



· 制剂与炮制 ·

溶液环境对中药模拟体系陶瓷膜微滤过程的影响

张连军, 陆瑾, 乐康, 付廷明, 郭立玮*

(南京中医药大学 中药复方分离工程重点实验室, 江苏 南京 210029)

[摘要] 目的:探讨不同“溶液环境”对中药模拟体系陶瓷膜微滤过程的影响。方法:以大豆蛋白、小檗碱二元体系为考察对象,以膜通量、小檗碱透过率、蛋白质截留率为指标,考察不同溶液环境对于膜过程的影响。结果:大豆蛋白在 $1\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的质量浓度下,膜通量最小,小檗碱的透过率随浓度增加略有降低;pH 4 时膜通量最大,蛋白质截留率达 99%,且小檗碱的透过率达到 60% 以上。结论:通过优化中药水提液的溶液环境,可以有效提高膜分离的效率,对于以蛋白质为主要膜污染物的溶液体系,调节 pH 至蛋白质的等电点附近时,膜分离效果较好。

[关键词] 溶液环境;膜通量;模拟体系;蛋白质;小檗碱

膜分离技术是当前热点的分离技术之一,目前在医药、食品、环保、化工、水处理等领域已经被广泛采用。然而,膜污染问题始终是制约膜分离技术进一步推广应用的因素之一。而当前对于膜污染机制的研究还有待深入,本课题从药液自身的性质入手,采用系统模拟的方法,根据中药水提液中高分子含量和主要药效物质建立模拟体系,通过调节“溶液环境”进行系统研究。

“溶液环境”是指溶液体系所具有的黏度、pH、离子强度、电解质成分等特征性质。中药水提液是数千年中医传统用药习性的沿袭,也是中药制药工艺过程最基本的中间产物。因处方与提取工艺不同,各中药水提液体系中蛋白质等共性高分子物质占有的比例也不相同,即具有不同的“溶液环境”,而这些性质直接影响到与之接触的膜的表面性质,同时溶液性质的变化还会改变其中所含的待分离颗粒或大分子溶质的性质,造成了膜与溶剂、与颗粒、溶质等之间的作用发生变化,从而影响到膜的分离性能^[1]。

在中药水提液的各样品中,蛋白质是固含物中

占有较高比例的高分子物质之一,且是影响水提液体系物理化学参数及膜通量的主要因素之一;小檗碱是一种具有广泛的药理作用的异喹啉类生物碱,应用较广。因此,本实验选择大豆蛋白、小檗碱分别模拟中药水提液体系中蛋白质类高分子物质及指标性成分,考察不同“溶液环境”对中药模拟体系陶瓷膜微滤过程的影响,以期待深化对中药水提液复杂体系的认识,为开展膜分离及相关精制技术应用系统优化设计提供依据。

1 材料

微型陶瓷膜装置(南京工业大学膜科学与技术研究所研制,膜孔径 $0.2\ \mu\text{m}$,膜材质 ZrO_2 ,外形尺寸外径 12 mm,内径 8 mm,长 22 mm)。

大豆分离蛋白(焦作市中科植物蛋白有限公司);小檗碱(南京泽朗医药科技有限公司);盐酸小檗碱对照品(中国药品生物制品检定所,批号 110713-200208);乙腈、甲醇均为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

Waters 515 双泵液相色谱仪(2487 双波长紫外检测器,WDL-95 色谱工作站);Spectrum 754 型紫外-可见分光光度计(上海分析仪器厂);Shimadzu Li-brorAEL-40SM 电子天平(1/10 万,日本 Shimadzu 公司);雷磁 PHSJ-4A 实验室 pH 计(上海精密科学仪器有限公司);雷磁 DDSJ-308A 电导率仪(上海精密科学仪器有限公司);SZD-II 型智能化散射光浊度仪(上海自来水给水设备工程公司);DV-II + Pro 型旋转黏度计(美国 Brookfield 仪器有限公司)。

[稿件编号] 20100308001

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30873449)

