

中图分类号: R932; R284.1; R286.0 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2023)21-0090-04
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2023.21.020



高效液相色谱法同时测定扁蕾颗粒中5种有效成分含量*

问 静¹, 石春兰¹, 韩达斌¹, 刘海青¹, 刘安平², 李维业², 徐文胜³, 邹存生³, 刘学良^{1Δ}

(1. 青海省药品审评核查中心, 青海 西宁 810007; 2. 青海省西宁市食品药品检验检测中心, 青海 西宁 810007; 3. 三普药业有限公司, 青海 西宁 810016)

摘要:目的 建立同时测定扁蕾颗粒中马钱苷酸、当药苷、芒果苷、木犀草素、1,7-二羟基-3,8-二甲氧基吡啶酮含量的高效液相色谱法。方法 色谱柱为 Waters SunFire ODS C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-0.05% 磷酸溶液(梯度洗脱), 流速为 1.0 mL/min, 检测波长为 254 nm, 柱温为 30 ℃, 进样量为 10 μL。结果 马钱苷酸、当药苷、芒果苷、木犀草素、1,7-二羟基-3,8-二甲氧基吡啶酮的进样量分别在 0.020 6~0.412 0 μg、0.201 0~4.020 0 μg、0.008 0~0.160 0 μg、0.056 6~1.132 0 μg、0.015 0~0.300 0 μg 范围内与峰面积线性关系良好($r \geq 0.999 8$, $n = 6$); 精密性、稳定性、重复性试验结果的 RSD 均小于 2.0% ($n = 6$); 平均加样回收率分别为 96.24%, 98.16%, 96.67%, 98.06%, 97.84%, RSD 分别为 0.84%, 0.89%, 1.06%, 0.92%, 1.57% ($n = 6$); 5 批样品中上述成分的含量分别为 0.53~0.56 mg/g、8.30~8.44 mg/g、0.23~0.26 mg/g、1.06~1.11 mg/g、0.73~0.76 mg/g。结论 该方法快捷简便、分别可靠、稳定性好, 可用于扁蕾颗粒制剂的质量控制。

关键词: 扁蕾颗粒; 高效液相色谱法; 马钱苷酸; 当药苷; 芒果苷; 木犀草素; 1,7-二羟基-3,8-二甲氧基吡啶酮

Simultaneous Determination of Five Components in Bianlei Granules by HPLC

WEN Jing¹, SHI Chunlan¹, HAN Dabing¹, LIU Haiqing¹, LIU Anping², LI Weiye², XU Wensheng³, ZOU Cunsheng³, LIU Xueliang¹

(1. Qinghai Center for Drug Evaluation and Inspection, Xining, Qinghai, China 810007; 2. Xining Center for Food and Drug Inspection & Testing, Xining, Qinghai, China 810007; 3. S&P Pharmaceutical Co., Ltd., Xining, Qinghai, China 810016)

Abstract: Objective To establish a high-performance liquid chromatography (HPLC) method for the simultaneous determination of loganic acid, sweroside, mangiferin, luteolin, and 1,7-dihydroxy-3,8-dimethoxykozanone in Bianlei Granules. **Methods** The

* 基金项目: 青海省科技计划项目[2020-ZJ-747]。

第一作者: 问静, 女, 大学本科, 主管药师, 研究方向为药品审评核查, (电话)0971-8827309(电子信箱)412818388@qq.com。

Δ 通信作者: 刘学良, 男, 大学本科, 副主任药师, 研究方向为药品审评核查, (电话)0971-8865539(电子信箱)93684218@qq.com。

中国医药科技出版社, 2020:960-961.

[2] 赵海鹏, 齐衍超, 祁立新, 等. 市售复方甘草片的质量评价[J]. 中国现代应用药学, 2022, 39(13):1737-1743.

[3] 国家食品药品监督管理局. 关于切实加强部分含特殊药品复方制剂销售管理的通知[A/OL]. (2009-08-18)[2023-02-17]. <https://www.nmpa.gov.cn/xxgk/fgwj/gzwj/gzwjyp/20090818093801896.html>.

[4] 国家药品监督管理局. 国家药品监督管理局总局办公厅关于进一步加强含可待因复方口服溶液、复方甘草片和复方地芬诺酯片购销管理的通知[A/OL]. (2013-07-08)[2023-02-17]. <https://www.nmpa.gov.cn/xxgk/fgwj/gzwj/gzwjyp/20130708120001776.html>.

