



УДК 535.3

© 2009

Н. В. Башмакова, Р. О. Жураківський, С. Ю. Кутовий,
В. М. Ящук, Л. А. Заїка, член-кореспондент НАН України
Д. М. Говорун

Раманівський спектр берберину та його інтерпретація квантово-механічним методом функціонала густини

За кімнатної температури отримано раманівський спектр мікрокристалічного хлориду берберину та проведено його інтерпретацію методом функціонала густини на рівні теорії DFT B3LYP/6-311++G(d, p) в області частот 1000–1700 см⁻¹. Спостережено добру кореляцію між експериментальними та розрахованими частотами коливань.

Природний алкалоїд берберин здавна застосовується у медицині для лікування багатьох захворювань. Так, зокрема, препарати берберину проявляють протівірусні та протимікробні властивості. Крім того, берберин впливає на метаболізм пухлинних клітин, безповоротно їх руйнуючи; при цьому токсичність препаратів на його основі відносно низька, а у вилікуваного організму виробляється імунітет проти повторного захворювання [1, 2]. Таку активність алкалоїду пов'язують із його здатністю вбудовуватися у макромолекулу ДНК, блокуючи процеси транскрипції та реплікації. Іншою важливою мішенню протипухлинних препаратів берберину є ДНК-топоізомераза, яку він здатний інгібувати, спричиняючи дисоціацію її комплексу з ДНК [3].

Для пояснення механізмів терапевтичної дії берберину необхідно знати механізми його комплексоутворення з ДНК. Раніше методами раманівської спектроскопії нами зафіксовано цікавий факт резонансної взаємодії коливань берберину та ДНК в області перекриття їхніх спектрів [4, 5]. Для його пояснення необхідна детальна інформація про коливальні спектри берберину та ДНК.

Колівальні спектри берберину досліджували методами раманівської [6–9] та інфрачервоної спектроскопії [7], проте вичерпна інтерпретація отриманих спектрів у цих роботах відсутня. У роботах [7–9] наведено раманівські спектри берберину в області частот 600–1800 см⁻¹, отримані методами SERS та SSRS (surface-enhanced та shifted-subtracted Raman spectroscopy).

Методика реального та обчислювального експерименту. Структурна формула катіона берберину наведена на рис. 1. Природний аналог берберину міститься, в основному, в рослинах, з яких його виділяють у вигляді солей гідрохлориду або гідросульфату.

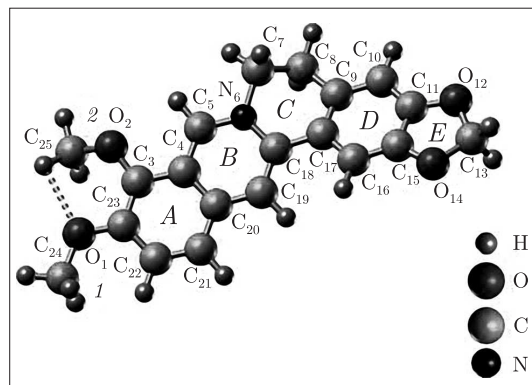


Рис. 1. Будова катіона берберину (розрахунок на рівні теорії DFT B3LYP/6-311++G(d,p))

В роботі [10] подано результати квантово-хімічного дослідження просторової будови ізомерів катіона берберину. Показано, що молекула майже плоска, відхилення від планарності спостерігається лише для частково насиченого кільця *C*. Воно набуває вигляду напівкрісла, в якому атоми *C*7 та *C*8 значно відхилені від площини ароматичних кілець *A* та *B*.

Досліджували мікрокристалічний порошок берберину, а саме — його хлорид (BeCl) (“Alps”, Японія, 407 г/Моль). Оскільки берберин як порошок жовтого кольору поглинає в області до 550 нм, то для реєстрації раманівського спектра використовували He-Ne-лазер ($\lambda = 6328 \text{ \AA}$) з потужністю на зразку ~ 10 мВт. Деякі спектри отримано за допомогою Kr-лазера ($\lambda = 6471 \text{ \AA}$) з потужністю на зразку $\sim 60\text{--}80$ мВт. Раманівські спектри збуджували в 45° -геометрії на відбивання і реєстрували подвійним монохроматором ДФС-24 із роздільною здатністю $1,5 \text{ cm}^{-1}$. Для покращення співвідношення сигнал/шум час накопичення в точці становив $\sim 1,6$ с. В окремих випадках експериментальні спектри для уточнення положення складових смуг, їхніх плечей тощо обробляли з використанням програми PeakFit.