[通信作者] *郭立玮,研究员,博士生导师,从事以膜技术为主体的中药复方分离工程研究, Tel: (025) 86798188, E-mail: guoliwei815@yahoo.com.cn

[作者简介] 张连军,硕士,主要从事中药制备高新技术研究, E-mail: zhanglj1019@163.com



2 方法

2.1 模拟体系的配制 精密称取一定量的大豆蛋白及小檗碱,分别配制成 $0.2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 小檗碱 + $0.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 蛋白水溶液(模拟溶液 A), $0.2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 小檗碱 + $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 蛋白水溶液(模拟溶液 B), $0.2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 小檗碱 + $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 蛋白水溶液(模拟溶液 C), $0.2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 小檗碱 + $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 蛋白水溶液(模拟溶液 D), $0.2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 小檗碱 + $3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 蛋白水溶液(模拟溶液 E)。将模拟溶液 B 调节 pH, 分别为 pH 4(模拟溶液 B₁), pH 6.5(模拟溶液 B₂), pH 9(模拟溶液 B₃); 将模拟溶液 B 按 $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度加入 Na_2SO_4 调节离子强度(模拟溶液 B₄); 将模拟溶液 B 按 $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度加入 NaCl 调节离子强度(模拟溶液 B₅)。

2.2 微滤试验 在操作压力为 0.15 MPa , 膜面流速为 $3 \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$, 温度为 $50 \text{ }^\circ\text{C}$ 的条件下, 将孔径为 $0.2 \text{ }\mu\text{m}$ 的 ZrO_2 膜在实验装置上错流微滤, 待通量稳定后, 测其相应的膜通量, 根据 M M Dal-Cin 修改过的阻力模型^[2], 将阻力 $D_{\text{总}}$ 分为膜自身阻力 D_{m} 、吸附阻力 D_{e} 、堵孔阻力 D_{i} 和浓差极化阻力 D_{p} , 计算各分解阻力在总阻力 $D_{\text{总}}$ 中所占的百分比。

2.3 模拟溶液中蛋白质含量测定^[3] 精密称取 10 mg 牛血清白蛋白, 用蒸馏水定容于 10 mL 量瓶中。分别精密移取 $0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 \text{ mL}$ 该液至试管中, 加蒸馏水稀释至 1 mL 后摇匀。从各试管中分别吸取溶液 0.1 mL , 加入 5 mL 考马斯亮蓝 G-250, 混匀, 放置 2 min 后于 595 nm 下测定吸光度(A), 以 A 为纵坐标, 蛋白质质量浓度 $C(\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$ 为横坐标, 绘制标准曲线。

样品的测定: 吸取待测样品 0.1 mL , 加入 5 mL 考马斯亮蓝 G-250, 充分混合, 放置 2 min 后在 595 nm 测其吸光度, 代入标准曲线计算蛋白质浓度。

2.4 模拟溶液理化参数测定 pH 测定: 取样品 20 mL , 以校正过的精密 pH 计测定样品的 pH。浊度测定: 取样品 50 mL , 测定样品在 $50 \text{ }^\circ\text{C}$ 时的浊度值。黏度测定: 取样品 20 mL , 测定样品在 $50 \text{ }^\circ\text{C}$ 时的黏度值。电导率测定: 取样品 20 mL , 测定样品在 $50 \text{ }^\circ\text{C}$ 时的电导率。

2.5 模拟溶液中中药效物质含量测定^[4] HPLC 分析条件 以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂; 流动相 $0.033 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸二氢钾-乙腈(60:40); 检测波长 265 nm ; 柱温 $30 \text{ }^\circ\text{C}$; 流速 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 。

