

浙江省大型科研仪器开放共享平台-国产科研仪器研发与应用专栏(045~050)

高效液相色谱法快速测定参芪降糖胶囊中 人参皂苷的含量

林灵超, 黄 燕

(浙江福立分析仪器股份有限公司, 浙江 台州 317500)

摘要: 建立了高效液相色谱法快速测定参芪降糖胶囊中人参皂苷 R_{g1} 、人参皂苷 R_e 、人参皂苷 R_d 含量的方法。采用 $3.5\ \mu\text{m}$ Coreshell C_{18} 核壳型分离填料 ($3.0\ \text{mm} \times 150\ \text{mm}$) 为色谱柱, 分别以纯乙腈、纯水为流动相进行梯度淋洗, 流量为 $0.43\ \text{mL/min}$, 柱箱温度为 $25\ ^\circ\text{C}$, 检测波长为 $203\ \text{nm}$ 。人参皂苷 R_{g1} 、人参皂苷 R_e 、人参皂苷 R_d 分别在 $5\sim 400$ 、 $20\sim 800$ 、 $5\sim 400\ \mu\text{g/mL}$ 质量浓度范围内线性关系良好 (R^2 大于 $0.999\ 6$), 加标回收率为 $95.89\%\sim 100.67\%$, 相对标准偏差为 $1.04\%\sim 3.39\%$ 。方法可以快速检测参芪降糖胶囊中人参皂苷的含量, 准确度高, 数据可靠, 对仪器要求不高, 易于接受, 可用于人参皂苷的相关质量控制。

关键词: 人参皂苷; 高效液相色谱法; 核壳型分离填料; 参芪降糖胶囊

中图分类号: O657.7⁺2

文献标志码: B

文章编号: 1006-3757(2022)01-0045-06

DOI: 10.16495/j.1006-3757.2022.01.007

Fast Determination of Ginsenosides in Shengqi Jiangtang Capsule by High Performance Liquid Chromatography

LIN Ling-chao, HUANG Yan

(Zhejiang Fuli Analytical Instruments Inc., Taizhou 317500, Zhejiang China)

Abstract: In order to determine the Ginsenoside R_{g1} , Ginsenoside R_e and Ginsenoside R_d in Shengqi Jiangtang Capsule rapidly, a high performance liquid chromatographic (HPLC) method has been set up. Under optimized conditions, the analytes were carried out with acetonitrile, water as the mobile phase in a gradient elution manner at a flow rate of $0.43\ \text{mL/min}$ and a wavelength of $203\ \text{nm}$ on a $3.5\ \mu\text{m}$ Coreshell column ($3.0\ \text{mm} \times 150\ \text{mm}$). The results showed that good linear relationships of Ginsenoside R_{g1} , Ginsenoside R_e and Ginsenoside R_d within the mass concentrations of $5\sim 400$, $20\sim 800$, $5\sim 400\ \mu\text{g/mL}$, respectively, and all the correlation coefficients were better than $0.999\ 6$. The recoveries were $95.89\%\sim 100.67\%$ and the relative standard deviations were $1.04\%\sim 3.39\%$. This rapid, accurate and reliable method can be used for the quality control of Shengqi Jiangtang Capsule without a high demand instrument.

Key words: Ginsenosides; HPLC; coreshell; Shengqi Jiangtang Capsule

近年来,我国糖尿病患病率显著增加,根据 2015 至 2017 年中华医学会内分泌学会对于糖尿病的流行病学调查显示,我国 18 岁及以上人群糖尿病患病率为 11.2% ^[1]。作为糖尿病防治指南^[2]的推荐用药,参芪降糖胶囊可联合其他常用降糖药物改善和治疗因气阴两虚导致的相关症状^[3-4],具有较为重要的临床使用价值。

目前在参芪降糖胶囊的质量研究中,主要采用高效液相色谱法^[5-6]和超高效液相色谱法^[7-9]测定人参皂苷的含量。受到常规高效液相色谱系统的性能限制,高效液相色谱法常常采用 $5\ \mu\text{m}$ 全多孔填料,在检测参芪降糖胶囊中人参皂苷的含量时,普遍存在分析时间过长(含平衡时间至少在 $120\ \text{min}$ 以上)、消耗有机溶剂过多、无法满足复杂样品对分离

收稿日期: 2022-01-25; 修订日期: 2022-02-26.