[5] 国家药品监督管理局. 国家药品监督管理局总局办公厅关于进一步加强含麻醉药品和曲马多口服复方制剂购销管理的通知[A/OL]. (2014-06-05)[2023-02-17]. <https://www.nmpa.gov.cn/xxgk/fgwj/gzwj/gzwjyp/20140605140601101.html>.

[6] 国家药品监督管理局. 国家药监局关于修订复方甘草片说明书的公告(2020年第14号)[EB/OL]. (2020-03-03)[2023-02-17]. <https://www.nmpa.gov.cn/xxgk/ggtg/ypshmsxsdg/20200303171701693.html>.

[7] 刘 静, 李树先, 朱 江, 等. 浅谈几种重金属元素对人体的危害及其预防措施[J]. 中国资源综合利用, 2018, 36(3):182-184.

[8] 张 美, 董文静, 王 荣, 等. 喉痛灵制剂中重金属及有害元素与禁用农药残留量测定[J]. 中国药业, 2022, 31(21):63-69.

[9] 张 晶, 祖全花, 李智敬, 等. 仿生提取电感耦合等离子体-质谱法同时测定小儿惊风七厘散中可溶性有害元素含量[J]. 中国药业, 2021, 30(15):85-88.

[10] 费毅琴, 肖 凌, 汪 波, 等. 37种植物类药材中重金属和有害元素残留分析及风险评估[J]. 药物分析杂志, 2021, 41(6):1000-1008.

[11] 王 蓉, 郭伟娜, 周中浩, 等. 不同产地甘草中重金属及有害元素含量测定[J]. 山西中医药大学学报, 2021, 22(2):113-115.

[12] 饶春毅, 李 彪, 贾海涛, 等. 电感耦合等离子体质谱法快速测定布洛芬注射液中15种元素的含量[J]. 中国药师, 2016, 19(5):1000-1003.

[13] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(四部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020:520-522.

[14] 聂黎行, 查伟凡, 左甜甜, 等. 基于ICP-MS和对照制剂的牛黄清胃丸中重金属及有害元素残留量测定及风险评估[J]. 中国中药杂志, 2019, 44(1):82-87.

[15] 左甜甜, 金红宇, 屈浩然, 等. 药食同源品种中重金属及有害元素的风险评估[J]. 中国药业, 2019, 28(9):31-34.

(收稿日期: 2023-03-01; 修回日期: 2023-06-01)

chromatographic column was Waters SunFire ODS C_{18} column (250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m), the mobile phase was methanol - 0.05% phosphoric acid solution (gradient elution), the flow rate was 1.0 mL / min, the detection wavelength was 254 nm, the column temperature was 30 $^{\circ}$ C, and the injection volume was 10 μ L. **Results** The linear ranges of loganic acid, sweroside, mangiferin, luteolin and 1,7 - dihydroxy - 3,8 - dimethoxyxanthone were 0.020 6 - 0.412 0 μ g, 0.201 0 - 4.020 μ g, 0.008 0 - 0.160 0 μ g, 0.056 6 - 1.132 0 μ g, 0.015 0 - 0.300 0 μ g ($r \geq 0.999 8, n = 6$), respectively. The RSDs of precision, stability, and repeatability test results were lower than 2.0% ($n = 6$). The average recoveries were 96.24%, 98.16%, 96.67%, 98.06% and 97.84%, with RSDs of 0.84%, 0.89%, 1.06%, 0.92%, and 1.57% ($n = 6$), respectively. The contents of the above components in the five batches of samples were in the ranges of 0.53 - 0.56 mg / g, 8.30 - 8.44 mg / g, 0.23 - 0.26 mg / g, 1.06 - 1.11 mg / g, and 0.73 - 0.76 mg / g, respectively. **Conclusion** The method is fast, simple, stable, and reliable, which can be used for the quality control of Bianlei Granules.