对照品溶液的制备 取干燥后盐酸小檗碱对照品适量, 精密称定, 加甲醇制成每 1 mL 含 $5.2 \text{ }\mu\text{g}$ 的溶液, 即得。

3 结果

3.1 不同溶液环境对膜通量衰减的影响 不同浓度模拟溶液的膜通量见图 1, 模拟溶液 A 膜通量最大, 起始膜通量达 $1772.4 \text{ L} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$, 但衰减幅度较大, 膜通量稳定后降至 $1105.2 \text{ L} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$; 随着溶液的蛋白质浓度逐渐增大, 膜通量不断下降, 模拟溶液 C 膜通量最小, 稳定时的膜通量降至 $289.2 \text{ L} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$, 但由于起始通量相对也低, 所以膜通量降低幅度较小; 当浓度继续增大, 相比于模拟溶液 C, 膜通量出现了一定程度的回升, 质量浓度为 $2, 3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 膜稳定通量分别为 $457.2, 548.4 \text{ L} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$, 但与低浓度模拟溶液的膜通量相比较还是较低。

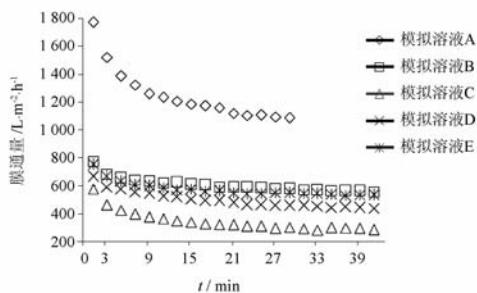


图 1 不同浓度模拟溶液的时间-通量曲线

溶液在低浓度时, 蛋白质的含量相对较低, 膜污染也较轻, 因此膜通量较大, 见表 1, 溶液的浓度不断增加, 溶液的电导率和浊度也逐步提高, 尤其是溶液的浊度急剧升高, 最高达到 320。也就是说, 高浓度时溶液中蛋白质悬浮颗粒的比例急剧升高, 这些蛋白质悬浮颗粒可能吸附在膜表面, 形成一层凝胶层, 阻碍微滤过程的进行, 将膜管内表面刷洗后, 膜通量由 $289.2 \text{ L} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$ 恢复至 $481.2 \text{ L} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$; 同时一些小颗粒物质会随着微滤过程堵塞膜孔而使通量降低。由于溶液中蛋白质含量较高, 在微滤刚开始时, 膜表面会被迅速污染, 致使起始通量较低, 并且在短时间内对膜的污染达到一个相对平衡的状态, 进而使膜通量的降幅趋于平缓。当溶液浓度超过一定限度时, 蛋白质分子之间相互作用, 使蛋白质的带电性质及分子构象等发生了一定程度的变

表 1 不同浓度模拟溶液的理化参数

模拟溶液	pH		电导率/ $\mu\text{s} \cdot \text{cm}^{-1}$		浊度/NTU		黏度/ $\text{mPa} \cdot \text{s}^{-1}$	
	原液	渗透液	原液	渗透液	原液	渗透液	原液	渗透液
A	7.506	7.609	48.7	40.2	21.8	0.09	0.81	0.81
B	7.227	6.994	52.6	35.4	54.4	0.11	0.78	0.76
C	7.542	7.324	64.1	42.3	119.0	0.20	0.76	0.74
D	7.540	7.120	92.5	54.0	236.0	0.86	0.85	0.84
E	7.800	7.000	89.6	52.5	320.0	0.94	0.84	0.78

化,如蛋白质所带电荷的变化使膜表面吸附量降低,蛋白质分子链由线性的构型盘旋成一种卷曲甚至球状的分子构型,这些变化都会影响到膜表面的吸附污染、膜孔堵塞等,使膜通量有一定程度回升。但同时溶液的黏度也更大,这不利于微滤过程的进行,因此,膜通量略有回升,但相对而言还是较低。

中药水提液中蛋白质含量一般在 $0.05 \sim 3.8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,因此本实验选择模拟溶液 B 调节 pH 及离子强度。通过调节模拟溶液的 pH 及离子强度,膜通量也相应的有一定程度的变化,见图 2,模拟溶液 B₁ 的起始通量与稳定通量都最大,分别达到 $1592.4, 987.6 \text{ L} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$ 。未进行 pH 调节的模拟溶液 B 的起始通量为 $772.8 \text{ L} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$,稳定时的膜通量为 $568.8 \text{ L} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$ 。当 pH 调节到 4 时,起始通量和稳定时的膜通量都有了大幅度的提高。由于实验采用的装置是不锈钢材质,因 pH 继续降低会腐蚀设备,模拟溶液的 pH 未进一步调低。当 pH 为 6.5 时,膜通量与模拟溶液 B 相比变化不大,稳定膜通量为 $549.6 \text{ L} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$;而调至 pH=9 时,起始通量有所上升为 $1114.8 \text{ L} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$,但膜通量随时间的变化较快,稳定后膜通量已降至 $350 \text{ L} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$ 左右。另外,采用 Na_2SO_4 及 NaCl 调节离子强度后,膜通量无明显变化。