Геометричну структуру катіона берберину отримано на рівні теорії DFT B3LYP/6-311++G(d, p) без жодних структурних обмежень; на цьому ж рівні теорії розраховано у гармонійному наближенні його раманівський спектр. Зауважимо, що в оптимізованій структурі вперше знайдено внутрішньомолекулярний водневий зв'язок $\text{SH} \dots \text{O}$ між метоксильними групами OCH_3 берберину. Існування зв'язку визначено за наявністю критичної точки типу (3, -1) на розподілі електронної густини за методом AIM [11]. Даний аналіз проводили за допомогою програми AIM-2000. Для квантово-механічних розрахунків використано програмний пакет “Gaussian03” для платформи Win32 [12], який надано як грант корпорацією “Gaussian” (США).

Оскільки метод DFT зазвичай завищує значення частот, то для порівняння з експериментальними даними використано масштабний множник 0,985, який гарантує найкращу відповідність теорії з експериментом. Значення частот з урахуванням цього множника та їхню інтерпретацію наведено в табл. 1. Розрахований раманівський спектр катіона берберину подано на рис. 2.

Результати та обговорення. Кристал берберину має триклинну симетрію ($P1$, $z = 2$) [13]. Внаслідок низької симетрії в експериментальному і розрахованому спектрах вроджених коливань немає, відповідність між “кристалічними” та “молекулярними” модами досить однозначна, найсуттєвіша відмінність між спектрами вільного та кристалічного бер-

Таблиця 1. Експериментальні та розраховані (масштабний множник 0,985) значення частот коливань та їхня інтерпретація