作者简介: 林灵超 (1987-), 男, 高级工程师, 主要从事高效液相色谱系统的开发与应用, E-mail: linlingchao5058@163.com.

和分析等缺点. 超高效液相色谱法则充分发挥了小粒径全多孔填料(sub-2 μm)的性能,具有较高的分析通量,但需要超高效色谱系统的硬件性能与之匹配才行^[10-11],包括高压溶剂输送单元、低死体积的色谱系统、快速的检测器和自动进样器以及高速的数据采集和控制系统,所以超高效色谱系统的硬件成本、维修成本非常高. 同时系统常常面临堵塞、故障率高的风险,客户操作体验感急剧下降. 在方法转移时也会引入其他诸多问题^[12-13]. 所以超高效色谱法的推广受到了极大地限制,始终无法有效普及到中药材以及中药制剂企业中去.

近年来,核壳型分离填料在快速分析行业中的应用逐渐引起关注. 与5 μm 全多孔填料相比,核壳型分离填料可显著缩短分析时间、改善分离效果、提高灵敏度和分辨率. 与小粒径全多孔填料(sub-2 μm)相比,核壳型分离填料具有上样量大、色谱柱通透性好、背压低等优势^[14-17]. 但相关的研究均是以2.6 μm 核壳型分离填料为主,此时也只有超高效液相色谱系统才能满足对其柱外谱带展宽的要求^[18]. 另外也偶见2 μm 以下的核壳型分离填料的分析报道^[19],但至今未出现商品化的超高效液相色谱系统与之兼容.

3.5 μm 核壳型分离填料是由2.3 μm 直径的超纯实心硅胶核以及外层的厚度为0.6 μm 的多孔层组成,同样可缩短待分析物质在填料颗粒内的扩散路径,加快其传质速度,从而实现高柱效和快速分析^[20]. 因此本研究基于3.5 μm Coreshell C₁₈核壳型分离填料(3.0 mm×150 mm)进行参芪降糖胶囊中人参皂苷含量的测定,在现有常规高效液相色谱系统的基础上,即可实现人参皂苷的高柱效、高通量等分析,可以为参芪降糖胶囊的质量控制提供更易被接受和普及的方法.

1 试验部分

1.1 仪器与试剂

LC5190型高效液相色谱系统(浙江福立分析仪器股份有限公司);SQP型电子天平(赛多利斯(上海)贸易有限公司产品);Coreshell C₁₈型色谱分析柱(3.5 μm ,3.0 mm×150 mm,ChromaNik Technologies).

人参皂苷 R_{g1}标准物质(纯度为94.0%,批号为110703-202034),人参皂苷 Re 标准物质(纯度为96.0%,批号为110754-202129),人参皂苷 Rd 标准物质(纯度为97.3%,批号为111818-202104),均购

自于中国食品药品检定研究所;参芪降糖胶囊(每粒装0.35 g,批号为1907051,河南羚锐制药股份有限公司);纯乙腈,色谱纯;水,Millipore 超纯水.

1.2 试验方法

1.2.1 混合标准溶液制备

精密称取人参皂苷 R_{g1}标准物质、人参皂苷 Re 标准物质以及人参皂苷 Rd 标准物质适量,精密称定,加甲醇制成每1 mL含人参皂苷 R_{g1} 0.2 mg、人参皂苷 Re 0.4 mg、人参皂苷 Rd 0.2 mg的混合溶液,即得.

1.2.2 供试品溶液制备

取研细后的参芪降糖胶囊囊芯物约0.2 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入水饱和的正丁醇50 mL,密塞,称定重量,摇匀,超声处理1 h,取出,放冷,再称定重量,使用水饱和正丁醇补足减少的重量,摇匀,离心,精密吸取上清液25 mL,回收溶剂至干,残渣加甲醇溶解并转移至5 mL量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,过滤,取过滤溶液,即得.