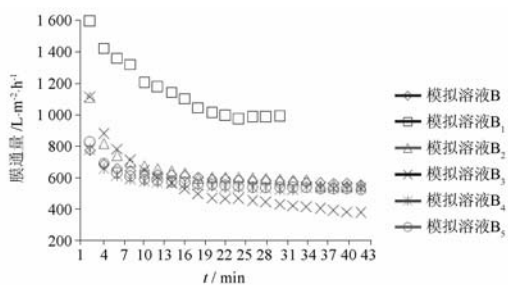


图 2 不同 pH、离子强度模拟溶液的时间-通量曲线

蛋白质的等电点一般在 4.5 左右,pH 调节为 4 时,溶液环境达到蛋白质的等电点附近,使蛋白质胶体颗粒趋向于沉淀和不稳定;同时在酸性条件下,蛋白质容易变性而析出,因此,溶液的浊度突然增大至 280,见表 2。蛋白质的沉淀颗粒较大,这有利于减轻膜孔堵塞;同时大颗粒物质在膜表面形成的沉积物相对空间空隙更大,这些都有利于维持较高的膜通量。此外,蛋白质沉淀后溶液的黏度有所降低,这也是造成膜通量较大的因素之一。酸的加入使溶液中的 H^+ 浓度变大,从而溶液的电导率也相应提高。酸的加入一方面可以调节蛋白质的表面电荷,影响其在膜表面的吸附;另一方面也可以调节膜表面的电荷,当蛋白质胶体颗粒所带电荷与膜表面电荷相斥,则可减少膜表面吸附,降低膜污染,提高膜通量。调节离子强度时, Na_2SO_4 及 NaCl 的加入使溶液的电导率急剧增高,最高时达到 $1622 \mu\text{s} \cdot \text{cm}^{-1}$,盐类物质可以调节蛋白质及膜表面电荷,影响蛋白质在膜表面的吸附;同时蛋白质分子也会因盐析作用而沉淀,因此溶液浊度略有增加,这些因素都会对膜通量造成影响。但调节离子强度后,溶液的黏度也有较明显的提高,这可能是造成膜通量变化不明显的因素之一。

3.2 不同溶液环境对药效物质转移率和蛋白质截留率的影响 模拟溶液中药效物质小檗碱的透过率及蛋白质的截留率见表 3。小檗碱的透过率随着模拟溶液 A, B, C, D, E 中蛋白质含量逐渐升高总体上呈下降趋势。说明蛋白质含量与小分子药效物质的透过率存在一定的相关性,高分子物质在膜过程中凝胶层的形成以及浓差极化等因素都会阻碍小分子物质的透过。调节 pH 和离子强度等会影响蛋白质与小檗碱之间的相互作用,进而影响到小檗碱的透过率。小檗碱在稀酸环境中溶解度较大,可以降低小檗碱与蛋白质之间的吸附而有利于小檗碱的透过。溶液离子强度的变化会影响到蛋白质分子的构



表 2 不同 pH、离子强度模拟溶液的理化参数

模拟溶液	pH		电导率/ $\mu\text{s} \cdot \text{cm}^{-1}$		浊度/NTU		黏度/ $\text{mPa} \cdot \text{s}^{-1}$	
	原液	渗透液	原液	渗透液	原液	渗透液	原液	渗透液
B	7.227	6.994	52.6	35.4	54.4	0.11	0.78	0.76
B ₁	4.120	5.500	162.0	94.8	280.0	0.29	0.76	0.75
B ₂	6.210	6.720	68.4	45.4	168.0	0.16	0.85	0.84
B ₃	8.452	7.345	54.5	28.5	118.0	0.35	0.80	0.80
B ₄	7.237	6.845	1 622.0	1 550.0	68.7	1.06	0.82	0.81
B ₅	6.693	6.402	731.0	627.0	68.7	1.36	0.87	0.87

