン硫酸と結合して沈殿を生成すること、(II)フラバン化合物が酸性条件下でホルムアルデヒドと反応して不溶化すること等の特性を利用したものである。その概略を第1図に示した。

希塩酸で粗抽出液のpHを3.5に調節し、その試料液1mlに等量の飽和シンコニン硫酸液を加えて10分後に遠心分離(3,000rpm,10分間)した。得られた沈殿に半飽和のシンコニン硫酸液を加えて沈殿を十分に懸濁後、再度、遠心分離した。この上澄液を前に得られた上澄液と合わせて、蒸留水で10mlに定容した(この液を①液と呼んだ)。①液2mlに等量の塩酸-水混液(1:1,v/v)と0.8%ホルムアルデヒド液1mlを加えて、30°Cで一晩反応させた。一方、前述の沈殿には、エタノール-塩酸混液(2:1,v/v)2mlを加えて加温しながら溶解した。その液に0.8%ホルムアルデヒド1mlを加えて、30°Cで一晩反応させた。反応後、それぞれの液は遠心分離し、測られた2つの上澄液は、蒸留水で10mlに定容した(これらを②液と③液と呼んだ)。このようにして得られた①、②、③液は、さらに、それぞれ10倍、2倍、10倍に希釈後、Folin-Ciocalteu法(2)でポリフェノールを定量した。

結果として、各種ポリフェノールの反応性の違いにより、Simple phenols, Non-tannin flavans, Hydrolysable tannins, Condensed tanninsの4種類にタイプ分けをした。すなわち、②液の定量値がSimple phenols量を、③液の値がHydrolysable tannins量を示す。また、次式により、Non-tannin flavans量とCondensed tannins量を計算した。

$$\text{Non-tannin flavans 量} = \text{①} - \text{②}$$

$$\text{Condensed tannins 量} = \text{Total} - \text{①} - \text{③}$$

ポリフェノールの標準物質としては(+)-カテキン(シグマ社)を用いた。この分別定量方法の有用性を、既知の没食子酸・(+)-カテキン・タンニン酸・カキタンニン(6)を用いて検討したところ、それぞれの回収率(理論値/測定値×100%)は97%、92%、96%、89%であっ

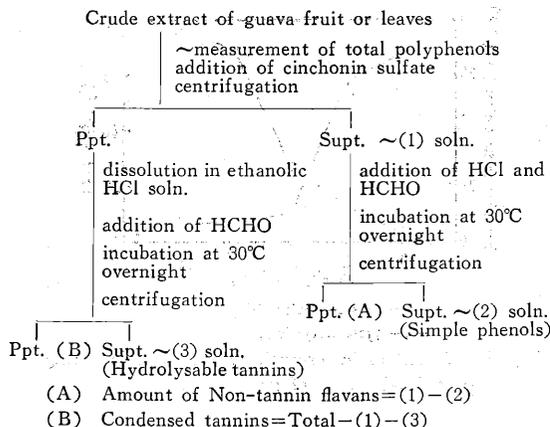


Fig. 1. Determination of four-typed polyphenols with a special method described by Peri and Pompei.

た。

Condensed tannins (プロアントシアニジン) は、同時に塩酸-ブタノール法(11)によっても調べた。

ゲル浸透クロマトグラフィー (GPC) による分子量分布の分析

分別定量後、試料溶液の一部を凍結乾燥して得た粉末を各々 100 mg 秤取し、0.2 ml のメタノールに溶かした後、10 ml のテトラヒドロフラン (THF) を加え遠心分離した。この上澄液を 0.5 μm Filter unit (ミリポア) でろ過し、このろ液を GPC により分析した。GPC は Bio-beads SX-1 (パイオラッド) を充てんしたカラム (φ 2.2 cm × 80 cm ; ゲル容量 304 ml) を用い、溶出液としては THF を使用した。この樹脂は 14,000 という排除限界 (Exclusion limit) を有している。