1.2.3 高效液相色谱条件

Coreshell C₁₈色谱柱(3.5 μm ,3.0 mm×150 mm);流动相A为纯乙腈,流动相B为纯水,进行梯度淋洗(0~20 min,83% B,20~22.5 min,83%~76% B,22.5~35 min,76%~60% B);流量0.43 mL/min;柱箱温度25 $^{\circ}\text{C}$;检测波长203 nm;进样量1.0 μL .

2 结果与讨论

2.1 方法学考察

2.1.1 专属性试验

精密移取混合标准溶液、供试品溶液适量,在“1.2.3”项下色谱条件进样1.0 μL ,结果如图1所示. 在供试品溶液色谱图中,3种人参皂苷 R_{g1}的保留时间分别为26.55、26.76、35.53 min. 人参皂苷 Re 和人参皂苷 Rd 的分离度分别为1.9、1.7,所以两者的分离度符合基线分离要求. 3种人参皂苷的拖尾因子均在0.95~1.15之间,峰形对称. 经光谱扫描得到3种人参皂苷的峰纯度均较高. 因此方法专属性良好.

2.1.2 精密度

按“1.2.2”项下分别制备供试品溶液4组,按“1.2.3”项下色谱条件各进样测定6次,测得人参皂苷 R_{g1}、人参皂苷 Re、人参皂苷 Rd 的峰面积的相对标准偏差分别为2.21%、3.05%、2.93%. 表明仪器精密度良好.

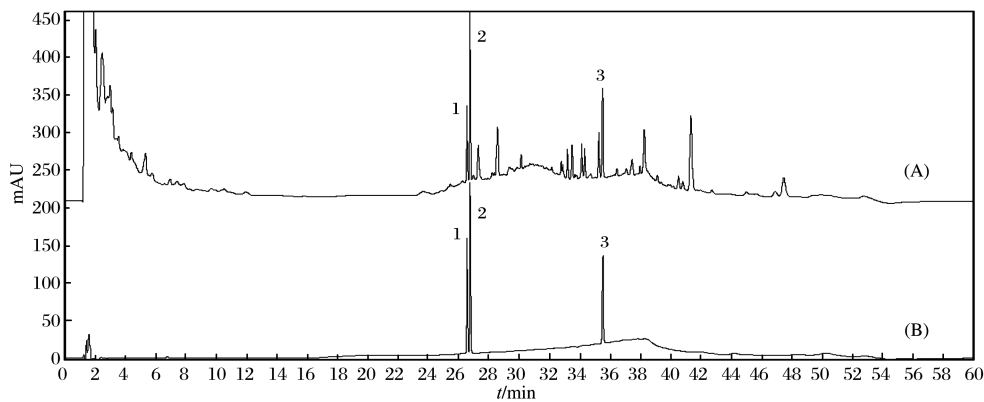


图 1 混合标准溶液、供试品溶液色谱图
Fig. 1 Chromatograms of Ginsenosides standard and sample
(1) 人参皂苷 R_{g_1} , (2) 人参皂苷 R_e , (3) 人参皂苷 R_d
(A) 供试品溶液, (B) 混合标准溶液

2. 1. 3 重复性

按“1. 2. 2”项下平行制备供试品溶液 6 份,依次按“1. 2. 3”项下色谱条件进样,测得人参皂苷 R_{g_1} 、人参皂苷 R_e 、人参皂苷 R_d 的峰面积的相对标准偏差分别为 0.64%、0.78%、0.91%。表明方法重复性良好。

