丙泊酚血药浓度检测方法建立及在淋巴水肿患者中的应用Δ

李京峰[1*]，时正媛[1]，张梦洁[2]，关　雷[2]，姜德春[1#]（1.首都医科大学附属北京世纪坛医院药剂科，北京　100038；2.首都医科大学附属北京世纪坛医院麻醉科，北京　100038）

中图分类号　R969.3；R917　　**文献标志码**　A　　**文章编号**　1001-0408（2024）04-0476-05
DOI　10.6039/j.issn.1001-0408.2024.04.18

摘　要　目的　建立测定人血浆中丙泊酚浓度的方法并应用于淋巴水肿患者血药浓度检测。**方法**　以麝香草酚为内标，血浆样品经蛋白沉淀后，采用超高效液相色谱-串联质谱（UPLC-MS/MS）法测定丙泊酚的浓度。以Kinetex C_{18}为色谱柱，以乙腈（A）-水（B）为流动相进行梯度洗脱，流速为200 μL/min，进样量为5 μL，柱温为40 ℃，样品仓温度为15 ℃。采用多反应监测模式进行检测，用于定量分析的离子对为*m/z* 177.0→161.2（丙泊酚）、*m/z* 149.0→133.1（内标）。采用上述方法测定6例淋巴水肿患者血浆中丙泊酚的血浆浓度。**结果**　丙泊酚检测质量浓度的线性范围为50～5 000 ng/mL（r=0.995 0）；批内、批间精密度的RSD均不高于8.08%；空白血浆中无内源性干扰；无残留效应和稀释效应；提取回收率为89.80%～93.73%，基质效应为97.93%～101.73%；稳定性试验的RSD均小于3.27%。术中靶控输注2～30 min内，6例患者的丙泊酚血药浓度为1 865.3～6 056.2 ng/mL，停药后4～8 h内基本代谢完全。**结论**　所建UPLC-MS/MS法可以在不进行衍生化的前提下，实现对丙泊酚的测定，样品前处理过程简便、快速，可用于淋巴水肿患者血浆样本中丙泊酚的血药浓度检测。

关键词　超高效液相-串联质谱法；丙泊酚；淋巴水肿；血药浓度

Establishment of a method for detecting propofol concentration in plasma and its application in patients with lymphedema

LI Jingfeng[1], SHI Zhengyuan[1], ZHANG Mengjie[2], GUAN Lei[2], JIANG Dechun[1]（1. Dept. of Pharmacy, Beijing Shijitan Hospital Affiliated to Capital Medical Hospital, Beijing 100038, China; 2. Dept. of Anesthesiology, Beijing Shijitan Hospital Affiliated to Capital Medical Hospital, Beijing 100038, China）

ABSTRACT　OBJECTIVE To establish a method for the determination of propofol concentration in human plasma and apply it in patients with lymphedema. **METHODS** The concentration of propofol was determined by UPLC-MS/MS after protein precipitation of plasma samples using thymol as internal standard. The sample was eluted on a Kinetex C_{18} column with a mobile phase consisting of acetonitrile (A)-water (B) for gradient elution at the flow rate of 200 μL/min. The sample size was 5 μL, and the column temperature was set at 40 ℃. The sample chamber temperature was 15 ℃. Using multi-reaction monitoring mode, the ion pairs for quantitative analysis were *m/z* 177.0→161.2 (propofol) and *m/z* 149.0→133.1 (internal standard), respectively. The above method was used to determine the plasma concentration of propofol in 6 patients with lymphedema. **RESULTS** The linear range of propofol was 50-5 000 ng/mL (r=0.995 0). RSDs of within- and between-batch precision were not more than 8.08%; no endogenous interference, carryover effect, or dilution effect was observed in blank plasma. The extraction recovery ranged from 89.80% to 93.73%, and matrix effects were within the range of 97.93%-101.73%. RSDs of the stability test were all lower than 3.27%. During intraoperative TCI 2-30 min, the plasma concentration of propofol in 6 patients was maintained in the range of 1 865.3-6 056.2 ng/mL, and the propofol was almost excreted within 4-8 h after operation. **CONCLUSIONS** The established UPLC-MS/MS method in this study can achieve the determination of propofol and a simple and fast sample pretreatment process without derivatization; it is proved to be suitable for the concentration monitoring of propofol in plasma samples of patients with lymphedema.