| Експеримент | | | Розрахунок | | Інтерпретація коливань |
|-------------|-----------|-----------|----------------------|---------|---|
| Дані [6, 9] | Авт. дані | | з кореляцією (0,985) | | |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| — | 731 | 727 | 728 | (0,09) | $\rho(\text{CH}_3)$; ρ , $\tau(\text{CH}_2)$ к. С; $f(\text{CH}_2)$ к. Е; площинні ν - δ всіх кілець; ν , $\delta(\text{CNC})$; $\delta(\text{COC})$ |
| ... | ... | ... | ... | ... | ... |
| — | — | 970 | 970 | (0,02) | слабі неплщинні к. А (C21-H, C22-H) |
| — | — | — | 994 | (vw) | $\rho(\text{CH}_3(2))$; $\nu(\text{O1-CH}_3)$; f , $\tau(\text{CH}_2)$ к. С; $f(\text{CH}_2)$ к. Е; сильні ν - δ всіх кілець |
| — | — | — | 1037 | (vw) | сильні $\nu\delta(\text{O-CH}_2\text{-O})$ к. Е та ν - δ к. D; неплщинні $\rho f(\text{CH}_2)$ к. С; слабі інших кілець |
| — | 1044 | — | 1050 | (vw) | $u(\text{CH}_3)$; неплщинні $\rho f(\text{CH}_2)$ к. С; $f(\text{CH}_2)$ к. Е; ν - δ всіх кілець |
| — | 1067 | — | 1070 | (vw) | $u(\text{CH}_3)$; $\nu(\text{O-CH}_3)$; неплщинні $\rho(\text{CH}_2)$ к. С; $f(\text{CH}_2)$ к. Е; ν - δ всіх кілець |
| — | — | 1104 | 1107 | (0,03) | u , $\rho(\text{CH}_3)$; $f(\text{CH}_2)$; $\nu(\text{O-CH}_3)$, $\nu(\text{C-OCH}_2)$ обох пар груп; площинні ν - δ всіх кілець; Н — площинні |
| — | — | — | 1117 | (vw) | неплщинні сильні $\rho(\text{CH}_2)$ та слабі атомів О к. Е; слабі ν - δ всіх кілець |
| 1118 | — | 1119 | 1122 | (0,06) | u , $\rho(\text{CH}_3)$; неплщинне $\rho f(\text{CH}_2)$ к. Е; $\nu(\text{O-CH}_3)$, $\nu(\text{C-OCH}_2)$, $\nu(\text{N-CH}_2)$, $\nu(\text{C7-CH}_2)$ к. С; δ всіх кілець; Н — площинні та неплщинні |
| 1144 | — | 1144 | 1146 | (0,05) | сильні $\nu(\text{N-CH}_2)$, $\delta(\text{C5NC18})$; ν - δ кілець А, В, С та атомів Н в зв'язках С-Н; к. Е жорстке |
| — | — | — | 1148 | (vw) | сильні $\rho(\text{CH}_3(1))$, інші слабі; |
| — | — | — | 1149 | (0,01) | сильні $\rho(\text{CH}_3(2))$, інші слабі |
| пл. | — | 1174 | 1172 | (0,04) | різноамплітудні $\rho(\text{CH}_3)$; τ , $f(\text{CH}_2)$ к. С; $\tau(\text{CH}_2)$ к. Е; |
| — | — | — | 1175 | (0,005) | δ -коливання к. D, спряжені з ν -коливаннями к. С; |
| — | — | — | 1181 | (0,02) | $\delta(\text{C7NC18})$; δ -коливання кілець А, В; |
| — | — | 1187,5 см | 1187,5 | (0,04) | (1181 сильні лише $\rho(\text{CH}_3)$, 1187 — $\tau(\text{CH}_2)$ к. Е) |
| — | — | — | 1201 | (0,04) | $\rho(\text{CH}_3)$; $\tau(\text{CH}_2)$ (к. С — сильні, к. Е — слабі); сильні $\nu(\text{N-C7}$, $\text{N-C18})$ та $\delta(\text{C17C9C8})$; слабі ν всіх кілець |
| 1203 | 1206 | 1206 | 1206,5 | (0,25) | $\rho(\text{CH}_3)$; $\tau(\text{CH}_2)$ (к. С — сильні, к. Е — слабі); ν - δ всіх кілець; атоми Н кілець — в площині |
| — | — | 1222 | 1219,5 | (0,11) | $u(\text{CH}_3)$ (1-слабі); $\tau(\text{CH}_2)$ к. С; $f(\text{CH}_2)$ к. Е $\nu(\text{O(1,2)-C})$; |
| 1235 | 1237 | 1236 | 1233 | (0,13) | $\delta(\text{OCO})$ к. Е; ν - δ всіх кілець (1219-спад від А-D; 1233 — навпаки) |
| — | — | — | 1241,5 | (vw) | $\rho(\text{CH}_3)$; $\tau(\text{CH}_2)$ к. С; слабі $f(\text{CH}_2)$ к. Е; ν - δ всіх кілець та О, N |
| пл. | — | 1257 пл. | 1260 | (0,03) | слабі ρ , $u(\text{CH}_3)\tau(\text{CH}_2)$ к. С; $f(\text{CH}_2)$ к. Е; ν - δ всіх кілець (кілець В, С, D, Е — сильні) |
| 1276 | 1280 | 1280,5 | 1280 | (0,13) | ρ , $u(\text{CH}_3)$; слабі τ , $f(\text{CH}_2)$ к. С; слабі $f(\text{CH}_2)$ к. Е; ν - δ всіх кілець (к. А, В — сильні) |
| — | — | 1295 | 1285,5 | (0,18) | ρ , $u(\text{CH}_3)$; сильні $f(\text{CH}_2)$ к. С; слабі $\delta(\text{CH}_2)$ к. Е; ν - δ всіх кілець (кілець С, D, Е — сильні) |
| — | — | 1303 | 1302 | (vw) | $u(\text{CH}_3)$; $\tau(\text{CH}_2)$ к. С, слабі $f(\text{CH}_2)$ к. Е; ν - δ всіх кілець (кілець А, В — сильні) |
| пл. | — | 1333 пл. | 1337 | (0,14) | $u(\text{CH}_3)$; f , f або f , $\tau(\text{CH}_2)$ к. С, $f(\text{CH}_2)$ к. Е; |
| 1342 | 1340 | 1346 | 1345,5 | (0,08) | ν - δ всіх кілець (1337 — сильні, 1352 — слабі); |
| — | — | — | 1352 | (0,02) | |