2. 1. 4 线性关系

取人参皂苷 R_{g_1} 、人参皂苷 R_d 标准物质适量,以甲醇分别配制成质量浓度为 5、20、50、100、200、400 $\mu\text{g/mL}$ 的溶液。取人参皂苷 R_e 标准物质适量,以甲醇配制成质量浓度分别为 20、50、100、200、400、800 $\mu\text{g/mL}$ 的溶液。以混合标准溶液的质量浓度为横坐标(X),不同浓度下的峰面积为纵坐标(Y)进行线性回归计算,得到 3 种人参皂苷的线性关系,如表 1 所列。表 1 结果表明 3 种人参皂苷在一定的浓度范围内线性关系良好,相关系数均大于 0.999 6。

表 1 3 种人参皂苷的线性关系

Table 1 Linear relationships of Ginsenosides

组分名	线性范围/ ($\mu\text{g/mL}$)	线性关系	R^2
人参皂苷 R_{g_1}	5~400	$Y=3\ 178.2X+1\ 327.7$	0.999 6
人参皂苷 R_e	20~800	$Y=2\ 357.1X-14\ 319$	0.999 8
人参皂苷 R_d	5~400	$Y=3\ 151.7X+789.39$	0.999 8

2. 1. 5 稳定性考察

取同一份供试品溶液,分别在配制 0、2、6、12、

24、48 h 后按“1. 2. 3”项下色谱条件进样,测得人参皂苷 R_{g_1} 、人参皂苷 R_e 、人参皂苷 R_d 的峰面积的相对标准偏差分别为 1.34%、1.51%、1.79%。表明方法稳定性良好。

2. 1. 6 加标回收率考察

取同一批次参芪降糖胶囊若干份,每份加入低、中、高 3 个浓度的对照品溶液,按“1. 2. 2”项制备供试品溶液,按“1. 2. 3”项下色谱条件进样测定,结果如表 2 所列。由表 2 可见,在不同的加标水平下,3 种人参皂苷的回收率为 95.89%~100.67%,相对标准偏差为 1.04%~3.39%。表明方法具有较高的准确度。

2. 1. 7 样品含量测定

取平行配制的 6 份参芪降糖胶囊供试品溶液,按“1. 2. 3”项下色谱条件进样测定,根据峰面积外标法计算 3 种人参皂苷的含量。结果显示人参皂苷 R_{g_1} 平均含量为 1.14 mg/粒 ,相对标准偏差为 0.93%。人参皂苷 R_e 平均含量为 3.45 mg/粒 ,相对标准偏差为 0.94%。人参皂苷 R_d 平均含量为 1.69 mg/粒 ,相对标准偏差为 0.88%。

2. 2 讨论

本试验中,检测波长、流动相组成以及梯度洗脱程序均沿用中国药典^[7]中参芪降糖胶囊的条件,其余的色谱条件由试验确定得到。

2. 2. 1 进样体积的确定

随着色谱柱尺寸的减少,进样体积也需随之降低,以避免柱外效应的增加和色谱柱过载,对色谱分离效果产生影响^[21]。因此基于所采用 3.0 mm 为色谱柱的尺寸规格,考察了 0.5、1.0、5.0、10.0 μL 等不

表 2 3 种人参皂苷的加标回收率试验数据

Table 2 Standard spiked recovery tests of Ginsenosides

组分名	原质量/mg	加入质量/mg	测得质量/mg	回收率/%	RSD/%
人参皂苷 R _{g₁}	130.24±1.70	20	149.88±1.50	98.57	2.58
		100	228.93±2.60	98.88	1.92
		200	327.70±3.35	99.09	1.07
人参皂苷 Re	397.94±4.65	20	415.03±4.72	98.83	2.94
		200	596.62±8.94	100.67	3.39
		400	794.90±7.63	100.41	1.36
人参皂苷 Rd	192.74±2.19	20	211.80±2.48	95.89	2.27
		100	289.66±4.31	97.36	2.36
		200	392.39±2.13	98.57	1.04

同进样体积的色谱效果. 试验发现随着进样体积的增加,3 种人参皂苷的理论塔板数、拖尾因子均出现先保持不变,再小幅度的降低的现象,而仪器精密度相对标准偏差却有所提高. 因此综合系统适应性参数、仪器精密度、样品的节省量考虑,确定色谱方法中进样体积为 1.0 μL.