Key words: Bianlei Granules; HPLC; loganic acid; sweroside; mangiferin; luteolin; 1,7 - dihydroxy - 3,8 - dimethoxykozanone

扁蕾颗粒是藏药湿生扁蕾用水煎煮、浓缩后,取浸膏加辅料制粒干燥而成的单方制剂,具有清热燥湿、利湿干黄水功效,临床主要用于治疗小儿腹泻和肠胃炎^[1]。湿生扁蕾 *Gentianopsis paludosa* (Mum.) Ma 为龙胆科植物湿生扁蕾的全草,1年或2年生草本,花盛期采集,全草入药,产于西藏、青海、四川、云南等地,具有清温热、利胆、止泻功效,临床主要用于黄疸型肝炎、肝胆病引起的发烧、感冒、小儿腹泻等疾病的治疗^[2-5]。目前,扁蕾颗粒收载于《卫生部药品标准·蒙药分册》^[1],仅有性状及检查项(颗粒剂制剂通则项目),不能有效控制药品质量。参考文献[6-12],本研究中采用高效液相色谱(HPLC)法同时测定制剂湿生扁蕾中有效成分马钱苷酸、当药苷、芒果苷、木犀草素、1,7-二羟基-3,8-二甲氧基吡啶酮的含量,旨在为扁蕾颗粒质量标准的进一步研究提供参考。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Waters e2695型高效液相色谱仪(美国Waters公司),配有Waters 2998 PDA detector型二极管阵列检测器;ME204型电子天平(精度为0.1 mg),XS105DU型超越系列专业型XS分析天平(精度为0.01 mg),均购于瑞士Mettler Toledo公司;SB25-12DT型新芝超声波清洗机(宁波新芝生物科技股份有限公司,功率为600 W,频率为50 kHz);Milli-Q2355型超纯水机(美国Millipore公司)。

1.2 试剂

马钱苷酸对照品(批号为111865-202005,纯度为97.5%),当药苷对照品(批号为111742-200501,纯度为99.27%),芒果苷(批号为111607-201704,纯度为98.1%),木犀草素对照品(批号为111720-202111,纯度为99.1%),均购自中国食品药品检定研究院;1,7-二羟基-3,8-二甲氧基吡啶酮对照品(中科院西北高原生物研究所孙洪发研究员提供,纯度不低于96%);甲醇(色谱纯,德国默克股份两合公司,批号为11163207138);磷酸(色谱纯,上海安谱实验科技股份

有限公司,批号为Z0510032);水为超纯水;扁蕾颗粒(三普药业有限公司,批号分别为190702,190703,190704,191002,191003,规格为每瓶12 g)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件与系统适用性试验^[8-12]

色谱柱:Waters SunFire ODS C_{18} 柱(250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m);流动相:甲醇(A)-0.05%磷酸溶液(B),梯度洗脱(0~5 min时20%A \rightarrow 25%A,5~7 min时25%A,7~30 min时25%A \rightarrow 55%A,30~35 min时55%A \rightarrow 90%A,35~40 min时90%A,40~45 min时90%A \rightarrow 20%A,45~50 min时20%A);流速:1.0 mL / min;检测波长:254 nm;柱温:30 $^{\circ}$ C;进样量:10 μ L。在此色谱条件下,马钱苷酸、当药苷、芒果苷、木犀草素、1,7-二羟基-3,8-二甲氧基吡啶酮色谱峰与样品中其他成分分色谱峰离度均大于1.5,理论板数均不低于5 000。色谱图见图1。

2.2 溶液制备

分别取马钱苷酸对照品10.56 mg,当药苷对照品8.10 mg,芒果苷对照品8.15 mg,木犀草素对照品5.71 mg,1,7-二羟基-3,8-二甲氧基吡啶酮对照品7.81 mg,精密称定,分别置50,10,100,10,50 mL容量瓶中,加甲醇超声使溶解并定容,摇匀,作为对照品贮备液;分别取上述对照品贮备液2,5,2,2,2 mL,置20 mL容量瓶中,加甲醇超声使溶解并定容,摇匀,即得马钱苷酸、当药苷、芒果苷、木犀草素、1,7-二羟基-3,8-二甲氧基吡啶酮质量浓度分别为0.020 6,0.201 0,0.008 0,0.056 6,0.015 0 mg / mL的混合对照品溶液。

取样品适量,研细,取0.5 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇25 mL,摇匀,称定质量,超声提取(功率为250 W,频率为50 kHz)30 min,放冷,再称定质量,用甲醇补足减失的质量,摇匀,0.22 μ m滤膜滤过,取续滤液,即得供试品溶液。