Таблиця 1. Продовження

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|----------------|----------------|-------------------|----------------------|----------------------------|---|
| 1361 — | 1367 — | 1367 1385 пл. | 1367 1384,5 | (0,10) (0,07) | p(CH ₃); f, τ(CH ₂) к. С, f(CH ₂) к. Е; ν-δ коливання всіх кілець (1384-співмірні, 1367 — спад від А до Е) |
| 1397 — | 1397 — | 1397 1410 | 1397,5 1408,5 | (1,0) (0,06) | p(CH ₃), p(CH ₂); площинні ν-δ-коливання атомів С, N, О, Н всіх кілець сильні f(CH ₂) к. Е, слабші — к. С; слабкі u(CH ₃); ν-δ коливання всіх кілець |
| 1424 | 1425 | 1424 | 1426 | (0,10) | u(CH ₃)-сильні (2); f(CH ₂); О — практ. нерухомі; сильні ν-δ коливання всіх кілець |
| 1449 — — | 1447 — — | 1448 — 1460 | 1452 1457 1458 | (0,05) (0,06) (0,12) | u(CH ₃): 1457-сильні (1); δ(CH ₂); ν-δ коливання всіх кілець (1452-сильні, 1457-слабі), кілець С, D, Е (1458) |
| пл. | — | 1466 | 1466 | (0,02) | δ(CH ₃): 2-сильні, 1-слабі |
| — | — | 1472 | 1467,5 | (0,10) | u(CH ₃); δ(CH ₂) к. С; |
| — | — | — | 1471 | (0,01) | ν-δ коливання кілець А, В, С |
| пл. | — | 1475 см. | 1476 | (0,01) | різноамплітудні δ(CH ₃); |
| — | — | — | 1478 | (vw) | слабі коливання сусіднього к. А |
| — | — | 1487 | 1479 | (0,02) | |
| 1501 | 1499 | 1500 | 1496 | (0,37) | u(CH ₃); δ(CH ₂) кілець Е та С; ν-δ коливання к. D (сильні), кілець А, В (слабі) |
| 1518 — | 1520 — | 1518 | 1513,5 1515 | (0,73) (0,66) | u, δ(CH ₃); δ(CH ₂); різноамплітудні площинні ν-δ-коливання атомів С, N, О, Н всіх кілець |
| — | — | 1532 пл | 1522,5 | (0,03) | сильні δ(CH ₂) к. Е, слабші ν-коливання кілець Е, D, слабкі інших кілець |
| 1568 | 1569 | 1566 | 1564,5 | (0,2) | u(CH ₃): сильні (2), слабкі (1); сильні площинні ν-δ коливання кілець А, В (вкл. С18-N та гр. С7Н ₂ к. С) |
| — | — | 1613 | 1609,5 | (0,05) | площинні ν-δ коливання атомів С, О, Н, N всіх кілець; |
| пл | — | 1623 | 1618 | (0,18) | слабі u, p(CH ₃); τ(CH ₂) к. С, f(CH ₂) к. Е; |
| 1626 | 1622 | 1624 | 1625 | (1,33) | 1609: сильні всіх кілець; О — практ. нерухомі; 1618: сильні коливання — кілець А, D; N — нерухомий; 1625: сильні коливання — кілець D, N — коливається |
| пл | 1633 | 1635 | 1634 | (0,12) | площинні ν-δ коливання атомів С, N, О, Н всіх кілець (сильні — кілець В, С, D, слабкі — гр.(СН ₂); гр.(ОСН ₃) — нерухомі) |

Примітка. В дужках біля значень частот наведено відносну інтенсивність ліній (інтенсивність моди 1397 см⁻¹ прийнято за 1). Моди з відносною інтенсивністю, нижчою за 0,01, позначені “vw” (дуже слабкі). Скорочення: см. — смуга; пл. — плече смуги; “слабі” та “сильні” коливання — коливання з малою та великою амплітудою, відповідно; к. — кільце; ν — валентні коливання; δ — деформаційні (для СН₂-груп — те ж, що і ножицеві коливання); τ — торсійні; ν-δ — частина атомів С в кільці реалізують ν-коливання, інші — δ; для СН₂ — груп: f — віялові; p — маятникові (атоми коливаються в одній площині); для СН₃-груп: u — парасолькові (симетричні δ-коливання); p — маятникові (атоми коливаються в паралельних площинах); для τ-, f-, p-коливань зберігається жорсткість груп СН₃, СН₂.

