

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2017.10.08

# 板蓝根超微粉粉体特性及水溶性成分溶出研究

侯耀杰<sup>1</sup>,于文会<sup>1\*</sup>,姜晓文<sup>1</sup>,王丽<sup>1</sup>,王海彬<sup>1</sup>,黄慧<sup>1</sup>,李叔洪<sup>1</sup>,郝敬友<sup>1,2</sup>

(1 东北农业大学动物医学学院,哈尔滨 150030;2 哈尔滨绿达生动物药业有限公司,哈尔滨 150030)

[收稿日期] 2017-04-26 [文献标识码]A [文章编号]1002-1280 (2017) 10-0056-07 [中图分类号]S853.7

**[摘要]** 通过对板蓝根超微粉碎粉体特性研究,为中药超微粉推广应用提供依据。试验通过扫描电镜、激光粒度分析仪及高效液相色谱对板蓝根超微粉、板蓝根普通粉的粒度及水溶性活性成分溶出进行检测,探讨超微粉碎对中药粉碎粒度、活性成分溶出影响。试验结果显示板蓝根超微粉和普通粉  $D_{50}$  分别为 5.6、171.058  $\mu\text{m}$ ;比表面积分别为 1.551、0.225  $\text{cm}^2/\text{g}$ ;休止角分别为 47.43°、42.95°;松密度分别为 0.39、0.48  $\text{g}/\text{cm}^3$ 。电镜观察超微粉看不到完整细胞结构,多为细胞碎片,而普通粉可以看到完整的细胞。板蓝根超微粉和普通粉水溶性浸出物的溶出量大约为 50% 和 42%。板蓝根超微粉和普通粉多糖提取率分别为 9.34% 和 8.36%。板蓝根超微粉和普通粉中(R,S)-告依春的含量分别为 1.068、0.784 mg/g。板蓝根经过超微粉碎后,中直粒径可达 5.6  $\mu\text{m}$ ,细胞破壁率可达 100%,而普通粉破壁率仅为 31.74%;板蓝根经超微粉碎对多糖的溶出显示为超微粉大于普通粉,板蓝根超微粉水溶性活性成分告依春溶出率优于普通粉。

**[关键词]** 板蓝根;超微粉碎;粉体特性;活性成分

## Study on Characteristics and Water-soluble Components of Ultrafine *Radix isatidis*

HOU Yao-jie<sup>1</sup>, YU Wen-hui<sup>1\*</sup>, JIANG Xiao-wen<sup>1</sup>, WANG Li<sup>1</sup>, WANG Hai-bin<sup>1</sup>,  
HUANG Hui<sup>1</sup>, LI Shu-hong<sup>1</sup>, HAO Jun-you<sup>1,2</sup>

(1.Northeast agricultural university College of Veterinary Medicine, Harbin, China;

2.Harbin Lvdasheng Animal Pharmaceutical Co., Ltd Harbin, China)

Corresponding author: YU Wen-hui, E-mail:yuwenhui@neau.edu.cn

**Abstract:** The purpose of this experiment is to detect the particle size and water-soluble active components of ultrafine *Radix isatidis* and ordinary *Radix isatidis* by using the scanning electron microscopy, laser particle size analyzer and high performance liquid chromatography. The results showed that the  $D_{50}$  of ultrafine *Radix isatidis* and ordinary *Radix isatidis* were 5.6  $\mu\text{m}$  and 171.058  $\mu\text{m}$  respectively. The specific surface areas were 1.551 and 0.225  $\text{cm}^2/\text{g}$  respectively. The angle of repose were 47.43°、42.95° respectively. The bulk density were 0.39 and 0.48  $\text{g}/\text{cm}^3$  respectively. The complete cell structure of ultrafine *Radix isatidis* could not be observed and mostly

