

HPLC 波长切换法同时测定益安宁丸中 7 种活性成分

张文宗, 张 璞

河南中医药大学, 河南 郑州 450046

摘要:目的 建立 HPLC 波长切换法同时测定益安宁丸中 7 种活性成分的方法。方法 采用 HPLC 法, 同时测定益安宁丸中三七皂苷 R₁、五味子醇甲、丹酚酸 B、五味子酯甲、人参皂苷 Rg₁、人参皂苷 Rb₁、丹参酮 II_A 的含量, 采用 Shim-pack GIST-C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-0.1%磷酸水溶液, 梯度洗脱: 0~5 min, 5%乙腈; 5~12 min, 5%~12%乙腈; 12~17 min, 12%~20%乙腈; 17~30 min, 20%乙腈; 30~36 min, 20%~50%乙腈; 36~45 min, 50%~80%乙腈; 45~70 min, 80%乙腈; 检测波长 203 nm (三七皂苷 R₁、人参皂苷 Rg₁、人参皂苷 Rb₁)、220 nm (五味子酯甲)、250 nm (五味子醇甲)、268 nm (丹酚酸 B) 和 270 nm (丹参酮 II_A), 体积流量 1.0 mL/min, 柱温 35 °C, 进样量 10 μL。**结果** 三七皂苷 R₁、五味子醇甲、丹酚酸 B、五味子酯甲、人参皂苷 Rg₁、人参皂苷 Rb₁、丹参酮 II_A 检测质量浓度的线性范围分别为 0.015~0.150、0.077~0.766、0.006~0.062、0.009~0.092、0.050~0.503、0.067~0.670、0.011~0.108 mg/mL; 平均加样回收率分别为 99.5%、99.8%、99.2%、98.9%、96.9%、98.8%、97.1%。**结论** 该方法简单、有效、结果准确, 可用于益安宁丸中上述 7 种活性成分的同时测定。

关键词: HPLC; 波长切换法; 益安宁丸; 三七皂苷 R₁; 五味子醇甲; 丹酚酸 B; 五味子酯甲; 人参皂苷 Rg₁; 人参皂苷 Rb₁; 丹参酮 II_A

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)08-1947-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.08.026

Simultaneous determination of seven constituents in Compound Yi'anning Pills by HPLC coupled with wavelength switching method

ZHANG Wen-zong, ZHANG Pu

Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China

Abstract: Objective To establish an HPLC method for the simultaneous content determination of seven constituents in Compound Yi'anning Pills (CYP). **Methods** The determination was performed on Shim-pack GIST C₁₈ column with mobile phase consisted of acetonitrile-0.1% phosphoric acid (gradient elution: 0—5 min, 5% acetonitrile; 5—12 min, 5%—12% acetonitrile; 12—17 min, 12%—20% acetonitrile; 17—30 min, 20% acetonitrile; 30—36 min, 20%—50% acetonitrile; 36—45 min, 50%—80% acetonitrile; 45—70 min, 80% acetonitrile) at the flow rate of 1.0 mL/min. The detection wavelength was set at 203 nm for notoginsenoside R₁, ginsenoside Rg₁, and ginsenoside Rb₁, 220 nm for schisantherin A, 250 nm for schisandrin, 268 nm for salvianolic acid B, and 270 nm for tanshinone II_A. The column temperature was set at 35 °C and the injection volume was 10 μL. **Results** The linear range of detection concentration was 0.015—0.150 mg/mL for notoginsenoside R₁, 0.077—0.766 mg/mL for schisandrin, 0.006—0.062 mg/mL for salvianolic acid B, 0.009—0.092 mg/mL for buddleiodide, 0.050—0.503 mg/mL for ginsenoside Rg₁, 0.067—0.670 mg/mL for ginsenoside Rb₁, and 0.011—0.108 mg/mL for tanshinone II_A. Average recoveries respectively were 99.5%, 99.8%, 99.2%, 98.9%, 96.9%, 98.8%, and 97.1%. **Conclusion** The method is simple, effective, and accurate, which can be used for simultaneous determination of seven active constituents in CYP.