берину має проявитися лише в області дуже низьких частот (так звані зовнішні коливання, при $z = 2$ їх три), в області середніх та високих частот (внутрішні коливання) вплив кристалічної структури проявляється слабо, має місце подвоєння (оскільки $z = 2$) кількості частот (розщеплення незначне, практично ним можна знехтувати), а також деяке зміщення частот коливальних смуг.

Таким чином, на нашу думку, порівняння експериментального раманівського спектра мікрористалічного берберину з розрахованим спектром катіона берберину в актуальній

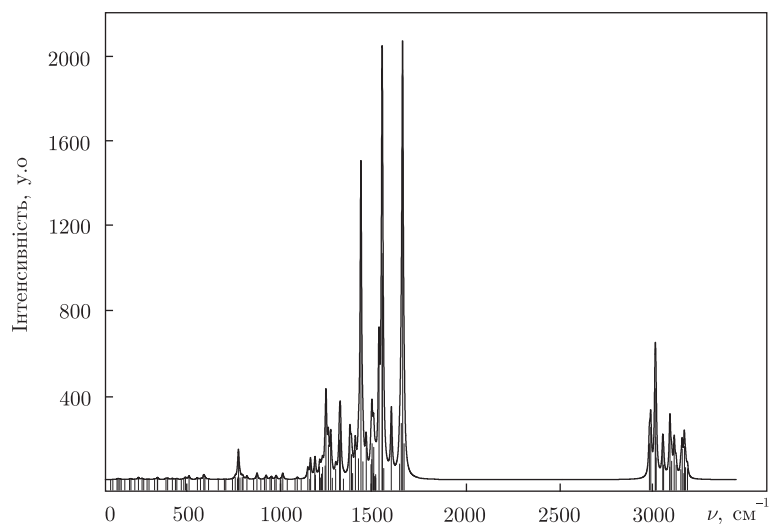


Рис. 2. Раманівський спектр катіона берберину за даними розрахунків на рівні теорії DFT B3LYP/6-311++G(d,p)

області від 600 см^{-1} і вище є досить коректним, що і підтвердив подальший аналіз. Експериментальні та розраховані (з масштабним множником) значення частот коливань, а також їхню інтерпретацію наведено в табл. 1. У даному випадку нас більше цікавила область $1000\text{--}1700\text{ см}^{-1}$, оскільки в ній коливання берберину найбільш інтенсивні [4, 5], саме в цій області спостерігається резонансна взаємодія коливань берберину та ДНК (підсилення на порядки) при реєстрації раманівського спектра водної суміші берберин — ДНК.

На рис. 3, *a* наведено необроблений (лише дещо згладжено рівень шумів) раманівський спектр берберину (мікрокристалічний порошок) при збудженні лінією 6328 А , зареєстровано більше двох десятків коливальних мод в області $1000\text{--}1700\text{ см}^{-1}$, спостерігається добра відповідність між нашими даними і даними [6, 9] (див. табл. 1), де подано досить якісні раманівські спектри (в [9] — FT Raman) берберину для області $1000\text{--}1700\text{ см}^{-1}$; на жаль, в супровідних таблицях [6, 9] вказано частоти лише найінтенсивніших смуг спектра, інтерпретація коливальних мод відсутня або неповна та неадекватна. Відзначимо, що наведені в [7–9] раманівські спектри берберину в області $600\text{--}1800\text{ см}^{-1}$, одержані методами SERS та SSRS, не повністю придатні для коректного порівняння експериментального і розрахованого спектрів. Також зазначимо, що реєстрації раманівських спектрів майже не заважала люмінесценція берберину, яка в цьому діапазоні має незначну інтенсивність [14], на відміну від інших ізохінолінових алкалоїдів з подібною до берберину структурою [15].

На рис. 3, *b* наведено розрахований спектр КРС молекули берберину для області частот $1000\text{--}1700\text{ см}^{-1}$ з урахуванням частотного масштабного множника.

Розрахований спектр містить 123 (3·43–6) невироджені коливання катіона $[\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{NO}_4]^+$, 105 з них лежать в області $20\text{--}1700\text{ см}^{-1}$ (48 з них — в актуальній області $1000\text{--}1700\text{ см}^{-1}$), інші 18 — в області $3000\text{--}3300\text{ см}^{-1}$. Частоти до 720 см^{-1} відповідають неплосинним коливанням кілець і приєднаних до них груп, починаючи з 720 см^{-1} з'являються площинні коливання кілець (зокрема, єдина досить інтенсивна мода 727 см^{-1} поза областю $1200\text{--}1650\text{ см}^{-1}$), характерні для всієї області до 1700 см^{-1} . Високочастотна область $3000\text{--}3300\text{ см}^{-1}$ містить моди, що відповідають коливанням зв'язків C–H, з незначними зміщеннями інших атомів, переважно C.