作者简介:侯耀杰,硕士研究生,从事中兽药方面研究。

通讯作者:于文会。E-mail:yuwenhui@neau.edu.cn

were cell debris through the electron microscopy observation of the ultrafine *Radix isatidis*, while the complete cell structure could be observed through the electron microscopy observation of the ordinary *Radix isatidis*. The dissolution rate of the ultrafine *Radix isatidis* and ordinary *Radix isatidis* water-soluble extract were about 50% and 42%. The extraction rates of ultrafine and ordinary powder polysaccharides were 9.34% and 8.36% respectively. The content of (R,S)-epigoitrin in ultrafine *Radix isatidis* and ordinary *Radix isatidis* were 1.068 and 0.784 mg/g. After the ultra-fine pulverization of *Radix Isatidis*, its medium diameter is up to 5.6 μm, the cell wall-broken rate is up to 100%, while the cell wall-broken rate of ordinary *Radix isatidis* is only 31.74%, and for the dissolution of the polysaccharide, ultrafine *Radix isatidis* is more than the ordinary *Radix isatidis*. For the dissolution rate of water soluble active ingredient epigoitrin of *Radix Isatidis*, ultrafine powder is better than that of ordinary powder.

**Key words:** *Radix isatidis*; ultrafine grinding; powder characterization; bioactivity

超微粉碎是一项融合了机械力学、化学反应动力学,胶体化学,表面界面化学跨学科交叉的高新技术<sup>[1]</sup>。超微粉碎技术是指利用机器或流体动力与物料产生摩擦、冲击、碰撞和剪切等作用力,将毫米级颗粒粉碎成平均粒径小于 10 μm 颗粒的过程,其原理是在外力作用下破坏颗粒分子间内聚力,使颗粒微细化,同时产生量到质的变化<sup>[2]</sup>。中草药活性成分主要存在于细胞内,其释放需透过细胞壁和细胞膜,而超微粉碎技术是一项细胞破壁技术,中草药经过超微粉碎后大大提高其活性成分的利用率<sup>[3-4]</sup>。板蓝根具有清热解毒,凉血利咽功效<sup>[5]</sup>。同时具有抗菌、抗肿瘤、抗病毒、抗内毒素、提高免疫力等药理活性,已被广泛应用于临床治疗<sup>[6]</sup>。本试验以板蓝根为研究对象,板蓝根经过超微粉碎后,通过对其粉碎粒径、休止角、比表面积、松密度、破壁率及其活性成分(R,S)-告依春含量变化,评价超微粉碎技术加工天然植物的优越性。

## 1 材 料

1.1 试验药物及主要试剂 板蓝根购于哈尔滨市药材市场,板蓝根超微粉粒度可达 500 目以上,板蓝根普通粉粒度可达 80 目筛;甲醇(色谱纯)和磷酸(色谱纯),均购自美国阿拉丁工业公司;D-无水葡萄糖对照品(批号:110833)和(R,S)-告依春对照品(批号:111753-201103),均购自中国食品药品检定研究所。

1.2 主要仪器 S-3400N 扫描电子显微镜(日本日立公司生产);Mastersizer 2000 激光粒度分析仪(英国马尔文仪器有限公司生产);JYNU75-75 型超微粉碎机(青岛捷怡纳机械科技有限公司生产);高效液相色谱(美国 Waters 公司生产)。

## 2 方 法

2.1 扫描电镜观察 取板蓝根粉末铺于扫描电镜样品台上,喷金镀膜(厚度约为 10 nm),在 20 KV 加速电压下观察样品破壁情况。

2.2 粒径及比表面积的测定 分别取板蓝根超微粉末和普通粉末,超声 2 min,摇匀后加入无水乙醇使样品分散,使用激光粒径分析仪检测 D<sub>10</sub>、D<sub>50</sub>、D<sub>90</sub> 及比表面积。粉体的均匀度参数用 Span 表示,Span = (D<sub>90</sub>-D<sub>50</sub>)/D<sub>10</sub>。板蓝根细胞直径 50 μm,D<sub>90</sub> 为板蓝根粉末粒径,计算细胞破壁率,破壁率为 η<sup>[7]</sup>:n>1 时,η = 1 - (1 - 1/n)<sup>3</sup> × 100%,n ≤ 1 时,η = 100% (n 为粉末直径比细胞直径)

2.3 粉体松密度的测定 将容积约为 50 cm<sup>3</sup> 板蓝根超微粉和普通粉分别装入 100 mL 的量筒内,每隔 2 s 将量筒从 2.5 cm 高处重击一块硬木板表面,至粉体体积不再变化为止,称量量筒内粉末重量(W)并记录量筒中样品的最后容积(V<sub>b</sub>),按公式 ρ = W/V<sub>b</sub> 计算样品松密度。