KEYWORDS　UPLC-MS/MS; propofol; lymphedema; plasma concentration

Δ **基金项目** 首都医科大学附属北京世纪坛医院淋巴外科开放课题

＊**第一作者** 药师，博士。研究方向：临床治疗药物监测。电话：010-63926405。E-mail：Lijf3692@bjsjth.cn

＃**通信作者** 主任药师，博士生导师，博士。研究方向：临床治疗药物监测。电话：010-63926405。E-mail：jdc@bjsjth.cn

丙泊酚是一种具有抗焦虑、调节免疫等作用的静脉麻醉药，其半衰期短、起效快，且麻醉后患者不适感较少，因此临床应用广泛[1－2]。但丙泊酚在临床应用中可能会引起呼吸抑制、血流动力学不稳定等不良反应[3]，尤

其是高龄、肝肾代谢排泄异常和体内循环功能异常的特殊患者，其体内的丙泊酚吸收、分布、代谢、排泄特征会发生改变，这可能会加剧丙泊酚所致的不良反应[4]。

淋巴水肿是由于淋巴管阻塞使得淋巴液回流发生障碍，导致过多富含蛋白质的液体积聚于组织间隙而引起的水肿[5－6]。手术过程中，淋巴水肿患者因淋巴液回流障碍造成大量血浆蛋白积聚在组织间隙或体腔中，影响了血液中丙泊酚的代谢、排泄过程，从而影响丙泊酚用药后的安全性[7－9]。因此，探究丙泊酚在该类患者体内的代谢、排泄过程，对提高丙泊酚的用药安全性具有重要意义。

由于丙泊酚显弱酸性，且具有高亲脂性的特点[10]，导致其在分离色谱柱上的保留特征复杂，而使得分析方法的重复性较差。目前，国内外文献虽然已报道了多种丙泊酚血药浓度的分析方法[11－13]，但这些方法的专属性和灵敏度均较低。超高效液相色谱-串联质谱（UPLC-MS/MS）技术可通过超高效液相技术对待测物进行分离，并利用质谱检测器对待测物的准分子离子和特征碎片离子进行检测，具有分析速度快、选择性好、灵敏度高的特点[14]。本研究建立了检测人血浆中丙泊酚浓度的UPLC-MS/MS法，并尝试应用于临床，旨在为临床安全用药提供参考。

1　材料

1.1　主要仪器

本研究所用主要仪器包括Acquity H-Class型超高效液相系统（美国Waters公司）、QTRAP 5500型质谱系统（美国AB SCIEX公司）、Quintix 125D-1CN型电子天平（德国Sartorius公司）、Sigma 3-18K型低温高速离心机（德国Sigma-Aldrich公司）、Vortex-5型斡旋振荡器（海门市其林贝尔仪器制造有限公司）；Milli-Q Integral 5水纯化系统（美国Millipore公司）。

1.2　药品与试剂

丙泊酚对照品（批号100806-201803，纯度99.9%）、麝香草酚（内标，批号100508-201603，纯度99.9%）均购自中国食品药品检定研究院；甲醇、乙腈、氨水均购自美国Thermo Fisher Scientific公司；水为纯化水。

1.3　血浆样品

人空白血浆（批号3807253）购自上海谱芬生物科技有限公司。

2　方法与结果

2.1　色谱与质谱条件

2.1.1　色谱条件

以Kinetex C_{18}（50 mm×2.1 mm，2.6 μm）为色谱柱，以乙腈（A）-水（B）为流动相进行梯度洗脱（0～1 min，5%A；1～4 min，5%A→95%A；4～6 min，95%A；6～8 min，5%A）；流速为200 μL/min；进样量为5 μL；柱温为40 ℃；样品仓温度为15 ℃。