高性能液体クロマトグラフィー (HPLC) によるポリフェノール成分の同定

分別定量後、試料溶液の一部を合成多孔性樹脂 (HP-20, 三菱化成工業) により精製して HPLC の試料とした。ポリフェノールを HP-20 樹脂に吸着後、よく水洗してきょう雑物を除き、カラムの 5 倍量の 70% エタノールで溶出して粗ポリフェノール分画を得た(8)。エタノールを除去して凍結乾燥後、得られたポリフェノール粉末を少量のメタノールに溶解し、さらに蒸留水を加えて、15% メタノール液中にポリフェノール量が 0.25% になるように試料溶液を調製した。

HPLC のポリフェノール標品としての (+)-カテキンと (-)-エピカテキンは、シグマ社のものを使用した。(+) -ガロカテキンと (-)-エピガロカテキンは、西條了康博士が茶葉より分離したものをを用いた。各標準液の濃度も 0.25% である。

HPLC の逆相分配クロマトグラフィーは、TRIOTAR III (日本分光社製) にスクレオシル C₁₈ (ナーゲル社) を充てんしたカラム (φ 4.6 mm × 250 mm) を取り付けて行った。溶媒としては 0.1% ギ酸を含む水-メタノール系を使用した。つまり、A 液 (90% メタノール-水混液) と B 液 (10% メタノール-水混液) を 7 対 3 の割合で混合して用いた。流速は 1.0 ml/min で、カテキン類の検出は、紫外検出器 UVIDEC-100 II (日本分光) により 277 nm の吸収を調べることにより行った。試料溶液は 1.0~5.0 μl を分析した。

プロアントシアニジンの酸分解により生じるアントシアニジンの分析

HP-20 樹脂で精製したポリフェノールの 0.25% 溶液を 3 回酢酸エチルで抽出して、低分子ポリフェノールを除いた。それから得られた水相をネジロ試験管に入れて等量の 2N 塩酸溶液を加えてから、密栓後沸とう水浴中で 30 分間加熱した。冷却後、少量のイソプロピルアルコールで生じたアントシアニジンを抽出し、セルロース TLC で分析した。

展開溶媒には、Forestal の溶媒 (氷酢酸 : 濃塩酸 : 水 = 30 : 3 : 10, v/v/v) を使用した。展開後、プレートを風乾して、分離した二つの赤色スポット、シアニジン ($R_f=0.49$) とデルフィニジン ($R_f=0.31$) の量比を島津二波長クロマトスキャナー CS-900 ($\lambda_r=700$ nm, $\lambda_s=530$ nm) により、それらの面積を求めて計算した。

結 果

グアバ果実の発育段階におけるポリフェノール成分の相違

前述した分別定量法により、果実の生育に伴うポリフェノール成分の変化を調べた結果が第 2 図である。8 月 18 日採取の果実は濃緑色で、平均果重が 2.9 g であり、効果と考えられる (ステージ I)。その総ポリフェノール量は新鮮重 100 g 当たり 620 mg に達し、各成分比は、Condensed tannins 67.5%, Non-tannin flavans 17.5%, Simple phenols 12.4%, Hydrolysable tannins 2.6% であった。

総ポリフェノール量は果実重の増加とともに減少し、ステージ II・III ではそれぞれ、501.0 mg と 83.7 mg であった。この大きな減少の 70% 以上は Condensed tannins の減少によるもので、他の成分は比較的变化しないことが明らかとなった。適熟と考えられるステージ V の果実では総ポリフェノール量 143.2 mg であり、その各成分比は Simple phenols が 42.2% を占め、続いて Condensed tannins が 26.5%、残りが Non-tannin flavans と Hydrolysable tannins であった。