2.4 粉末流动性的考察 采用固定漏斗法测定休止角来考察粉末的流动性。将漏斗固定在铁架台

上,测出漏斗下口与坐标纸的高度(H),样品缓缓倒入漏斗,至漏斗下口接触到样品粉末堆积形成的圆锥体尖端,停止倾倒,测定堆积的圆锥底部半径(R),反复3次,按公式 $\tan\alpha=H/R$ 计算休止角<sup>[8]</sup>。

**2.5 水溶性浸出物的测定** 溶出速度的测定:称取板蓝根超微粉和普通粉各4g,加药材总量的15倍水,密塞,冷浸,不断震荡,分别于冷浸2h,4h,6h,12h后取滤液20mL,用0.45μm干燥滤器过滤,干燥称重,计算水溶性浸出物的含量(%)。

溶出率的测定:称取3份板蓝根超微粉和普通粉各4g,分别加药材总量的10倍、15倍、20倍水,密塞,冷浸。前6h时时震荡,再静置18h,用0.45μm干燥滤器滤过,取滤液20mL,干燥称重,计算水溶性浸出物的含量(%)。

**2.6 板蓝根多糖的测定** 板蓝根超微粉板蓝根和普通粉水煎煮取上清液,Sevage试剂脱蛋白,再加入95%的乙醇,静置过夜,离心去上清,干燥,加蒸馏水定容得供试品溶液。

以葡萄糖作为标准溶液,利用紫外分光光度计在490nm下测定吸光度值,绘制标准曲线。在490nm下测定板蓝根超微粉和普通粉的吸光度值,计算板蓝根超微粉和普通粉中多糖提取率<sup>[9-10]</sup>。

**2.7 (R,S)-告依春的含量测定** 以(R,S)-告依春对照品制备标准曲线,浓度为24μg/mL。高效液相色谱检测,以对照品浓度X(μg/mL)为横坐标,峰面积Y为纵坐标绘制标准曲线。称取板蓝根超微粉和普通粉各5.0g,加水250mL称重,煎煮2h后用蒸馏水补足失重,0.22μm微孔滤膜过滤,4℃冰箱保存备用。供试品溶液浓度为0.02g/mL。

按照上述色谱条件进行测定,记录峰面积,计算板蓝根超微粉和普通粉中(R,S)-告依春含量<sup>[11-12]</sup>。

**2.8 数据处理** 采用SPSS17.0软件对试验数据进行单因素方差统计分析(One-Way ANOVA),结果以平均数±标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示,采用GraphPad Prism软件作图。

### 3 结 果

**3.1 板蓝根粉末扫描电镜观察结果** 由图1可见,在相同的放大倍数下观察,板蓝根普通粉的颗粒较大且形状不规则,粒径大小不均匀,可见完整的组织结构及细胞壁完整的细胞群,少数细胞的细胞壁被破坏;而板蓝根超微粉以粉末状存在,粒径分布均匀,粒径大小明显小于普通粉,在电镜下难以观察到完整的细胞,仅有个别完整的细胞存在,多为细胞碎片。