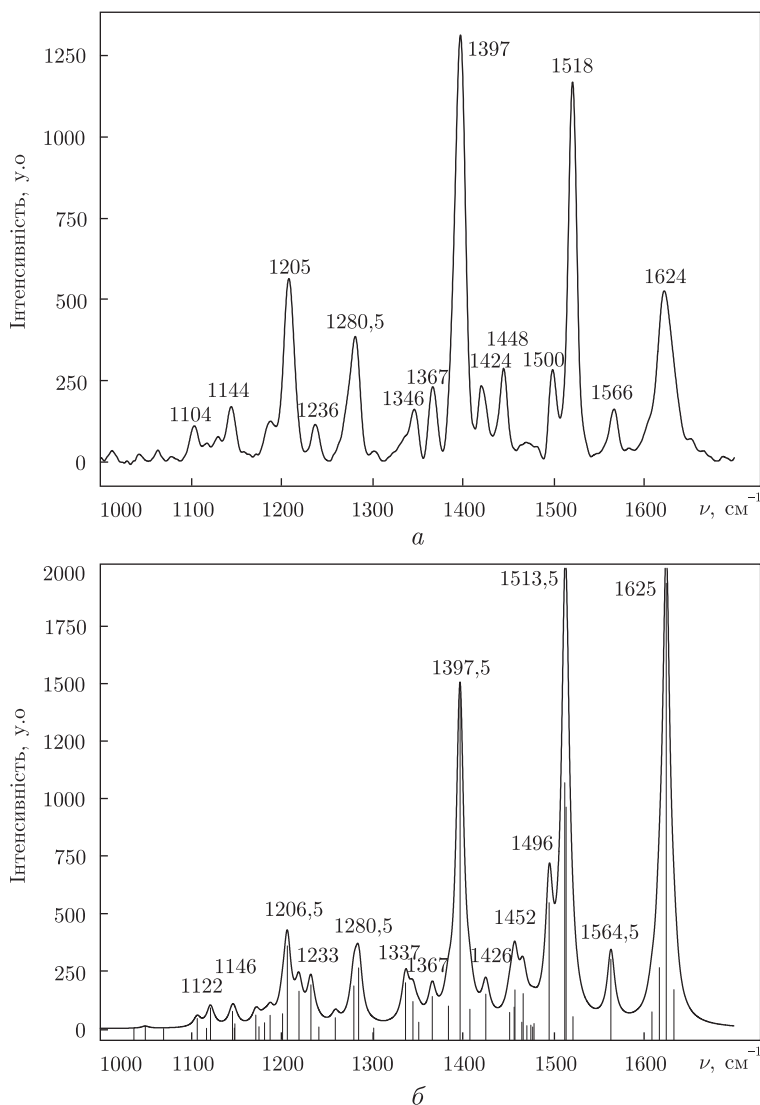


Рис. 3. Раманівський спектр берберину в області частот $1000\text{--}1700\text{ см}^{-1}$: *a* — експериментальний, $\lambda_{36} = 6328\text{ Å}$; *b* — розрахований

В цій області спостерігається добра кореляція між розрахованим та експериментальним спектром. В області до 1000 см^{-1} , крім моди 727 см^{-1} , інтенсивність розрахованих коливань незначна (нижча на 2–4 порядки), що відповідає експериментальним даним.

Відзначимо, що деякі дуже слабоінтенсивні, за даними розрахунку, моди (наприклад, 1302 см^{-1}) проявилися і в експериментальному спектрі. Також зауважимо, що три найінтенсивніші (експериментальні) моди пов'язані з сильними, переважно валентними коливаннями атомів C, N кілець.

Таким чином, квантово-механічним методом на рівні теорії DFT B3LYP/6-311++G(d, p) розраховано раманівський спектр катіона берберину. Результати розрахунків добре корелюють з експериментальними даними, отриманими для мікрокристалічного хлориду берберину для актуальної з точки зору взаємодії берберину з ДНК області частот $1000\text{--}1700\text{ см}^{-1}$. Метод DFT з достатньою надійністю може бути також використаний для розрахунку коли-

вальних спектрів інших ізохінолінових алкалоїдів, для яких отримання експериментальних спектрів з тих чи інших причин утруднене або й взагалі неможливе.