Key words: HPLC; wavelength switching method; Yi'anning Pills; notoginsenoside R₁; schisandrin; salvianolic acid B; schisantherin A; ginsenoside Rg₁; ginsenoside Rb₁; tanshinone II_A

收稿日期: 2019-01-08

基金项目: 河南省高等学校重点科研项目 (13A360587)

作者简介: 张文宗 (1971—), 河南浚县人, 博士, 副教授/副主任医师, 研究方向为中医药对心血管疾病的防治。

Tel: 15038093610 E-mail: uc15iok@163.com

益安宁丸由西洋参、石斛、冬虫夏草、鳖甲、鹿茸、五味子、鸡内金、龟板、西红花、三七、灵芝、蛇胆、丹参、海马 14 味名贵地道动植物药材制成,为独家生产药品,具有补气活血、益肝健肾和养心安神之功效^[1],是一种治疗冠心病的药物^[2],并且对于心脏搭桥术后的恢复、慢性疲劳综合征^[3]、心律不齐和心力衰竭^[4]都有很好的疗效。西洋参具有补气养阴、清热生津功效,含有丰富的人参皂苷类成分,其中野生西洋参中人参皂苷 Rb₁ 含量最高,其次是人参皂苷 Rg₁ 和人参皂苷 Re^[5-7];五味子可以收敛固涩、益气生津和补肾宁心^[8-9],研究表明,五味子还具有调节免疫^[10-11]、抗肿瘤^[12]等功效,其果实、根、茎、叶等多种部位均具有药用价值,含有木脂素和挥发性物质,其中木脂素为其主要活性成分,代表性化合物有五味子乙素、五味子酯甲、五味子甲素、五味子酯乙和五味子醇乙等^[13-14];三七具有散瘀止血和消肿定痛等功效,主要含有皂苷类成分和多糖化合物,其中活性成分主要为三七皂苷 R₁、人参皂苷 Rg₁ 和人参皂苷 Rb₁^[15-19];丹参具有活血祛瘀、通经止痛、清心除烦和凉血消痈等功效,主要化学成分有丹参酮、丹酚酸类、挥发油及无机元素等^[20],其中以水溶性丹酚酸 B 和脂溶性丹参酮 II_A 最具代表性,发挥临床药理作用。

中药是我国的瑰宝,内含丰富和复杂化学成分,作用到不同靶向位置联合发挥临床疗效,合理、全面的质量评价方式是正确评价中药质量发展趋势。益安宁丸的现行标准中仅以人参和三七药材中人参皂苷 Rg₁、Re、Rb₁ 及三七皂苷 R₁ 做定量质控要求,其他部分药材只做定性要求,益安宁丸有效成分分析方面也有报道^[21-23],但同时测定方法尚未见报道。本研究采用 HPLC 波长切换法同时测定益安宁丸中三七皂苷 R₁、丹酚酸 B、五味子醇甲、五味子酯甲、人参皂苷 Rg₁、人参皂苷 Rb₁ 和丹参酮 II_A 7 种活性成分,该方法准确、简单、实用,为客观、全面评价益安宁丸质量提供参考依据。

1 仪器与试剂

2695 高效液相色谱仪,配 2998 二极管阵列检测器,美国 Waters 公司;XPE-26 电子分析天平,瑞士 Mettler-Toledo 公司;SK250H 超声仪,上海科导超声仪器有限公司;Milli-QAcademic 超纯水系统,美国默克密理博公司。

益安宁丸市售,每 18 丸质量 3.1 g,批号分别为 20171102、20171105、20180301、20180302、

20180501、20180503、20180511、20180602、20180701、20180901,同溢堂药业有限公司(香港独资)生产。对照品三七皂苷 R₁ (批号 110745-201619,质量分数 95.0%)、五味子酯甲 (批号 110857-201513,质量分数 99.9%)、人参皂苷 Rg₁ (批号 110703-201731,质量分数 93.6%)、丹酚酸 B (批号 111562-201716,质量分数 94.1%)、五味子酯甲 (批号 111529-201706,质量分数 95.3%)、人参皂苷 Rb₁ (批号 110704-201726,质量分数 91.1%)、丹参酮 II_A (批号 110766-201520,质量分数 98.9%) 均来源于中国食品药品检定研究院;甲醇和乙腈均为色谱纯,其他试剂均为分析纯,水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件^[14]