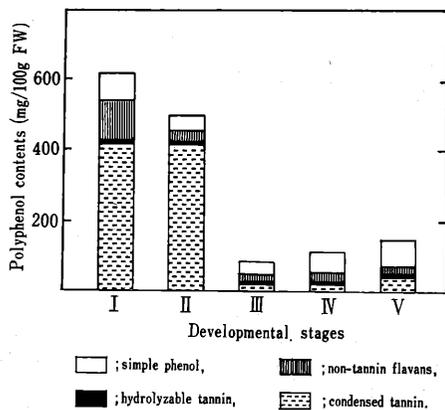


Fig. 2. Variations in four-typed polyphenol levels during fruit development of guava. These polyphenols were determined with the method described by Peri and Pompei.

比較のために同指宿植物試験場で8月18日に採取したストロベリーグアバ果実(赤肉種)の分析の結果は、総ポリフェノール量が780 mgで、その各成分比は Condensed tannins 35.9%, Simple phenols 26.9%, Non-tannin flavans 17.9%, Hydrolysable tannins 19.3%であり、グアバのポリフェノール成分比と大きく異なることが分かった。

グアバ果実の発育段階におけるプロアントシアニジン量の比較

近年、Condensed tanninsの化学的自体は、プロアントシアニジンのポリマーであると考えられている。そこで、塩酸-ブタノール反応によりプロアントシアニジン量を比較した。その量は、新鮮重g当たりの550 nmでの総吸光度として表示した(第3図)。果実の生育段階との関連性も明らかにするため、それらの平均果実重も同時に図示した。果実重が2.9 g・12.7 g・27.1 g・69.0 g(ステージ I・II・III・IV)と増加するにつれて、プロアントシアニジン量は $32.8 > 28.5 > 3.8 > 1.9$ と激減した。果実重76.1 gの適熟果(ステージV)では、わずかに増加して2.4であった。ストロベリーグアバ果実でも、同様の変化が観察された。

また、グアバ幼果(ステージI)の抽出物をHP樹脂で精製し、酢酸エチルで低分子ポリフェノールを除去後、酸分解すると、シアニジンとデルフィニジンが約2:3の割合で生成することがTLCの結果明らかとなった。若い葉を材料とした同様の実験は、それらの割合が約4:1であることを示した。

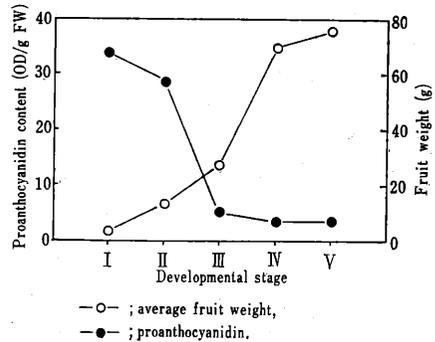


Fig. 3. Variations in proanthocyanidin levels during fruit development of guava.

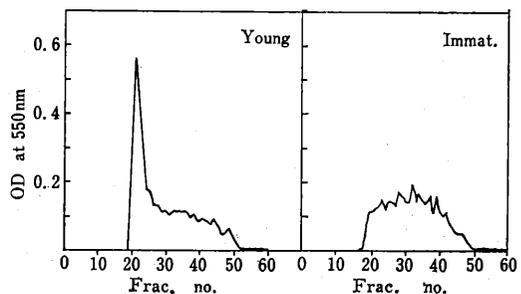


Fig. 4. Gel permeation chromatograms of proanthocyanidins in extracts of young and immature fruits of guava. Each fraction eluted with THF was examined by the HCl-BuOH method to determine proanthocyanidin levels. The gel(Bio-bead SX-1) has the exclusion limit of 14,000.