2.1.2　质谱条件

采用多反应监测模式（multiple reaction monitoring，MRM）进行检测；喷雾电压为－4 500 V；毛细管温度为400 ℃；雾化气压为30 psi，辅助加热气压为30 psi，气帘气压为10 psi，碰撞气压为6 psi；用于定量分析的离子对为*m/z* 177.0→161.2、碰撞能量30 eV（丙泊酚），*m/z* 149.0→133.1、碰撞能量35 eV（内标）。

2.2　溶液的制备

2.2.1　对照品储备液及质控储备液

精密称取丙泊酚对照品12.00 mg，用甲醇-水（1∶1，*V/V*，下同）溶液溶解并稀释，得质量浓度为10 mg/mL的对照品储备液。同法制备质量浓度为8 mg/mL的质控储备液。上述溶液均于4 ℃冰箱密封保存、备用。

2.2.2　内标溶液

精密称取内标2.00 mg，用乙腈溶解并稀释，得质量浓度为100 μg/mL的溶液。吸取上述溶液0.5 mL，置于500 mL容量瓶中，用乙腈稀释至刻度，得质量浓度为100 ng/mL的内标溶液，于4 ℃冰箱密封保存、备用。

2.2.3　标准曲线溶液

取“2.2.1”项下对照品储备液10 μL，加入甲醇-水溶液990 μL，涡旋混匀1 min，得质量浓度为100 μg/mL的溶液。取上述溶液，用甲醇-水溶液稀释，得质量浓度分别为0.5、1、2、5、10、20、50 μg/mL的标准曲线工作液。取上述各标准曲线工作液10 μL，加入空白血浆90 μL，涡旋混匀1 min，得质量浓度为50～5 000 ng/mL的标准曲线溶液。

2.2.4　质控样品溶液

取“2.2.1”项下质控储备液10 μL，加入甲醇-水溶液990 μL，涡旋混匀1 min，得质量浓度为80 μg/mL的溶液。取上述溶液，用甲醇-水溶液稀释，得质量浓度分别为0.5、0.8、4、40 μg/mL的质控工作液。取上述各质控工作液10 μL，加入空白血浆90 μL，涡旋混匀1 min，得质量浓度为50、80、400、4 000 ng/mL的质控样品溶液。

2.3　血浆样品的前处理

精密吸取待测血浆样品100 μL，置于1.5 mL塑料离心管中，加入“2.2.2”项下内标溶液200 μL，涡旋混匀30 s，以12 000 r/min离心30 min，取上清液进样测定。

2.4　方法学考察

按国际人用药品注册技术协调会的指导原则《M10：生物分析方法验证及样品分析》进行验证。

2.4.1　专属性考察

分别取6份不同来源的人空白血浆样本，加入乙腈200 μL，按“2.3”项下方法处理后，再按“2.1”项下色谱与质谱条件进样测定，记录空白色谱图（图1A）。取“2.2.3”项下质量浓度为0.5 μg/mL的标准曲线工作液10 μL，加入空白血浆90 μL，涡旋混匀30 s，加入“2.2.2”项下内标溶液200 μL，按“2.3”项下方法处理后，再按“2.1”项下色谱与质谱条件进样测定，记录色谱图（图1B）。取患者血浆样品100 μL，按“2.3”项下方法处理后，再按“2.1”项下色谱与质谱条件进样测定，记录色谱图（图1C）。结果显示，空白血浆样品色谱图中均无内源性干扰峰。

2.4.2　线性关系及定量下限考察

取“2.2.3”项下标准曲线溶液，按“2.3”项下方法处理后，再按“2.1”项下色谱与质谱条件进样测定。以丙泊酚质量浓度为横坐标（x）、丙泊酚与内标响应值之比为纵坐标（y），采用加权最小二乘法（权重为$1/x^2$）进行回归方程拟合，得丙泊酚的回归方程为$y=0.001\ 93x+0.024\ 20$（$r=0.995\ 0$），表明丙泊酚检测质量浓度在50～5 000 ng/mL范围内线性关系良好。定量下限为50 ng/mL。