2. 2. 2 流量的确定

按照中国药典^[7]方法调整的允许范围进行确定,按照 dc_1 为 4.6 mm 色谱柱常用流量 F_1 为 1.0 mL/min 计算,当使用 dc_2 为 3.0 mm 色谱柱时,流

量 F_2 应为 $F_2 = F_1 \times (dc_2^2/dc_1^2)$, 此时方法的最佳线速度为 0.43 mL/min. 因此考察了流量分别为 0.43、0.86 mL/min 的色谱效果,结果如图 2 所示. 由图 2 可见,在流速为 0.43 mL/min 时,3 种人参皂苷的灵敏度、理论塔板数、分离度均较高,但分析时间相对较长. 出于对分析方法的综合考虑,最终确定 0.43 mL/min 作为方法的流量. 实际应用中,如有超快速分析时间的需求,可使用 0.86 mL/min 作为流速,在略微牺牲灵敏度、理论塔板数、分离度的情况下,进行参芪降糖胶囊中人参皂苷含量的测定,分析时间可缩短一半.

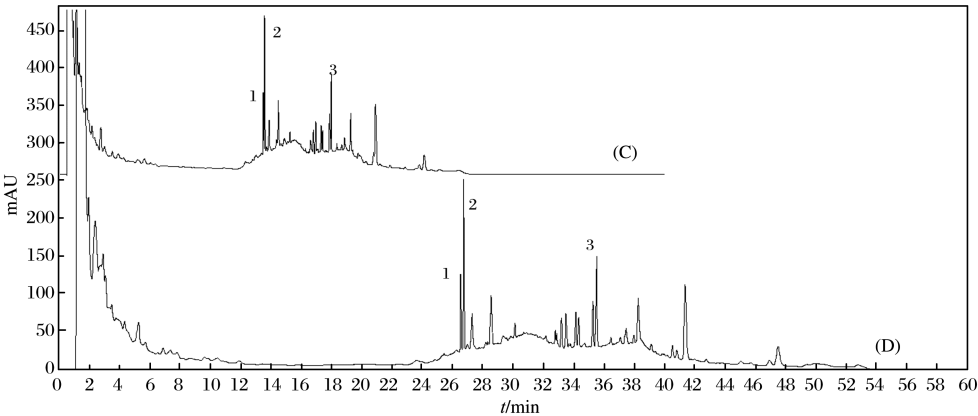


图 2 供试品溶液在不同流速下的色谱图

Fig. 2 Chromatograms of Ginsenosides with different flow rates

(1) 人参皂苷 R_{g₁}, (2) 人参皂苷 Re, (3) 人参皂苷 Rd

(C) 流速为 0.86 mL/min, (D) 流速为 0.43 mL/min

3 结论

虽已有超高效液相色谱法测定参芪降糖制剂的

应用报道,但大多基于 sub-2 μm 色谱填料与质谱检测器联用为主. 一方面仪器设备昂贵,常规中医药企业无法承担. 另一方面 sub-2 μm 色谱填料所导致

的非常高的系统压力会引起很多副作用,比如高压会相对容易造成系统和色谱柱性能的下降. 高压时,流动相与色谱填料之间产生的摩擦热会造成色谱柱内部温控失衡、色谱峰形的变化、检测器噪声的增加、关键目标峰分离度的变化等,对参芪降糖胶囊的分离分析数据可能会造成显而易见的影响.

因此本研究采用 3.5 μm Coreshell C₁₈ 色谱填料,在常规高效液相色谱系统上,建立了高效液相色谱方法进行参芪降糖胶囊中人参皂苷含量的快速分析,既发挥了超高效液相色谱高效、高通量的特点,又避免出现超高效液相色谱价格昂贵、系统易堵、体验感差、方法转移难等问题. 同时该方法的准确性、精密度高,操作也简单,极易被广大中医药企业所认可和接受,可为今后进一步提高参芪降糖胶囊的分析标准提供参考依据.