1. *Потопальский А. И.* Препараты чистотела в биологии и медицине. – Киев: Наук. думка, 1992. – 240 с.
2. *Grycova L., Dostal J., Marek R.* Quaternary protoberberine alkaloids // *Phytochemistry*. – 2007. – **68**, No 2. – P. 150–175.
3. *Li T.-K. E., Bathory E., La Voie E. J. et al.* Human topoisomerase I poisoning by protoberberines: potential role for both drug-DNA and drug-enzyme interactions // *Biochemistry*. – 2000. – **39**. – P. 7107–7116.
4. *Кутовий С. Ю., Пащенко В. Г., Заїка Л. А.* Прояв в спектрах КРС впливу препарату берберину на ДНК // *Вісн. Київ. ун-ту, Сер. фіз.-мат. науки*. – 2005. – № 7. – С. 12–16.
5. *Ящук В. М., Кутовий С. Ю., Башмакова Н. В. та ін.* Прояв у спектрах фотолюмінесценції та КРС впливу препарату берберину на ДНК // *Наук. зап. КМА*. – 2007. – **51**. – С. 42–48.
6. *Bell I. M., Clark R. J. H., Gibbs P. J.* Raman Spectroscopic Library of Natural and Synthetic Pigments. <http://www.chem.ucl.ac.uk/resources/raman/speclib.html>.
7. *Streckal N. D., Motevich I. G., Nowicky J. W., Maskevich S. A.* IR absorption and surface-enhanced Raman spectra of the isoquinoline alkaloid berberine // *J. Appl. Spectroscopy*. – 2007. – **74**, No 1. – P. 31–37.
8. *Bell S. E., Bourguignon E. S. O., O'Grady A. et al.* Extracting Raman spectra from highly fluorescent samples with “scissors” (SSRS, shifted-subtracted Raman spectroscopy) // *Spectroscopy Europe*. – 2002. – **14**, No 6. – P. 17–20.
9. *Leona M., Lombardi J. R.* Identification of berberine in ancient and historical textiles by surface-enhanced Raman scattering // *J. Raman Spectroscopy*. – 2007. – **38**. – P. 853–858.
10. *Danilov V. I., Danilidonis V. V., Hovorun D. M. et al.* Berberine alkaloid: quantum chemical study of different forms by the DFT and MP2 methods // *Chem. Phys. Lett.* – 2006. – **430**. – P. 409–413.
11. *Бейдер П.* Атомы в молекулах. Квантовая теория. – Москва: Мир, 2001. – 532 с.
12. *Gaussian 03, Revision C. 02*, Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2004.
13. *Kariuki B. M., Jones W.* Five salts of berberine // *Acta Cryst.* – 1995. – **C51**. – P. 1234–1240.
14. *Yashchuk V. M., Dudko O. V., Zaika L. A. et al.* The luminescent manifestation of the DNA-amitozine alkaloid interaction // *J. of Mol. Liquids*. – 2005. – **120**. – P. 147–149.
15. *Bashmakova N. V., Kutovyy S. Yu., Yashchuk V. M. et al.* Optical spectroscopy studies of the interaction between a number of plant alkaloids and the DNA double helix in an aqueous solution // *Ukr. J. Phys.* – 2009. – **54**. – P. 471–479.

Київський національний університет

ім. Тараса Шевченка

Інститут молекулярної біології і генетики

НАН України, Київ

Надійшло до редакції 16.04.2009

**N. V. Bashmakova, R. O. Zhurakivsky, S. Yu. Kutovyy, V. M. Yashchuk,
L. A. Zaika**, Corresponding Member of the NAS of Ukraine **D. M. Hovorun**

Raman spectra of berberine: experimental and quantum-mechanical interpretation by the DFT method

Raman spectra of microcrystalline berberine chloride have been obtained at room temperature. The quantum-mechanical interpretation of the spectra was performed by the DFT B3LYP/6-311++G(d, p) method in the range of 1000–1700 cm⁻¹. The experimental and calculated spectra of intramolecular vibrations are in good agreement.