グアバ果実に含まれるプロアントシアニジンの GPC 分析

グアバ果実と葉に含まれるプロアントシアニジンの分子量分布を調べるために、Bio-beads SX-1でゲル浸透クロマトグラフィーを行った。カラムからの溶出液をフラクションコレクターで分画後、各分画のプロアントシアニジン量を塩酸-ブタノール反応により調べた(第4図)。ステージI(幼果)の果実抽出物より得たTHF可溶物は、void volume(Frac. no. 20前後)に高いピークを示し、大部分のプロアントシアニジンが分子量14,000前後の高分子量であることが分かった。また、それぞれ異なった分子量のものが、高分子から中分子・低分子と連続的に存在することが明らかとなった。加えて、GPCの試料調製時にメタノール可溶物質にTHFを加えたところ、少量の沈殿が生じ、THF不溶の、さらに高分子のポリマーが含まれていると推測した。8月

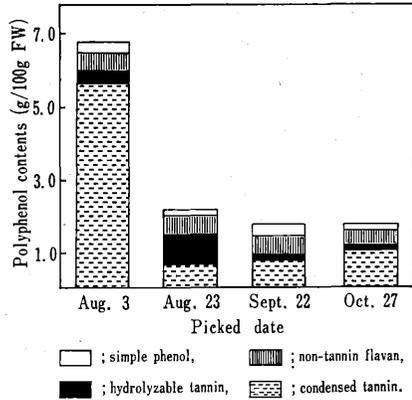


Fig. 5. Seasonal changes of four-typed polyphenols in guava leaves. Those polyphenols were determined with the same method, as described in Fig.2.

3日採取の葉からの試料も、非常によく似たクロマトグラムを与えた。そして、THF不溶部分の割合がその果実より高かった。

一方、第4図から明らかのように、ステージⅢの果実の試料では、void volume 付近の大きなピークは全く認められず、大部分が中・低分子であった。また、GPC試料調製時のTHF不溶なポリマーの沈殿も認められなかった。

グアバ葉に含まれるポリフェノールの経時的变化

果実と同様に、分別定量法により葉のポリフェノール成分の変化を経時的に調べた(第5図)。8月3日に採取した平均葉重2.0gの葉の総ポリフェノール量は、新鮮重100g当たり6.8gであった。8月18日に採取した果実のその約10倍である。その各成分比は、Condensed tannins 83.8%, Non-tannin flavans 7.4%, Simple phenols 4.4%, Hydrolysable tannins 4.4%であった。

総ポリフェノール量は経時的に減少し、8月23日のものでは2.1g、10月27日のものでは1.7gとなった。この大きな減少の90%近くがCondensed tanninsの減少によるものであり、他の成分は比較的大きな変化は示さなかった。10月27日採取の葉における各ポリフェノール成分の割合は、Condensed tannins 64.7%, Non-tannin flavans 20.6%, Simple phenols 8.8%, Hydrolysable tannins 5.9%であった。

HPLCによるグアバのポリフェノール成分の確認

グアバの幼果及び成葉よりHP-20樹脂を用いて部分

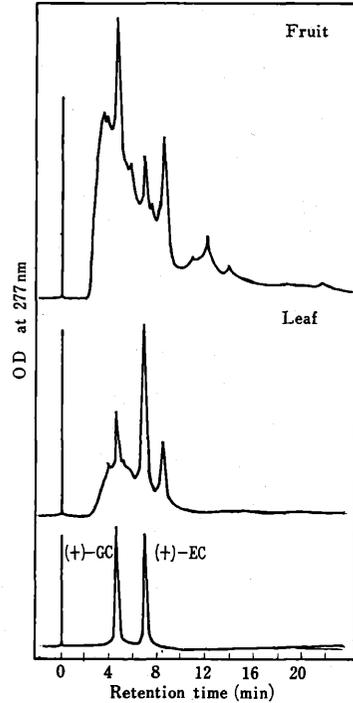


Fig. 6. Reversed phase HPLC analyses of some polyphenols in extracts of guava young fruit and mature leaves. (+)-GC and (+)-EC stand for (+)-gallocatechin and (+)-catechin, respectively.