2.4.3　精密度与准确度试验

取“2.2.4”项下质控样品溶液，每个浓度平行6份，按“2.3”项下方法处理后，再按“2.1”项下色谱与质谱条件进样测定，考察批内精密度；连续测定3 d，考察批间精密度，并以实测质量浓度与理论质量浓度的偏差作为准确度。结果显示，批内精密度的RSD为3.64%～4.71%（$n=6$）；批间精密度的RSD%为1.51%～8.08%（$n=6$）；准确度为−6.81%～1.55%（$n=6$），表明该方法的精密度、准确度均较好。

2.4.4　残留效应

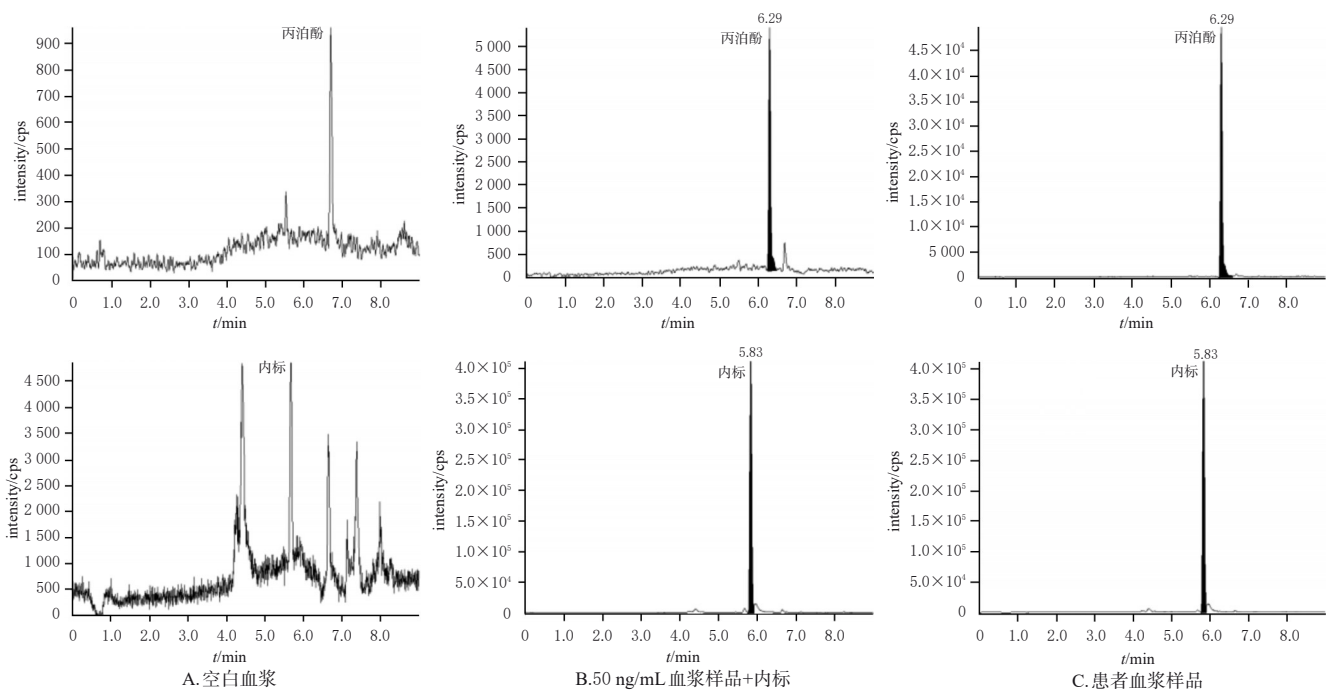
取“2.2.3”项下质量浓度为5 000 ng/mL的标准曲线溶液，按“2.3”项下方法处理后，按“2.1”项下色谱与质谱条件进样测定，每个样品检测后再随行检测1个空白血浆样品。结果显示，空白样品中均未检测到丙泊酚及内标，表明检测高质量浓度样品后，仪器无残留效应。