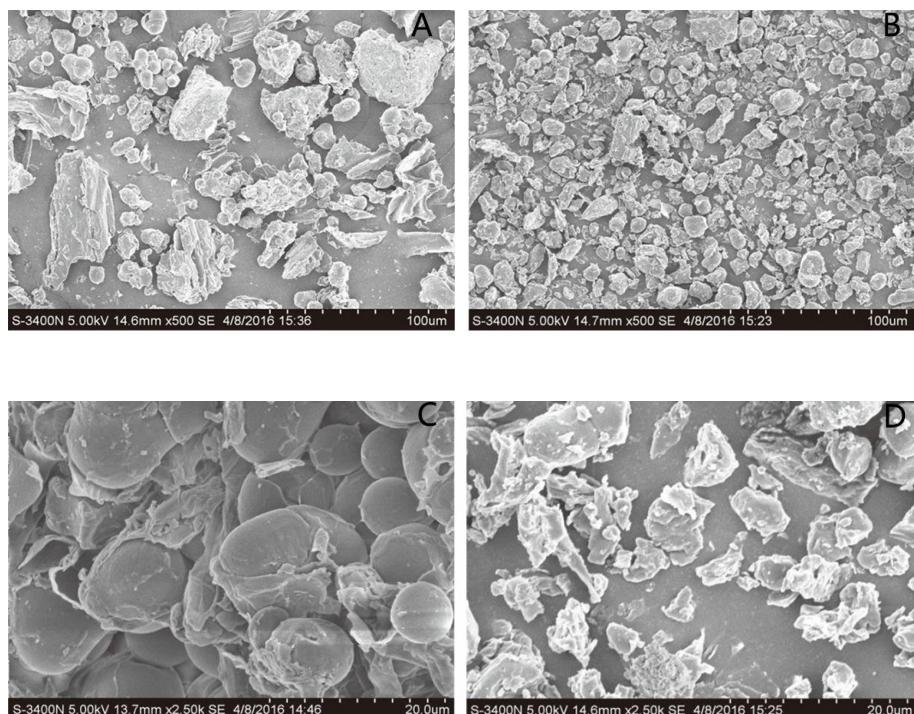
**3.2 板蓝根超微粉粒度检测结果** 由图2可知,分布在0~64μm间的超微粉颗粒可达99%以上,大于100μm基本不存在,而普通粉颗粒大部分分布在100~2000μm间。通过理想破壁率计算公式得出超微粉板蓝根的破壁率近100%,而普通粉破壁率远小于超微粉仅为31.74%。

**3.3 板蓝根超微粉松流动性、比表面积测定结果** 如表1可知,超微粉板蓝根的休止角大于普通粉而松密度小于普通粉;板蓝根超微粉的Span值较普通粉小,说明均匀度优于普通粉;比表面积分别为1.551和0.225cm<sup>2</sup>/g;

**3.4 水溶性浸出物测定结果** 由表2、3可知,板蓝根超微粉水溶性浸出物的溶出量大约为50%,普通粉的溶出量大约为42%。但随加水量和浸提时间的延长,板蓝根超微粉和普通粉溶出的量差异均不显著。

**3.5 多糖含量的测定结果** 测定制备好的供试品溶液吸光度值,计算得板蓝根超微粉和普通粉提取率分别为9.34%和8.36%。

**3.6 (R,S)-告依春含量测定结果** 如图3(R,S)-告依春的色谱分析图,板蓝根超微粉和普通粉的出峰时间分别为10.952、10.947min。积分面积分别为2862088、2428376。测得板蓝根超微粉供试品中(R,S)-告依春的含量1.068mg/g,板蓝根普通粉供试品中(R,S)-告依春含量为0.784mg/g。



A:普通粉 500×; B:超微粉 500×; C:普通粉 2.50k×; D:超微粉 2.50k×

A:ordinary power 500×; B:ultrafine power 500×; C:ordinary power 2.50k×; D:ultrafine power 2.50k×

图 1 板蓝根超微粉及普通粉电镜观察图

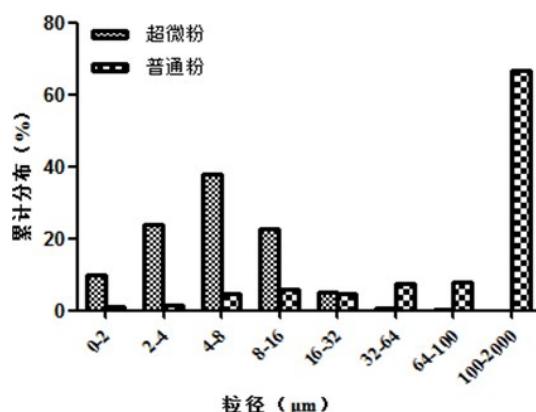
Fig 1 The electron microscopy figure of the ultrafine and the ordinary *Radix Isatidis*

图 2 粒径分布图

Fig 2 Particle size distribution

表 1 板蓝根粉体的休止角,松密度,Span 及比表面积的测定

Tab 1 Measuring angle of repose, bulk density, Span and the surface area

	休止角/°	松密度/(g/cm <sup>3</sup> )	Span/μm	比表面积/(cm <sup>2</sup> ·g <sup>-1</sup> )
超微粉	47.43±0.96	0.39±0.02	1.871	1.551
普通粉	42.95±1.55	0.48±0.05	2.384	0.225