精製した粗ポリフェノール分画を、C₁₈カラムを使用した逆相分配HPLCにより分析した。それらのクロマトグラムを標品のものと比較して示したのが第6図である。標品の(+)-ガロカテキンと(+)-カテキンの保持時間は、それぞれ4.58分と6.86分であったが、グアバ幼果では(+)-ガロカテキンに相当する明瞭なピーク(4.59分)が認められ、一方、グアバ成葉では、(+)-カテキンに相当する大きなピーク(6.88分)が観察された。また、比較的小さなピークではあるが、幼果で(+)-カテキン、成葉で(+)-ガロカテキンを検出した。

適当な量の標品を未知試料に混ぜ再分析をしたところ、両者の(+)-カテキン・(+)-ガロカテキンのピークが二つに分離することはなく、鋭い一本のピークとして観察された。

考 察

グアバのポリフェノールとしては、既に Seshadri と Vasishta (14), Misra と Seshadri (9) により、Quercetin, Gallic acid, Ellagic acid, Guaijaverinが、また、Okudaら(12)によって10種のEllagitannins

が確認されているが、グアバ果実及び葉に含まれるポリフェノールの変化を系統立てて調べた報告は少ない(10)。

本実験で、Peri と Pompei (13) の分別定量法により各ポリフェノール成分をタイプ分けした後定量したところ、グアバ幼果(ステージI)ではその総量の85%がフラバン・タイプのポリフェノールであり、その中でも特に、縮合型タンニンの占める割合が多く、総ポリフェノール量の67.5%であることが明らかとなった(第2図)。

近年、古くから縮合型タンニンと呼ばれていたタンニンのほとんどがプロアントシアニジン・ポリマーであることが確認されつつあるが(1, 3, 4, 7), グアバ果実に含まれる大部分のポリフェノールもプロアントシアニジンであることが推定された(第3図)。

しかしながら、グアバの適熟果は全く渋味を有さないが、本実験の結果から、高分子タンニンが果実生育の初期に消失することが明確に示され、そのことが化学的に裏付けされたと言えよう。収穫後の果実の利用加工の点から、果実成熟中の高分子タンニンの消失は極めて興味深い問題であるが、今なお不明な点が多い。GPCの結果(第4図)から、分子量14,000前後の高分子プロアントシアニジンのみが特異的に消失していることがよく分かる。それ故、渋ガキの脱渋過程のように、高分子タンニンの不溶化が起こっているとも推測し、現在、グアバ適熟果の不溶性タンニンの定量方法を検討している。

一方、幼果に比べて葉(8月3日採取のもの)には10倍近いポリフェノールが含まれ、その90%以上がフラバン・タイプのポリフェノールであり、その中でも大部分がプロアントシアニジン・ポリマーであった。このことから、ポリフェノールの利用やフラボノイド系生理活性物質を探索する上では、幼果より葉の方が材料として適当であると判断した。

葉においては葉重とは関係なく、季節によって、ポリフェノール成分は量的にも質的にも変化した。特に、果実と同様に高分子タンニンの消失が顕著であった。この消失が分解によるものか、不溶化によるものか、あるいは他の部位へ転流するのか、今後の興味深い問題である。

本実験では、グアバ果実あるいは葉から、新たに(+)-カテキンと(+)-ガロカテキンをHPLCによって同定した。グアバのプロアントシアニジン・ポリマーを酸分解するとシアニジンとデルフィニジンがセルロースTLC上で検出されたことから、このポリマーはカテキンとガロカテキンから成るヘテロ・ポリマーのプロアントシアニジンであることが推定された。

現在、グアバ果実・葉の新しい利用・加工法を検討す

るために、ある種の生理活性物質の検索を進めている。

摘 要

熱帯・亜熱帯性果実の有効利用を目的としている一連の研究の中で、グアバの葉・果実に多く含まれているポリフェノールの消長と特性を検討した。

1. ポリフェノールの消長を調べる目的には、Peri と Pompei の分別定量法による分析が有用であることが分かった。

2. グアバの幼果は100g当たり約600mgの総ポリフェノールを含むが、その約68%は縮合型タンニンが占めていた。また、果実の生育に伴って急激に減少することが明らかとなった。