表 3 模拟溶液药效物质透过率及蛋白质截留率 %

模拟溶液	蛋白质截留率	小檗碱透过率
A	76.58	54.56
B	88.75	77.44
C	95.84	51.84
D	99.28	45.93
E	98.65	43.74
B ₁	99.68	60.29
B ₂	98.62	50.23
B ₃	86.21	79.87
B ₄	87.52	68.40
B ₅	89.64	43.58

象,在适当的离子强度条件下,可降低蛋白质分子对于小檗碱的包裹而增加透过率。同时 pH 和离子强度的变化,使得膜表面性质也会发生相应变化,进而影响到膜表面蛋白质凝胶层的形成,这些也是影响小檗碱透过率的因素之一。

通过表 3 还可以看到 0.2 μm 的陶瓷膜对于模拟溶液中的蛋白质截留率较高。对于蛋白含量较高的模拟溶液,截留率达到 95% 以上。通过调节 pH 可以使蛋白质沉淀析出,更有利于蛋白质的去除,而且 pH 在等电点附近时,膜通量较大,小檗碱的透过率相对也较高。

3.3 不同溶液环境对阻力分布的影响 根据 M M Dal-Cin 修改过的阻力模型,将阻力 $D_{\text{总}}$ 分为膜自身阻力 D_m 、吸附阻力 D_e 、堵孔阻力 D_i 和浓差极化阻力 D_p ,计算各分解阻力在总阻力 $D_{\text{总}}$ 中所占的百分比。结果模拟溶液 A 和 B 因蛋白质含量较低,膜阻力主要集中在膜自身阻力,分别占了 47%,45%,堵孔阻力起次要作用,占到 25% 左右,吸附阻力所占比例较小。模拟溶液 C 的膜阻力主要为吸附阻力,占了 45%,在此浓度时,溶液的电导率和浊度都有大幅度增加,使膜表面吸附和膜孔堵塞较为严重,这是造成膜通量最小的主要因素。模拟溶液 D 和 E 浓度继

续增大,溶液的电导率和浊度也不断提高,此时吸附阻力所占比例降至 15% 左右,主要膜阻力为堵孔阻力,膜自身阻力次之,浓差极化阻力所占比例一般稳定在 15% 左右。可见吸附阻力是影响膜通量的主要因素,在实际操作时,应该根据具体情况采用适当的措施降低吸附阻力对膜通量的影响。

调节 pH 和离子强度的模拟溶液的浓差极化阻力、吸附阻力变化不大。从整体来看,随着 pH 的升高,堵孔阻力的比例都有不同程度的增加,尤其在 pH 9 时,堵孔阻力占到 66%,而此条件下膜通量并未有明显下降。在 pH 4 时,膜通量有显著性的提高,此时膜阻力主要为膜自身阻力及堵孔阻力,分别占 44%,39%。调节离子强度的模拟溶液堵孔阻力也占到 45% 左右,而膜通量并无明显变化,与未调节时基本持平。可见对于以蛋白质为主要污染物的溶液,堵孔阻力对于膜通量的影响较弱。

4 结论

在大豆蛋白、小檗碱二元体系模拟溶液中,蛋白质的含量对膜通量有较大影响。随着蛋白浓度的增高,膜通量不断降低;大豆蛋白在 $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的质量浓度下,膜通量最小,此时吸附阻力是影响膜通量的主要因素,通过调节溶液环境可有效降低膜表面吸附阻力,提高膜通量;浓度继续增加,膜通量略有回升,但总体上还是较低。调节 pH 4 时膜通量较大,其他 pH 及离子强度条件下,吸附阻力所占比例降低,尽管堵孔阻力占得比例较大,但膜通量无明显变化。在各种溶液环境下,0.2 μm 的陶瓷膜对于模拟溶液中的大豆蛋白都有较高的截留率。其中的药效物质——小檗碱的透过率随蛋白含量的升高有所降低,调节溶液环境时应综合考虑到其中药效物质的转移率、高分子的截留率及膜通量。可以考虑针对不同待分离物料的性质,采用有针对性的预处理手段,并耦合超声、电磁场调节等先进技术,调节溶液