表 2 板蓝根超微粉和普通粉不同加水量水溶性浸出物的含量(%) , n=3

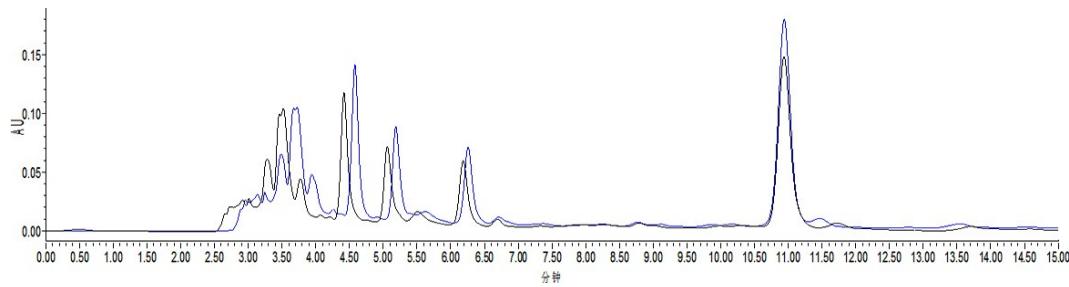
Tab 2 The water-soluble extract content of ultrafine *Radix isatidis* and ordinary *Radix isatidis* with different amount of water(%) , n=3

	10 倍	15 倍	20 倍
超微粉	48.90±1.54	50.47±0.96	50.68±0.62
普通粉	42.60±0.52	42.98±0.60	42.24±0.33

表 3 板蓝根超微粉和普通粉不同时间水溶性浸出物的含量(%) , n=3

Tab 3 The water-soluble extract content of ultrafine *Radix isatidis* and ordinary *Radix isatidis* at different times(%) , n=3

	2 h/%	4 h/%	6 h/%	12 h/%
超微粉	46.51±0.34	47.80±0.26	48.24±0.48	48.51±0.43
普通粉	40.28±0.98	41.30±0.07	41.82±0.07	41.98±0.58

图 3 板蓝根(R,S)-告依春  
Fig 3 (R,S)-epigoitrin chromatography

#### 4 讨 论

超微粉碎技术是对传统制备中药散剂的一种技术突破。中药经过超微粉碎后,粉体粒径变小,破壁率高,活性成分的溶出量多,溶出速度快。但超微粉碎技术并不是适合所有的中药,特别是对一些有毒的中药经过超微粉碎后,毒性变得更强<sup>[13]</sup>。中药超微粉碎后粉体粒径小使粉体间的静电摩擦力增大,流动性差;粉体间吸附作用强,易发生黏附和团聚现象<sup>[14]</sup>;细胞破壁程度大,细胞内水分和油脂性成分易暴露,使粉末呈半湿润状态的粉体间形成粒子团,以上因素均可降低超微粉体流动性;而且普通粉粒子分布范围广,较小粒子可以穿过大粒子间隙落到底层,所以普通粉粉体流动性优于超微粉粉体<sup>[15]</sup>。本实验对板蓝根超微粉与普通粉粉体特征进行评价比较,测得超微粉粒径远小于普通粉,超微粉粒径大小几乎均小于 100 μm,这与石秋

梅等<sup>[16]</sup>观察板蓝根超细粉的粒径 D<sub>50</sub>为 8.726 μm 结果基本一致。而比表面积大于普通粉,使板蓝根有效成分能够溶出的更充分,有利于在机体内的吸收;超微粉的休止角大于普通粉,说明流动性较差,在制剂过程中需要加入适当的助流剂。