2.4.5　提取回收率和基质效应

取“2.2.1”项下质控储备液，用甲醇-水溶液稀释，得质量浓度分别为80、400、4 000 ng/mL的溶液A，每个浓度平行6份。取空白血浆，用2倍体积乙腈沉淀蛋白后，以12 000 r/min离心30 min，取上清液，然后将“2.2.1”项下质控储备液用上述上清液稀释，得质量浓度为80、400、4 000 ng/mL的溶液B，每个浓度平行6份。按“2.2.4”项下方法制备质量浓度为80、400、4 000 ng/mL的溶液C，每个浓度平行6份。将溶液A、B、C按“2.3”项下方法处理后，再按“2.1”项下色谱与质谱条件进样测定，分别记录峰面积A、B、C。基质效应＝峰面积B/峰面积A×100%；提取回收率＝峰面积C/峰面积B×100%。结果显示，基质效应为97.93%～101.73%，RSD均小于5.16%（$n=6$）；提取回收率为89.80%～93.73%，RSD均小于3.25%（$n=6$）。

2.4.6　稳定性试验

取“2.2.4”项下质量浓度分别为80、400、4 000 ng/mL的质控样品溶液，每个浓度平行6份，分别于室温条件下



A.空白血浆　B.50 ng/mL血浆样品+内标　C.患者血浆样品

图1　丙泊酚及内标的典型MRM图

放置1、4 h，－80 ℃下放置30 d，－80 ℃和室温条件下反复冻融3次，按“2.3”项下方法处理后，再按“2.1”项下色谱与质谱条件进样测定。另取“2.2.4”项下质量浓度分别为80、400、4 000 ng/mL的质控样品溶液，每个浓度平行6份，按“2.3”项下方法处理后，将样品置于样品仓中12 h，按“2.1”项下色谱与质谱条件进样测定。结果显示，各样品在上述条件下的稳定性均良好，RSD均小于3.27%，准确度为－5.45%～－1.27%。结果见表1。

表1　丙泊酚的稳定性检测结果（$\bar{x}\pm s$，$n=6$，ng/mL）

理论浓度	实测室温放置1 h	实测室温放置4 h	实测冻融3次	实测－80 ℃放置30 d	实测样品仓放置12 h
80	78.98±2.24	78.46±2.56	78.17±1.90	77.81±1.13	77.87±2.54
400	382.12±9.00	380.29±8.48	387.71±4.23	386.20±6.53	384.46±11.34
4 000	3 829.74±70.05	3 794.18±37.29	3 782.10±78.34	3 841.11±87.90	3 825.40±102.72

2.4.7　稀释效应

按“2.2.3”项下方法制备质量浓度为50 000 ng/mL血浆样品，用空白血浆稀释10倍，平行稀释6个样品，按“2.3”项下方法处理后，再按“2.1”项下色谱与质谱条件进样测定。结果显示，准确度为－6.77%～0.27%（$n=6$），表明高质量浓度样品稀释10倍后无稀释效应。

2.5　临床应用

2.5.1　患者纳入与排除标准

本研究的患者纳入标准为：（1）按美国麻醉医师协会健康状况分级为Ⅰ～Ⅱ级；（2）年龄26～54岁；（3）无中枢神经系统疾病，无精神障碍，无严重的心血管及呼吸系统疾病；（4）肝肾功能正常；（5）体重在标准体重的±20%范围内。

本研究的患者排除标准为：（1）有丙泊酚使用禁忌证者；（2）术中发生突发情况导致无法完成样本收集者；（3）继续研究会对患者生命、健康造成风险；（4）术前或术后提出终止研究者。