2.3 方法学考察

线性关系考察:分别精密吸取2.2项下混合对照品

溶液(马钱苷酸、当药苷、芒果苷、木犀草素、1,7-二羟基-3,8-二甲氧基吡喃酮质量浓度分别为0.020 6, 0.201 0, 0.008 0, 0.056 6, 0.015 0 mg/mL) 1, 2, 5, 10, 15, 20 μ L, 按2.1项下色谱条件分别进样测定, 以各待测成分的进样量(X, μ g)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归。结果见表1, 表明各待测成分在各自进样量范围内分别与峰面积线性关系良好。

表1 线性关系考察结果($n=6$)

Tab. 1 Results of the linear relation test ($n=6$)

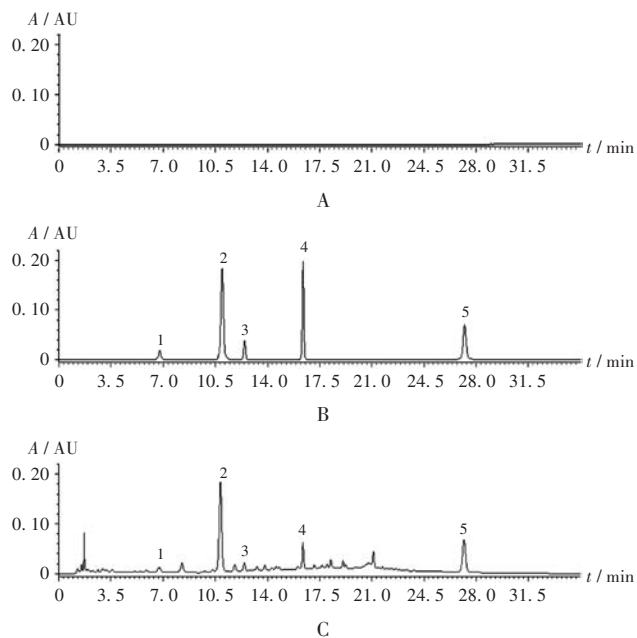
成分	回归方程	线性范围(μ g)	r
马钱苷酸	$Y=731\,963.07X+2\,442.12$	0.020 6~0.412 0	0.999 8
当药苷	$Y=1\,403\,003.53X-1\,075.61$	0.201 0~4.020 0	0.999 9
芒果苷	$Y=4\,519\,491.08X+643.56$	0.008 0~0.160 0	0.999 9
木犀草素	$Y=2\,543\,856.02X+1\,802.78$	0.056 6~1.132 0	0.999 9
1,7-二羟基-3,8-二甲氧基吡喃酮	$Y=6\,770\,087.47X-1\,303.26$	0.015 0~0.300 0	0.999 9

精密度试验:精密吸取2.2项下混合对照品溶液适量,按2.1项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果马钱苷酸、当药苷、芒果苷、木犀草素、1,7-二羟基-3,8-二甲氧基吡喃酮峰面积的RSD分别为0.63%, 0.26%, 0.14%, 0.16%, 0.27% ($n=6$), 表明仪器精密度良好。

稳定性试验:取样品(批号为190702)适量,精密称定,按2.2项下方法制备供试品溶液,按2.1项下色谱条件于0, 2, 4, 8, 16, 24 h时进样测定,记录峰面积。结果马钱苷酸、当药苷、芒果苷、木犀草素、1,7-二羟基-3,8-二甲氧基吡喃酮峰面积的RSD分别为0.96%, 0.22%, 0.13%, 0.04%, 0.79% ($n=6$), 表明供试品溶液中上述成分在24 h内稳定性良好。

重复性试验:取样品(批号为190702)6份,按2.2项下方法制备供试品溶液,按2.1项下色谱条件进样测定,计算含量。结果马钱苷酸、当药苷、芒果苷、木犀草素、1,7-二羟基-3,8-二甲氧基吡喃酮的平均含量分别为0.54, 8.30, 0.23, 1.06, 0.74 mg/g, RSD分别为0.72%, 1.06%, 0.59%, 0.42%, 0.92% ($n=6$), 表明方法重复性良好。

加样回收试验:取样品(批号为190702)6份,每份0.5 g,精密称定,置锥形瓶中,分别加入适量马钱苷酸、当药苷、芒果苷、木犀草素、1,7-二羟基-3,8-二甲氧基吡喃酮对照品,依法制备供试品溶液,按2.1项下色谱条件进样测定,计算回收率。结果马钱苷酸、当药苷、芒果苷、木犀草素、1,7-二羟基-3,8-二甲氧基吡喃酮的平均回收率分别为96.24%, 98.16%, 96.67%, 98.06%, 97.84%, RSD分别为0.84%, 0.89%, 1.06%, 0.92%, 1.57% ($n=6$), 表明方法准确度良好。