板蓝根的有效成分存在细胞内,常规粉碎技术细胞破壁率低,大部分细胞不能被破坏仍保持完整结构,有效成分需经过提取的过程才能透过细胞壁、细胞膜发挥药效,而且仍有部分成分不能穿过细胞壁溶出发挥药理作用,造成了有效成分的损失,造成资源的浪费<sup>[17-18]</sup>。超微粉碎技术对板蓝根的破壁率高,有效成分不受细胞壁的阻力而直接快速溢出,粉体粒径小,表面积大,孔隙率增大,具有良好的溶解性和分散性,使溶出量和溶出速度均有提高,且化学结构不发生改变保持原有的生物活性<sup>[19]</sup>。这与蔡璐等<sup>[20]</sup>比较了人参超微粉与普通粉

中人参皂苷类成分的体外溶出度结果相一致。本实验研究结果可知,板蓝根超微粉不仅溶出的量较普通粉多,且溶出的速度快,15 倍加水量时溶出量最多,超微粉溶出量提高了 17.43%;多糖含量较普通粉提高了 11.72%。经 HPLC 检测(*R,S*)—告依春可知,板蓝根超微粉中告依春溶出的量较普通粉多,且溶出的速度快。我国板蓝根资源丰富,但是传统中药加工技术仍存在问题,在工业技术与医药科学迅速发展的今天,解决中药服用量大、煎煮麻烦、质量不稳定、机体吸收率低、药效发挥不充分等问题是推动中药行业发展的关键。而采用超微粉碎技术对中药进行加工,既保留了中草药原有的天然活性成分,又可加快有效成分的吸收,提高了中药的生物利用度,节约宝贵的中药资源,所以中药加工领域引进超微粉碎技术,为超微粉碎技术在中药加工方面的推广应用提供参考,对中药的可持续利用具有重要意义。

## 参考文献:

- [1] 郭武汉,关二旗,卞科. 超微粉碎技术应用研究进展[J]. 粮食与饲料工业,2015,(05):38~40.
- [2] Guo W H, Guan E Q, Bian K. Review on application of superfine grinding technology [J]. Cereal&Feed Industry, 2015, (05): 38~40.
- [3] De D H, Wei Q W, Zhi Q Z, et al. Preparation of ultra-fine powder using supercritical fluids: a review [J]. Applied Mechanics and Materials, 2012, 1603(148).
- [4] Liang Z C, Chu H B, Lin X, et al. Physicochemical properties and *in vitro* dissolution behavior of active ingredients in ultrafine powder of Eucommia ulmoides [J]. Chinese Traditional&Herbal Drugs, 2015, 46(11):1609~1614.
- [5] 张红刚,汪妮,李顺祥,等. 超微粉碎技术对中药有效成分提取效果影响研究[J]. 广州化工,2013,(16):63~65.  
Zhang H G, Wang N, Li S X, et al. Research on superfine grinding technology's influence on the effect of Chinese medicine effective components extraction [J]. Guangzhou Chemical Industry, 2013, (16): 63~65.
- [6] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(二部)2015 年版[S]. National Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China, 2015 edition[S].
- [7] Xu X Y, Zhou P. Pharmacological action and clinical application of Radix Isatidis [J]. Strait Pharmaceutical Journal, 2014, (08): 33~35.
- [8] Liu Y M, Han X D, Wang W L, et al. Determination of wall-broken rate of pol-lens by spectrophotometry [J]. Science & Technology of Food Industry, 2011, 32(7):400~402.
- [9] 温东妹,杨姗姗. 粉末直接压片制备格列美脲片[J]. 中国医药科学,2013,(22):46~48.  
Wen D M, Yang S S. Preparation of glim epiride tablets by direct powder compression [J]. China Medicine And Pharmacy, 2013, (22): 46~48.
- [10] 李成义,杨苗苗,张樱山,等. 甘肃不同产地板蓝根中多糖含量分析[J]. 西部中医药,2015,02:5~7.  
Li C Y, Yang M M, Zhang Y S, et al. Determination of polysaccharides in Banlangen from different habitats of gansu province [J]. Western Journal of Tradition-al Chinese Medicine, 2015, 02:5~7.
- [11] Shuai Y U, Ming-Juan L I, Zhou N, et al. Extraetion rates of flavonoids from ultrafine powder vs. fine powder of plantain [J]. Guangzhou Chemical Industry, 2015, 08:74~76
- [12] Nie L, Wang G, Dai Z, et al. Determination of epigoitrin and goitrin in isatis radix by chiral high performance liquid chromatography [J]. Chinese Journal of Chromatography, 2010, 28 (10): 1001~1004.
- [13] 吴敏,范春林,何鹏,等.HPLC 法测定板蓝根提取物中(*R,S*)—告依春的含量[J]. 海峡药学,2014,08:55~57.  
Wu M, Fan C L, He P, et al. Determination of (*R,S*)-goitrin contents in isatis extract by HPLC [J]. Strait Pharmaceutical Journal, 2014, 08:55~57.
- [14] 范凌云,王振恒,余琰,等. 不同粒径三黄粉粉体学性质及体外溶出度比较[J]. 中国中医药信息杂志,2015,(09):91~94.  
Fan L Y, Wang Z H, Yu Y, et al. Comparison of micromeritics properties and external dissolution rates of sanhuang powder with different particle sizes [J]. Chinese Journal of information on TCM, 2015, (09): 91~94.
- [15] Jie C L, Zhong G J, Xin H L, et al. Effect of ult-rfine pulverization on properties of apple pomace powder [J]. Advanced Materials Research, 2011, 1267(236).
- [16] Jürgen T, Guido K. Micro- and macromechanics of hopper discharge of ultrafine cohesive powder [J]. International Journal of Chemical Reactor Engineering, 2012, 10(1):1656~1656.
- [17] Qiumei S, Xinhua S, Xiumin W, et al. Particle sizes and antibacterial activity of *Radix astragalus* and *Radix isatidis* ultrafine powders [J]. Agricultural Biotechnology, 2016, (04):42~45,50.