2.5.2　资料来源

选择2021年7月1日－2022年7月1日首都医科大学附属北京世纪坛医院收治的因患有淋巴水肿而行淋巴静脉吻合手术的乳糜患者6例，其中男性4例，女性2例；年龄26～54岁。本研究方案经医院医学伦理委员会批准，批准文号sjtkyll-lx-2020（71）。所有患者均签署了知情同意书。

2.5.3　用药方法

患者术中靶控输注（target controlled infusion，TCI）丙泊酚乳状注射液（意大利Corden Pharma S.P.A公司，规格20 mL∶200 mg，注册证号H20171277），诱导麻醉总剂量为1.5～2.5 mg/kg，以20～50 mg/min给药，维持剂量为4～12 mg/（kg·h）；丙泊酚血浆靶浓度为3 μg/mL。

2.5.4　检测方法与检测结果

所有患者分别于TCI 2、5、10、30 min，停药后0（即刻）、2、5、10、30 min和停药后1、2、4、8 h采集桡动脉血2 mL，置于肝素抗凝管中，以3 000 r/min离心10 min，分离上层血浆，按“2.3”项下方法处理后，再按“2.1”项下色谱与质谱条件进样检测（超出检测上限的血浆样品需稀释后测定）。结果显示，6例患者在TCI 2～30 min内的血药浓度分别为1 871.6～4 008.2、2 972.2～4 131.1、3 482.5～5 120.1、4 250.2～4 972.3、3 643.7～6 056.2、1 865.3～2 093.7 ng/mL，均维持在较稳定的范围内；停药后，丙泊酚被快速代谢，停药后4～8 h内基本代谢完全。结果见表2。

表2　6例患者血浆中丙泊酚浓度的检测结果（ng/mL）

时间	患者1	患者2	患者3	患者4	患者5	患者6
TCI 2 min	4 008.2	3 190.5	5 120.1	4 250.2	4 168.8	1 953.1
TCI 5 min	3 002.4	2 972.2	3 731.7	4 945.1	6 056.2	2 089.2
TCI 10 min	2 032.3	3 593.7	3 482.5	4 939.5	4 724.1	2 093.7
TCI 30 min	1 871.6	4 131.1	3 489.2	4 972.3	3 643.7	1 865.3
停药后0 min	1 220.1	1 942.4	4 062.6	5 135.4	4 451.4	2 130.2
停药后2 min	974.8	1 387.0	1 600.4	3 161.7	3 531.2	1 783.0
停药后5 min	686.0	1 256.8	1 475.5	2 179.2	2 165.5	898.4
停药后10 min	651.1	894.6	1 028.3	2 164.1	2 035.1	927.8
停药后30 min	335.1	417.6	584.8	1 035.2	1 087.3	508.6
停药后1 h	113.6	175.9	340.0	664.1	573.7	267.9
停药后2 h	67.7	104.1	245.5	450.1	293.6	154.6
停药后4 h	ND	ND	123.1	289.9	107.0	71.2
停药后8 h	ND	ND	74.5	130.2	ND	ND

ND：低于定量下限。

3　讨论

由于丙泊酚及内标的结构中均含有酚羟基，故在电喷雾离子源中易失去H^+而带负电荷，因此本研究中选用负离子模式进行检测。同时，丙泊酚及内标的准分子离子峰$[M-H]^-$分别为*m/z* 177.0、*m/z* 149.0，在对碎片离子进行优化时发现，丙泊酚碎片离子*m/z* 161.2和内标碎片离子*m/z* 133.1信号较强且稳定，因此最终选定用于定量分析的离子对分别为*m/z* 177.0→161.2（丙泊酚）、*m/z* 149.0→133.1（内标）。