参考文献:

- [1] Li Y Z, Teng D, Shi X G, Qin G J, Qin Y F, Quan H B, Shi B Y, Sun H, Ba J M, Chen B, Du J L, He L J, Lai X Y, Li Y B, Chi H Y, Liao E Y, Liu C, Liu L B, Tang X L, Tong N W, Wang G X, Zhang J N, Wang Y M, Xue Y M, Yan L, Yang J, Yang L H, Yao Y L, Ye Z, Zhang Q, Zhang L H, Zhu J, Zhu M, Ning G, Mu Y M, Zhao J J, Teng W P, Shan Z Y. Prevalence of diabetes recorded in mainland China using 2018 diagnostic criteria from the American Diabetes Association: national cross sectional study [J]. BMJ (Clinical Research Ed), 2020, 369: m997.
- [2] 中华医学会糖尿病学分会. 中国 2 型糖尿病防治指南(2013 年版) [J]. 中国糖尿病杂志, 2014, 22 (8): 2-42. [Chinese Diabetes Society. Guideline for the prevention and treatment of type 2 diabetes mellitus in China 2013 edition) [J]. Chinese Journal of Diabetes, 2014, 22(8): 2-42.]
- [3] 李红典,李明轩,白薇,张文华,龚燕冰. 参芪降糖颗粒联合二甲双胍治疗 2 型糖尿病有效性及安全性的 Meta 分析[J]. 世界中西医结合杂志, 2020, 15 (9): 1630-1637. [LI Hong-dian, LI Ming-xuan, BAI Wei, ZHANG Wen-hua, GONG Yan-bing. Efficacy and safety of shenqi Jiangtang granules combined with metformin in the treatment of type 2 diabetes based on meta-analysis [J]. World Journal of Integrated Traditional and Western Medicine, 2020, 15 (9): 1630-1637.]
- [4] 赵能江,杨叔禹,李博. 参芪降糖颗粒治疗 2 型糖尿

病临床应用专家共识[J]. 中草药, 2020, 51(17): 4383-4387. [ZHAO Neng-jiang, YANG Shu-yu, LI Bo. Expert consensus on Shenqi Jiangtang Granule in clinical application of type 2 diabetes [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2020, 51(17): 4383-4387.]

- [5] 蔡秋林,施夏蓉,陈恩瑜. 参芪降糖胶囊定性定量方法研究[J]. 海峡药学, 2014, 26(4): 57-60. [CAI Qiu-lin, SHI Xia-rong, CHEN En-yu. Studies on qualitative and quantitative methods of Shenqijiangtang Capsules[J]. Strait Pharmaceutical Journal, 2014, 26 (4): 57-60.]
- [6] 冯光军,罗丹,冉凤英,杨洋,杨光义,梅全喜,陈琴华. 反相高效液相色谱法测定参芪降糖胶囊中梓醇含量[J]. 中国药业, 2021, 30(9): 63-65. [FENG Guang-jun, LUO Dan, RAN Feng-ying, YANG Yang, YANG Guang-yi, MEI Quan-xi, CHEN Qin-hua. Content determination of catalpol in shenqi Jiangtang capsules by RP-HPLC [J]. China Pharmaceuticals, 2021, 30(9): 63-65.]
- [7] 国家药典委员会. 2020 年版中国药典[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 240-242. [Chinese Pharmacopoeia Commission. The pharmacopoeia of the People's Republic of China 2020 edition[S]. Beijing: China Press of Traditional Chinese Medicine, 2020: 240-242.]
- [8] 张慧,张晓静,姜慧洁,颜继忠. UPLC-Q-TOF MS/MS 法分析参芪降糖颗粒化学成分[J]. 中成药, 2017, 39(10): 2101-2108. [ZHANG Hui, ZHANG Xiao-jing, JIANG Hui-jie, YAN Ji-zhong. Analysis of chemical constituents in Shenqi Jiangtang Granules by UPLC-Q-TOF MS/MS[J]. Chinese Traditional Patent Medicine, 2017, 39(10): 2101-2108.]
- [9] 王倩,李冰冰,黄文静,程国良,王乐琪,肖雪,严诗楷. 基于 2 种色谱-质谱联用技术的参芪降糖颗粒化学成分分析[J]. 中草药, 2021, 52(6): 1568-1581. [WANG Qian, LI Bing-bing, HUANG Wen-jing, CHENG Guo-liang, WANG Le-qi, XIAO Xue, YAN Shi-kai. Analysis of chemical constituents of Shenqi Jiangtang Granule based on UPLC-Q/TOF MS and GC-MS[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2021, 52(6): 1568-1581.]
- [10] Wu N J, Bradley A C. Effect of column dimension on observed column efficiency in very high pressure liquid chromatography [J]. Journal of Chromatography A, 2012, 1261: 113-120.
- [11] Dwight R. Stoll, KenBroeckhoven. Where has my