色谱柱为 Shim-pack GIST C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相为乙腈-0.1%磷酸水溶液,梯度洗脱:0~5 min, 5%乙腈;5~12 min, 5%~12%乙腈;12~17 min, 12%~20%乙腈;17~30 min, 20%乙腈;30~36 min, 20%~50%乙腈;36~45 min, 50%~80%乙腈;45~70 min, 80%乙腈;检测波长:0~12 min, 203 nm (三七皂苷 R₁), 12~18 min, 250 nm (五味子醇甲), 18~24 min, 203 nm (人参皂苷 Rg₁), 24~28 min, 268 nm (丹酚酸 B), 28~40 min, 220 nm (五味子酯甲), 40~55 min, 203 nm (人参皂苷 Rb₁), 55~70 min, 270 nm (丹参酮 II_A);体积流量 1.0 mL/min;进样量 10 μL;柱温为 35 ℃。

2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液 精密称取三七皂苷 R₁、五味子醇甲、人参皂苷 Rb₁、丹酚酸 B、五味子酯甲、人参皂苷 Rg₁ 和丹参酮 II_A 对照品各适量,加 70% 甲醇制成含三七皂苷 R₁ 150 μg/mL、五味子醇甲 766 μg/mL、人参皂苷 Rg₁ 503 μg/mL、丹酚酸 B 62 μg/mL、五味子酯甲 92 μg/mL、人参皂苷 Rb₁ 670 μg/mL、丹参酮 II_A 108 μg/mL 的混合对照品溶液,混匀,0.45 μm 滤膜滤过,室温保存,备用。

2.2.2 供试品溶液 取益安宁丸 18 丸,研细,取细粉约 1.0 g,精密称定,置具塞三角烧瓶中,加入 70% 甲醇 30 mL,称定质量,超声处理(功率 250 W,频率 50 kHz) 60 min,放冷,再称定,用 70% 甲醇补足减失质量,摇匀,0.45 μm 滤膜滤过,即得。

2.3 系统适用性试验

在“2.1”项色谱条件下,精密取混合对照品溶

液和供试品溶液各适量进样测定, 结果见图 1。结果表明各成分与前后峰分离完全, 分离度均大于 1.5, 7 个目标化合物色谱峰对称性良好, 对称因子在 0.95~1.23, 理论塔板数以各成分计均大于 6 000。

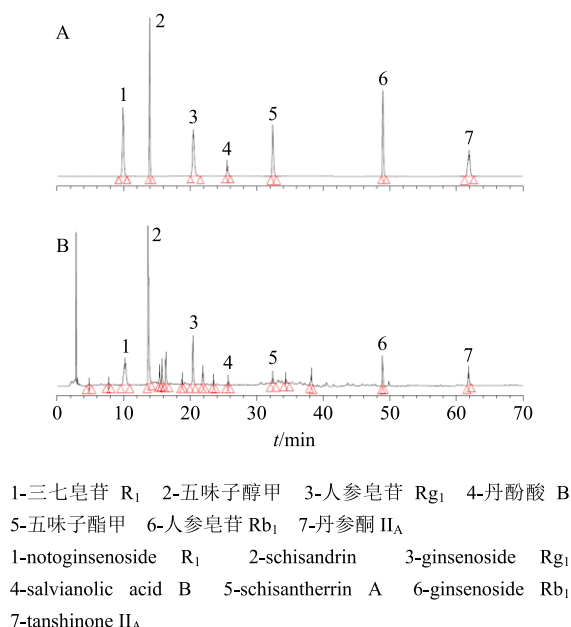


图 1 混合对照品溶液 (A) 和益安宁丸供试品溶液 (B) 的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC of mixed reference substances (A) and CYP test sample (B)

2.4 线性关系考察

精密吸取“2.2.1”项下混合对照品溶液 0.1、2.0、5.0、8.0、10.0 mL, 分别置于 5 个 10 mL 量瓶中, 加 70% 甲醇溶液稀释至刻度, 摇匀, 制成系列质量浓度混合对照品溶液, 按“2.1”项下色谱条件进样分析, 记录色谱图。以对照品质量浓度为横坐标 (X), 峰面积积分值为纵坐标 (Y), 进行线性回归, 绘制标准曲线, 计算回归方程和相关系数, 同时逐步稀释已知质量浓度的对照品溶液, 以信噪比 (S/N) 为 3 时确定检测限, S/N 为 10 时确定定量限, 结果见表 1。结果显示, 7 种化合物线性关系良好, 符合含量测定要求。