1. 马钱苷酸 2. 当药苷 3. 芒果苷 4. 木犀草素
5. 1,7-二羟基-3,8-二甲氧基吡喃酮
A. 空白溶剂 B. 混合对照品溶液 C. 供试品溶液

图1 高效液相色谱图

1. Loganic acid 2. Sweroside 3. Mangiferin 4. Luteolin 5. 1,7-dihydroxy-3,8-dimethoxykovanone

A. Blank solvent B. Mixed reference solution C. Test solution

Fig. 1 HPLC chromatograms

2.4 样品含量测定

取样品(批号分别为190702, 190703, 190704, 191002, 191003) 0.5 g, 精密称定, 按2.2项下方法制备供试品溶液, 按2.1项下色谱条件进样测定, 记录色谱图, 并计算各批次样品中马钱苷酸、当药苷、芒果苷、木犀草素、1,7-二羟基-3,8-二甲氧基吡喃酮的含量。结果见表2。

3 讨论

3.1 指标性成分与色谱条件选择

曾选择扁蕾颗粒中其他成分进行含量测定, 结果含量较低, 且无法有效分离, 不建议作为扁蕾颗粒的定量检测指标。扁蕾颗粒临床用于小儿腹泻、胃肠炎的治疗, 且疗效明确^[13-15]。其主要有效成分马钱苷酸、当药苷、芒果苷、木犀草素、1,7-二羟基-3,8-二甲氧基吡喃酮具有抗炎、抗氧化、止泻、抑菌、抗肿瘤、保肝等多种药理学作用^[16-24], 且分离度、重复性、稳定性均较好, 故选择上述5种成分作为扁蕾颗粒的指标性成分。

对马钱苷酸、当药苷、芒果苷、木犀草素、1,7-二羟基-3,8-二甲氧基吡喃酮5种物质的甲醇溶液进行全波长扫描, 于254 nm和365 nm波长处均有较强吸收, 故选择254 nm作为检测波长。参考文献[8-11], 选择甲醇-水-冰醋酸、乙腈-水-磷酸、甲醇-水-磷酸等

表2 样品含量测定结果

Tab. 2 Results of the content determination of five components in samples

批号	马钱苷酸		当药苷		芒果苷		木犀草素		1,7-二羟基-3,8-二甲氧基吡啶	
	含量(mg/g)	RSD(%)	含量(mg/g)	RSD(%)	含量(mg/g)	RSD(%)	含量(mg/g)	RSD(%)	含量(mg/g)	RSD(%)
190702	0.54	0.20	8.30	1.01	0.23	1.31	1.06	0.63	0.74	0.96
190703	0.55	1.69	8.44	1.52	0.26	1.44	1.11	1.60	0.74	1.13
190704	0.55	0.98	8.35	0.89	0.25	0.85	1.09	0.99	0.74	0.57
191002	0.53	1.23	8.38	1.21	0.24	1.01	1.07	0.77	0.73	1.04
191003	0.56	0.84	8.41	0.99	0.25	1.20	1.06	0.84	0.76	0.97

流动相系统及流动相梯度洗脱程序进行多次试验,最终选择甲醇-0.05%磷酸溶液为流动相进行梯度洗脱。

3.2 样品制备方法考察

对不同极性提取溶剂(水、乙醇、50%乙醇、甲醇、50%甲醇),不同提取方法(回流、超声、冷浸),不同提取时间(15,30,45,60 min)进行考察,从混合对照品溶液和供试品溶液中被测成分的分离情况、基线的稳定性及分析时间、含量、成本等方面综合分析,最终确定提取方法,即取样品0.5 g,以甲醇25 mL为溶剂,超声30 min处理。曾以水为溶剂加热回流2 h(模拟扁蕾颗粒生产工艺)、甲醇为溶剂超声30 min 2种方法提取湿生扁蕾药材得到的溶液进行比较,但水回流提取法的供试品溶液色谱行为与甲醇提取的供试品溶液差异较大。前者部分色谱峰较小,如已确认的木犀草素、当药醇苷等;个别色谱峰缺失,但不能确认具体成分。究其原因,可能与部分化合物在水、甲醇的溶解性差异较大有关;可能与化合物的热稳定性有关,如生产工艺规定第1次加10倍量水煎煮2 h,第2次加8倍量水煎煮1 h,加热时间过长可能会造成个别不稳定化合物的含量降低。