3. プロアントシアニジン量も果実重の増加とともに顕著に減少した。

4. GPC分析により、高分子ポリフェノールが主に減少することが分かった。

5. グアバ葉(8月3日採取のもの)には、果実に比べて約10倍量のポリフェノールが含まれていたが、その84%が縮合型タンニンであった。

6. HPLCにより、幼果と成葉の抽出物より(+)-カテキンと(+)-ガロカテキンを同定した。

以上の結果から、グアバの幼果及び葉に含まれるポリフェノールの大部分がフラバン系のポリフェノール、特に、(+)-カテキンと(+)-ガロカテキンから成る縮合型タンニン(プロアントシアニジン・ヘテロポリマー)であることが推定された。

謝 辞 供試材料を提供いただいた本学農学部附属農場指宿植物試験場の石畑清武助教、また、(+)-ガロカテキン、(-)-エピガロカテキンの標品を分譲いただいた農林水産省野菜試験場の西條了康博士に謝意を表す。

引用文献

1. CZOCHANSKA, Z., L. Y. FOO, R. H. NEWMAN and L. J. PORTER. 1980. Polymeric proanthocyanidins, stereochemistry, structural units. J. Chem. Soc., Perkin I. 2278—2286.
2. FOLIN, O. and V. CIOCALTEU. 1938. On tyrosine and tryptophane determination in proteins. J. Biol. Chem. 73: 627—650.
3. FOO, L. Y. and L. J. PORTER. 1980. The phytochemistry of proanthocyanidin polymers. Phytochemistry 19: 1747—1754.
4. FOO, L. Y. and L. J. PORTER. 1981. The structure of tannins of some edible fruits. J. Sci. Food Agric. 32: 711—716.
5. 伊藤三郎・山口 剛・大畑徳輔・石畑清武. 1980. 亜熱帯果実の品質に関する研究. II. グア

- パ果実のビタミンCと石細胞. 鹿大農学術報告. 30 : 47—54.
6. MATSUO, T. and S. ITOO. 1981. A simple and rapid purification method of condensed tannins from several young fruits. *Agric. Biol. Chem.* 45 : 1885—1887.
 7. MATSUO, T. and S. ITOO. 1981. Comparative studies of condensed tannins from several young fruits. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 50 : 262—269.
 8. 松尾友明・高津友子・伊藤三郎. 1983. 合成多孔性樹脂の園芸生産物への利用. I. ポリフェノール成分の吸着と回収. 鹿大農学術報告. 33 : 21—28.
 9. MISRA, K. and T. R. SESHAGRI. 1968. Chemical components of the fruits of *Psidium guava*. *Phytochemistry* 7 : 641—645.
 10. MOWLAH, G. and S. ITOO. 1982. Quantitative changes in guava polyphenols and the polyphenoloxidase (PPO) at different stages maturation, ripening and storage. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi.* 29 : 413—417.
 11. 中林敏郎. 1966. タンニン. 中林敏郎・木村進・加藤博通共著. 食品の変色とその化学. p. 64—115. 光琳書院. 東京.
 12. OKUDA, T., T. YOSHIDA, T. HATANO, K. YAZAKI and M. ASHIDA. 1982. Ellagitannins of the Casuarinaceae, Stachyuraceae and Myrtaceae. *Phytochemistry* 21 : 2871—2874.
 13. PERI, C. and C. POMPEI. 1971. Estimation of different phenolic groups in vegetable extracts. *Phytochemistry* 10 : 2187—2189.
 14. SESHADRI, T. R. and K. VASISHTA. 1964. Polyphenolic components of guava fruits. *Current Science* 33 : 334—335.