2.5 精密度试验

精密取混合对照品溶液适量, 按“2.1”项色谱条件, 连续进样 6 针, 记录色谱图峰面积。结果三七皂苷 R₁、五味子醇甲、丹酚酸 B、五味子酯甲、人参皂苷 R_{g1}、人参皂苷 R_{b1} 和丹参酮 II_A 峰面积的 RSD 分别为 0.5%、0.2%、0.8%、0.7%、0.4%、0.3%、0.6%, 表明仪器精密度良好。

2.6 稳定性试验

取“2.2.2”项下同一批供试品 (批号 20171102) 溶液适量, 按“2.1”项色谱条件, 分别于 0、2、5、8、12、18、24 h 进样, 结果三七皂苷 R₁、五味子

表 1 线性关系与检测限、定量限考察结果

Table 1 Results of linear relation, LOD, and LOQ

待测成分	回归方程	r	线性范围/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	检测限/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	定量限/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
三七皂苷 R ₁	$Y=654.13 X+35.04$	0.999 3	15~150	5.12	25.12
五味子醇甲	$Y=1\,430.78 X+104.87$	0.999 9	77~766	0.36	1.36
人参皂苷 R _{g1}	$Y=507.18 X-18.54$	0.999 2	50~503	3.84	12.81
丹酚酸 B	$Y=497.54 X+29.87$	0.999 3	6~62	12.11	40.61
五味子酯甲	$Y=784.65 X+67.21$	0.999 5	9~92	6.15	20.05
人参皂苷 R _{b1}	$Y=664.01 X-74.24$	0.999 1	67~670	5.87	16.88
丹参酮 II _A	$Y=813.54 X+48.18$	0.999 0	11~108	2.47	7.48

醇甲、丹酚酸 B、五味子酯甲、人参皂苷 R_{g1}、人参皂苷 R_{b1}、丹参酮 II_A 峰面积的 RSD 分别为 1.2%、0.5%、1.4%、1.5%、1.1%、1.2%、1.3%, 表明供试品溶液 24 h 内稳定性良好。

2.7 重复性试验

取同一批益安宁丸供试品 (批号 20171102) 粉末适量, 按“2.2.2”项下方法平行制备供试品溶液 6 份, 按“2.1”项下色谱条件测定, 记录色谱图峰面积, 计算目标化合物含量及其 RSD 值。结果三七

皂苷 R₁、五味子醇甲、人参皂苷 R_{g1}、丹酚酸 B、五味子酯甲、人参皂苷 R_{b1} 和丹参酮 II_A 质量分数平均值分别为 3.012、15.210、9.712、1.292、1.645、12.295、1.914 mg/g, RSD 分别 0.9%、0.5%、1.2%、1.5%、1.3%、0.9%、1.4%, 表明该方法重复性良好。

2.8 加样回收率试验

取已测含量的益安宁丸 (批号 20171102) 细粉 6 份, 每份精密称取 0.5 g, 分别置于具塞三角烧瓶中, 每份精密加入含三七皂苷 R₁ 1.468 mg/mL、五

味子醇甲 7.555 mg/mL、人参皂苷 R_{g1} 5.026 mg/mL、丹酚酸 B 0.600 mg/mL、五味子酯甲 0.912 mg/mL、人参皂苷 R_{b1} 6.217 mg/mL 和丹参酮 II_A 0.856 mg/mL 的混合对照品溶液 1 mL, 按“2.2.2”项下方法制备, 按“2.1”项下色谱条件测定分析, 记录色谱峰面积, 计算各目标化合物的加样回收率及 RSD 值。结果三七皂苷 R_1 、五味子醇甲、人参皂苷 R_{g1} 、丹酚酸 B、五味子酯甲、人参皂苷 R_{b1} 、丹参酮 II_A 的平均加样回收率分别为 99.5%、99.8%、

99.2%、98.9%、96.9%、98.8%、97.1%, RSD 分别为 0.6%、0.1%、0.8%、1.3%、1.2%、0.2%、1.5%。

2.9 样品测定

取制备好的益安宁丸供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件测定, 记录三七皂苷 R_1 、五味子醇甲、丹酚酸 B、五味子酯甲、人参皂苷 R_{g1} 、人参皂苷 R_{b1} 、丹参酮 II_A 的峰面积, 将峰面积代入“2.4”项线性回归方程, 计算各组分质量分数, 结果见表 2。可以看出, 各批次间各成分含量无明显差异, 说明