3.3 方法评价

本研究中建立的方法操作简便、高效,结果准确,能为扁蕾颗粒的质量控制提供参考。

参考文献

[1] ZZ-8372,卫生部药品标准·蒙药分册[S].
[2] WS₃-BC-0110-95,卫生部药品标准·藏药分册[S].
[3] 中国科学院西北高原生物研究所. 藏药志[M]. 西宁:青海人民出版社,1991:112-113.
[4] 罗达尚. 中华藏本草[M]. 北京:民族出版社,1997:186-187.
[5] 卢年华,赵慧巧,刘娟娟,等. 藏药湿生扁蕾及扁蕾的相关本草考证[J]. 西部中医药,2017,30(6):46-49.
[6] 梁希晨,刘雪枫,王灏,等. 湿生扁蕾不同提取物抗氧化活性与主要成分相关性研究[J]. 药学研究,2020,39(12):683-687.
[7] 希古日干,王图古拉,宝钢,等. 扁蕾化学成分的研究[J]. 中成药,2022,44(6):1850-1854.
[8] 冯丽娟,纪兰菊. RP-HPLC法同时测定湿生扁蕾中4中有效成分的含量[J]. 分析实验室,2008,27(S2):147-149.

[9] 赵慧巧,陈晖,景明,等. RP-HPLC法同时测定湿生扁蕾中木犀草素、当药黄素和当药醇苷的含量[J]. 中华中医药学刊,2016,34(3):603-605.
[10] 卢年华,赵慧巧,景明,等. HPLC与HPCE结合测定复方湿生扁蕾胶囊中6种化学成分含量[J]. 中国中医药信息杂志,2016,23(12):86-90.
[11] 孙跃宁,罗明英. 湿生扁蕾药材的薄层色谱鉴别和含量测定研究[J]. 食品与药品,2017,19(2):127-129.
[12] 王嘉鸣,曲馨,薄双琴,等. 基于多指标评价的金蕾颗粒质量标准研究[J]. 药学研究,2022,41(8):507-510.
[13] 王焕弟,谭成玉,白雪芳,等. 藏药湿生扁蕾的抑菌作用研究[J]. 时珍国医国药,2006,17(10):1901-1902.
[14] 景明,罗永皎,刘喜平,等. 藏药湿生扁蕾提取物的止泻作用及其急性毒性研究[J]. 中成药,2011,33(6):1049-1050.
[15] 甄会,周少明,黄晓利,等. 扁蕾颗粒治疗小儿急性感染性腹泻多中心随机双盲临床研究[J]. 中国中西医结合杂志,2021,41(5):560-566.
[16] 崔树婷,刘喜平,陈嘉慧. 湿生扁蕾药理作用研究进展[J]. 中国民族民间医药,2020,29(6):37-39.
[17] 黄春萍,罗群,李洁. 芒果皮中芒果苷提取工艺优化及其抑菌性分析[J]. 南方农业学报,2014,48(8):1452-1456.
[18] 米琴,曹长年,王慧春,等. 湿生扁蕾有效成分抑菌活性的测定[J]. 青海大学学报(自然科学版),2004,22(2):84-85.
[19] 王伟,何平,江小明. 木犀草素及其黄酮苷的抗炎、抗氧化作用[J]. 食品科学,2020,41(17):208-215.
[20] 景明,罗永皎,陈正君,等. 藏药湿生扁蕾提取物治疗小鼠溃疡性结肠炎的研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(2):113-116.
[21] 赵慧巧,卢年华,张旭东,等. 湿生扁蕾对结肠癌微环境中HMSCs恶性增殖以及CD34、CD90的影响[J]. 中药药理与临床,2018,34(3):125-128.
[22] 芦彦兆,景明,卢年华,等. 藏药湿生扁蕾提取物对四氯化碳致小鼠急性肝损伤的保护作用研究[J]. 甘肃中医药大学学报,2018,35(6):1-5.
[23] 刘杜霞,高小敏,全敏,等. 獐牙菜苷的药理作用及其机制研究进展[J]. 中华中医药学刊,2022,40(2):115-119.
[24] 王焕弟. 藏药湿生扁蕾的化学成分及生物活性研究[D]. 大连:中国科学院大连化学物理研究所,2006.

(收稿日期:2023-02-15;修回日期:2023-05-20)