- efficiency gone? [J]. LCGC NORTH AMERICA, 2021: 159-166.
- [12] Fallas M M, Tanaka N, Buckenmaier S M C, McCalley D V. Influence of phase type and solute structure on changes in retention with pressure in reversed-phase high performance liquid chromatography[J]. Journal of Chromatography A, 2013, 1297: 37-45.
- [13] Fallas M M, Neue U D, Hadley M R, McCalley D V. Further investigations of the effect of pressure on retention in ultra-high-pressure liquid chromatography [J]. Journal of Chromatography A, 2010, 1217(3): 276-284.
- [14] 夏红军, 刘家玮, 白泉. 核壳型二氧化硅色谱填料的研究进展[J]. 色谱, 2020, 38(4): 372-382. [XIA Hong-jun, LIU Jia-wei, BAI Quan. Research progress on core-shell silica stationary phases for high performance liquid chromatography[J]. Chinese Journal of Chromatography, 2020, 38(4): 372-382.]
- [15] Ali I, Gaitonde V D, Grahm A. Halo columns: new generation technology for high speed liquid chromatography [J]. Journal of Chromatographic Science, 2010, 48(5): 386-394.
- [16] Sri R S, Sri K B, Mounika C. A review on comparative study of HPLC and UPLC [J]. Research Journal of Pharmacy and Technology, 2020, 13(3): 1570.
- [17] 欧俊杰, 邹汉法编. 液相色谱分离材料: 制备与应用[M]. 北京: 化学工业出版社, 2016. [OU Jun-jie, ZOU Han-fa. Liquid chromatographic separation material: the preparation and application[M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2016.]
- [18] 于世林. 高效液相色谱方法及应用(第三版)[M]. 北京: 化学工业出版社, 2021(重印): 279. [YU Shi-lin. Method and application of high performance liquid chromatographic 3rd edition [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2021: 279.]
- [19] 施文君, 田华君, 薛芸, 翁中亚, 瞿其曙, 王彦, 阎超. 1.2 μm 新型放射型核壳色谱填料在加压毛细管电色谱中的性能评价[J]. 色谱, 2016, 34(5): 461-466. [SHI Wen-jun, TIAN Hua-jun, XUE Yun, WENG Zhong-ya, QU Qi-shu, WANG Yan, YAN Chao. Performance evaluation of 1.2 μm fibrous core-shell packing material for pressurized capillary electrochromatography [J]. Chinese Journal of Chromatography, 2016, 34(5): 461-466.]
- [20] 林灵超, 林雪志, 周小靖. 高效液相色谱法快速测定七叶神安片中的人参皂苷 Rb_3 [J]. 化学分析计量, 2019, 28(6): 66-69. [LIN Ling-chao, LIN Xue-zhi, ZHOU Xiao-jing. Rapid determination of ginsenoside Rb_3 in qiyeshen'an tablets by HPLC[J]. Chemical Analysis and Meterage, 2019, 28(6): 66-69.]
- [21] Werres T, Schmidt T C, Teutenberg T. The influence of injection volume on efficiency of microbore liquid chromatography columns for gradient and isocratic elution[J]. Journal of Chromatography A, 2021, 1641: 461965.