表 2 益安宁丸中 7 种成分测定结果 ($n=3$)

Table 2 Determination results of seven components in Yi'anling Pills by HPLC ($n=3$)

批号	质量分数/(mg·g ⁻¹)						
	三七皂苷 R_1	五味子醇甲	人参皂苷 R_{g1}	丹酚酸 B	五味子酯甲	人参皂苷 R_{b1}	丹参酮 II_A
20171102	3.012	15.211	9.717	1.292	1.644	12.294	1.914
20171105	3.041	15.255	9.765	1.278	1.688	12.292	1.869
20180301	2.943	15.239	9.735	1.295	1.673	12.248	1.873
20180302	2.977	15.216	9.688	1.287	1.685	12.324	1.906
20180501	3.016	15.268	9.754	1.291	1.694	12.304	1.904
20180503	2.984	15.207	9.746	1.287	1.662	12.294	1.897
20180511	2.994	15.207	9.728	1.293	1.681	12.307	1.891
20180602	2.976	15.238	9.773	1.294	1.724	12.287	1.906
20180701	2.987	15.242	9.778	1.292	1.633	12.382	1.903
20180901	3.085	15.285	9.779	1.289	1.719	12.327	1.882

该厂家生产的益安宁丸入药药材质量很稳定, 工艺较成熟, 也表明该方法符合质控要求, 可用于益安宁丸的质量控制。

3 讨论

3.1 流动相的选择

益安宁丸是由多种名贵道地药材制成, 含有丰富有机和无机化合物, 在流动相选择时, 分别考察了甲醇-水、乙腈-0.1%甲酸水溶液及乙腈-0.1%磷酸水溶液作为流动相。结果甲醇-水作为流动相时, 供试品色谱图中目标化合物大多无法检测到, 且色谱峰分离不理想; 以乙腈-0.1%甲酸水溶液作为流动相时, 丹酚酸 B、人参皂苷 R_{g1} 和人参皂苷 R_{b1} 峰非常小, 无法达到定量检测要求; 而使用乙腈-0.1%磷酸水溶液作为流动相时, 各目标化合物有较好的色谱行为, 7 种活性成分色谱峰与前后峰分离完全, 峰形较佳, 故以此作为流动相。

3.2 检测波长的选择

选择最佳检测波长时, 采用 DAD 检测器在 190~400 nm 波长段对 7 种活性成分进行光谱扫描,

结果各成分最大吸收波长差异较大, 无法实现同波长同时检测目的, 所以采用仪器自带多波长分段切换方式开展研究。光谱图结合相关文献, 本研究最终选择波长为 203 nm (0~12 min, 三七皂苷 R_1 ; 18~24 min, 人参皂苷 R_{g1} ; 40~55 min, 人参皂苷 R_{b1})、250 nm (12~18 min, 五味子醇甲)、268 nm (24~28 min, 丹酚酸 B)、220 nm (28~40 min, 五味子酯甲) 和 270 nm (55~70 min, 丹参酮 II_A), 确保每个目标化合物的色谱峰均能有较好的信号强度, 保证方法的准确和实用。

3.3 有效成分含量分析

在益安宁现行质量标准中^[1], 要求每克供试品中含人参皂苷 R_{g1} 、人参皂苷 R_e 、人参皂苷 R_{b1} 及三七皂苷 R_1 的总量不得少于 14.0 mg。而本研究含量测定结果显示, 人参皂苷 R_{g1} 、人参皂苷 R_{b1} 及三七皂苷 R_1 这 3 种化合物的总量在 24.926~25.191 mg/g, 达到标准要求。而且 10 批益安宁丸含量结果显示, 每种成分含量均一, 说明样品比较稳定, 建议在今后质量标准中分类加以控制和完善, 以体

现不同药材个体质量,更准确地对益安宁丸质量做出评价。

总之,本研究建立的 HPLC 法多波长切换法同时测定益安宁丸中 7 种活性成分含量方法快捷、有效、准确、实用,可用于益安宁丸中三七皂苷 R_1 、五味子醇甲、丹酚酸 B、五味子酯甲、人参皂苷 R_{g1} 、人参皂苷 R_{b1} 、丹参酮 II_A 含量的同时测定,为益安宁丸质量评价提供参考依据。