环境,实现膜分离效果的优化。

中药水提液可被视为一种由混悬液、乳浊液与真溶液共同组成的十分复杂的混合分散体系,作为一种“高分子稀溶液”的类似体系,其中的蛋白质等高分子物质的存在状态及由此形成的溶液环境(如黏度、pH、离子强度等)对于膜过程都会产生影响。中药水提液的复杂性使得在膜过程研究中难以精确定量与建模,而采用二元模拟体系作为研究对象,有利于将复杂体系简单化,通过对各单个高分子膜污染机制的研究,并在此基础上进行归纳演绎,深化对中药水提液膜污染的认识。基于此方式相类似的研究有李梅生等^[5]采用不同配比的牛血清白蛋白、葡聚糖二元体系模拟中药水提液中的蛋白质和多糖类膜污染物,考察对膜污染起主导作用的成分。而本实验的创新在于通过对待分离体系溶液环境的调节,结合阻力分布测定的方法研究膜污染的机制,在膜污染机制研究的基础上提出了一些解决的方法,即调节溶液环境,在兼顾膜通量及高分子截留率的

同时,也考察了各种溶液环境对目标产物透过率的影响。小檗碱对心脑血管系统、血糖、肿瘤及肝脏等多方面具有药理作用,是近年来研究的一个热点,而含小檗碱类中药水提液在进行膜分离时也存在严重膜污染问题,此研究方法可作为深化对于中药复杂体系认识的一种探索,对于含小檗碱类中药水提液进行陶瓷膜微滤的研究具有一定的参考意义。

[参考文献]

- [1] 郭立玮,付廷明,李玲娟. 面向中药复杂体系的陶瓷膜污染机理研究思路与方法[J]. 膜科学与技术,2009,29(1):1.
- [2] Qusman M, Benneer M. Determination of various hydraulic resistances during cross-flow filtration of starch grain suspension through inorganic membranes[J]. J Membr Sci, 1995:10.
- [3] 董洁,朱华旭,郭立玮. 黄连解毒汤模拟体系的超滤膜过程研究[J]. 中国中药杂志,2009,34(19):2458.
- [4] 卢日刚,唐敏玲,韦向红,等. RP-HPLC 法测定妇康洗液中盐酸小檗碱的含量[J]. 药物分析杂志,2002,22(3):195.
- [5] 李梅生,赵宜江,周守勇,等. 中药模拟体系陶瓷膜微滤过程研究[J]. 中成药,2009,31(5):718.

Effect of solution environments on ceramic membrane microfiltration of model system of Chinese medicines

ZHANG Lianjun, LU Jin, LE Kang, FU Tingming, GUO Liwei*

(Key Laboratory of Separation Engineering for Chinese Medicine Compound, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of different solution environments on the ceramic membrane microfiltration of model system of Chinese medicines. **Method:** Taking binary system of soybean protein-berberine as the research object, flux, transmittance of berberine and trapping rate of protein as indexes, different solution environment on membrane process were investigated. **Result:** When the concentration of soybean protein was under $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, the membrane flux was minimum with the trapping of berberine decreased slightly as the concentration increased. When pH was 4, the flux was maximum with the trapping rate of protein was 99%, and the transmittance of berberine reached above 60%. **Conclusion:** The efficiency of membrane separation can be improved by optimizing the solution environment of water-extraction of Chinese medicines. The efficiency of membrane separation is the best when adjust the pH to the isoelectric point of proteins for the proteins as the main pollutant in aqueous solution.

[Key words] solution environment; membrane flux; the distributing of filtration resistance; protein; berberine

doi: 10.4268/cjcm20101308

[责任编辑 周驰]