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2017.10.09

# 兽药大数据平台的应用架构研究

高录军, 刘玲, 张积慧, 郝毫刚, 李晓平, 唐军, 刘雨, 赵丽丹\*

(中国兽医药品监所, 北京 100081)

[收稿日期] 2017-07-26 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2017) 10-0062-06 [中图分类号] S851.66

**[摘要]** 兽药大数据对兽药监管、兽药行业健康发展以及疫病防控具有重要意义。针对现有的兽药海量数据进行大数据应用研究, 提出了兽药大数据平台的应用方向和应用架构, 以期为兽药大数据平台的应用发展提供参考。

**[关键词]** 兽药; 大数据; 应用; 模式

## Research on Application Framework of Big Data Platform for Veterinary Drugs

GAO Lu-jun, LIU Ling, ZHANG Ji-hui, HAO Hao-gang, LI Xiao-ping, TANG Jun, LIU Yu, ZHAO Li-dan\*

(China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China)

Corresponding author: ZHAO Li-dan, E-mail: zhaolidan@ivdc.org.cn

**Abstract:** The veterinary drug big data is in great significance towards the veterinary drug supervision, healthy development of the industry, and disease prevention and control. In this paper, the application direction and structure of the big data platform for veterinary drugs are put forward. This can provide a reference for the application and development of the big data platform for veterinary drugs.

**Key words:** veterinary drug; big data; application; mode

---

基金项目: 农业部重大信息平台构建及运维专项(2130104)

作者简介: 高录军, 硕士, 工程师, 从事兽药信息化建设及研究。

通讯作者: 赵丽丹。E-mail: zhaolidan@ivdc.org.cn

---

[17] 吴文博, 董占军. 中药制剂中细胞破壁技术探讨[J]. 中国药房, 2011, 22(3):285-287.

Wu W B, Dong Z J. Exploration of cell wall broken technology of traditional Chinese medicine preparation [J]. China pharmacy, 2011, 22(3):285-287.

[18] Wang D, Fan Z M, Deng L R, et al. Review on classification and application prospect of ultrafine powder material [C]. Materials Science Forum. 2014;272-277.

[19] Etzler F M, Uddin M N. Powder technology and pharmaceutical

development: particle size and particle adhesion [J]. Kona, 2013, 30(30):125-143.

[20] 蔡璐, 梁少瑜, 戴开金, 等. 人参超微粉与细粉的体外溶出度比较[J]. 南方医科大学学报, 2013, (10):1547-1550.

Cai L, Liang S Y, Dai K J, et al. Comparison of dissolution properties between Ginseng micropowder and common powder [J]. J South Med Univ, 2013, (10):1547-1550

(编 辑:陈希)