参考文献

- [1] JZ20010027-2015 国家食品药品监督管理局药品标准[S]. 2015.
- [2] 张群豪,李海霞. 益安宁治疗冠心病心绞痛 60 例临床观察[J]. 疑难病杂志, 2006, 5(6): 411-414.
- [3] 蔡少杭,吴怡萍. 益安宁治疗慢性疲劳综合征 30 例临床观察[J]. 实用中医内科杂志, 2014, 28(1): 42-44.
- [4] 张 岚,王 平,张 涛. 益安宁丸联合二丁酰环磷酸钙对慢性心力衰竭患者心肺功能及血清 MMP-9、BNP 水平的影响[J]. 中药药理与临床, 2017, 33(6): 146-148.
- [5] 林红强,李平亚,刘金平. 野生西洋参鉴别、化学成分及药理作用研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 2017, 29(12): 2157-2162.
- [6] 刘 鹏,王士伟,夏广萍. 西洋参花蕾中人参皂苷 R_e 、拟人参皂苷 F_{11} 、人参皂苷 R_{b3} 、人参皂苷 R_d 的含量测定[J]. 中草药, 2018, 49(17): 4144-4147.
- [7] 白 雪,黄 鑫,刘淑莹. 不同来源西洋参药材及产品皂苷成分评价研究[J]. 药物评价研究, 2015, 38(6): 652-655.
- [8] 荆 然,李慧峰,程艳刚,等. 五味子不同炮制品对小鼠慢性不可预知性应激抑郁的改善作用[J]. 现代药物与临床, 2016, 31(11): 1698-1702.
- [9] 王馨雅,高 慧,王晓婷,等. 五味子不同炮制品对大鼠肾阳虚的改善作用研究[J]. 现代药物与临床, 2018, 33(1): 10-14.
- [10] 张琨琨. 五味子多糖免疫调节及抗氧化功能研究[J]. 职业卫生与病伤, 2016, 31(1): 54-57.
- [11] 苏联麟,李 平,程 雪,等. 基于 UPLC-Q/TOF-MS 的醋制五味子对酒精性肝损伤大鼠胆汁代谢物的影响研究[J]. 中草药, 2017, 48(1): 114-120.
- [12] 任海风,王世华. 五味子药理作用研究进展[J]. 中国医院用药评价与分析, 2018, 18(8): 1151-1152.
- [13] 杨 擎,曲晓波,李 辉,等. 五味子化学成分与药理作用研究进展[J]. 吉林中医药, 2015, 35(6): 626-628.
- [14] 周永峰,李瑞煜,张定堃,等. 基于 UPLC-Q-TOF/MS 的五味子不同部位化学成分研究[J]. 中草药, 2017, 48(6): 1087-1092.
- [15] 杨 娟,袁一怔,尉广飞,等. 三七植物化学成分及药理作用研究进展[J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2017, 19(10): 1641-1647.
- [16] 胡玉飘,崔秀明,张泽君,等. 失效模式分析和星点设计-效应面法优化熟三七皂苷类成分纯化工艺[J]. 中草药, 2018, 49(13): 3009-3016.
- [17] 周 晨,刘 辉. 三七功用与化学成分[J]. 实用中医内科杂志, 2018, 32(8): 4-7.
- [18] Yang J, Dong L L, Wei G F, et al. Identification and quality analysis of *Panax notoginseng* and *Panax vietnamensis* var. *fuscidicus* through integrated DNA barcoding and HPLC[J]. *Chin Herb Med*, 2018, 10(2): 176-182.
- [19] 刘慧颖,王承潇,杨 野,等. 微波辅助降解三七茎叶总皂苷生成人参皂苷 R_{g5} 的工艺研究[J]. 中草药, 2018, 49(14): 3245-3251.
- [20] 代晓光,苏长兰. 丹参化学成分及药理研究进展[J]. 中医药信息, 2018, 35(4): 126-129.
- [21] 罗志毅,包国荣. HPLC 法测定益安宁中人参皂苷 R_{b1} 的含量[J]. 海峡药学, 2006, 18(2): 48-50.
- [22] 王 柯,季 申. 益安宁丸中人参皂苷 R_{g1} 、 R_e 和 R_{b1} 的 HPLC 测定[J]. 中国医药工业杂志, 2004, 35(10): 33-34.
- [23] 代 琪,罗 霄,叶俏波. HPLC 测定益安宁丸中西洋参和三七的有效成分[J]. 重庆中草药研究, 2017, 36(2): 20-26.