丙泊酚的酸度系数（acidity constant，pKa）为11.10，呈弱酸性，在溶液中易发生电离，为保证丙泊酚在色谱柱上保留，通常需加入挥发性的弱酸来抑制丙泊酚的电离；此外，由于弱酸性化合物在电喷雾离子源中易失去H^+而带负电荷，此时需要在流动相中加入挥发性的弱碱，以提高响应值。本课题组前期研究发现，若在流动相中加入弱碱，会与丙泊酚发生酸碱反应，导致其色谱行为发生改变；若加入弱酸则会使质谱响应降低，导致灵敏度下降。本课题组在前期方法建立中，曾尝试以水和乙腈作为流动相，结果发现，以水和乙腈为流动相时，

丙泊酚的色谱分离较好，质谱信号强度合适。

TCI 2～30 min时，患者6的丙泊酚血药浓度低于其余5例患者，这可能与不同患者对丙泊酚的耐受性不同有关。TCI可根据患者用药前后的心率、血压、血氧含量、呼吸功能和麻醉深度等来调节丙泊酚的用量，患者6可能对丙泊酚的耐受性较低，在较低的血药浓度时就能维持良好的麻醉效果。所有患者在停药后，丙泊酚均能被快速代谢，停药后4～8 h内基本代谢完全。

综上所述，本研究所建UPLC-MS/MS法可以在不进行衍生化的前提下，实现对丙泊酚的测定，样品前处理过程简便、快速，可用于淋巴水肿患者血浆样本中丙泊酚的血药浓度检测，以满足此类患者丙泊酚临床治疗药物浓度监测的需要。

参考文献

[1] 姚晶曼，李元海. 依托咪酯联合丙泊酚用于老年患者无痛气管镜诊疗的临床观察[J]. 中国药房，2020，31(24)：3031-3035.
YAO J M，LI Y H. Clinical observation of the application of etomidate combined with propofol in diagnosis and treatment of elderly patients with painless tracheoscope [J]. China Pharm，2020，31(24)：3031-3035.

[2] WALSH C T. Propofol：milk of amnesia[J]. Cell，2018，175(1)：10-13.

[3] 顾庆玲，黄民，李嘉丽. 丙泊酚药物不良反应潜在机制的研究现状[J]. 中国临床药理学杂志，2023，39(12)：1815-1819.
GU Q L，HUANG M，LI J L. Research status on the potential mechanisms of propofol adverse reactions[J]. Chin J Clin Pharmacol，2023，39(12)：1815-1819.

[4] SINGH A，ANJANKAR A P. Propofol-related infusion syndrome：a clinical review[J]. Cureus，2022，14(10)：e30383.

[5] 邓景成，戴婷婷，曹卫刚. 淋巴水肿治疗的进展[J]. 组织工程与重建外科杂志，2016，12(1)：52-55.
DENG J C，DAI T T，CAO W G. Research progress of clinical therapy for lymphedema[J]. J Tissue Eng Reconstr Surg，2016，12(1)：52-55.

[6] TIWARI P，CORIDDI M，SALANI R，et al. Breast and gynecologic cancer-related extremity lymphedema：a review of diagnostic modalities and management options[J]. World J Surg Oncol，2013，11：237.

[7] BROUILLARD P，WITTE M H，ERICKSON R P，et al. Primary lymphoedema[J]. Nat Rev Dis Primers，2021，7(1)：77.

[8] GREENE A K，GOSS J A. Diagnosis and staging of lymphedema[J]. Semin Plast Surg，2018，32(1)：12-16.

[9] 闫贺磊，刘勇，李果. 头颈部淋巴水肿的诊治进展[J]. 中国耳鼻咽喉颅底外科杂志，2023，29(2)：80-84.
YAN H L，LIU Y，LI G. Progress in diagnosis and treatment of head and neck lymphedema[J]. Chin J Otorhinolaryngol Skull Base Surg，2023，29(2)：80-84.

[10] BAKER M T，NAGUIB M. Propofol：the challenges of formulation[J]. Anesthesiology，2005，103(4)：860-876.

[11] 郭田甜，尉洁，张帆，等. 丙泊酚及其代谢物在大鼠体内的动态分布[J]. 中国法医学杂志，2019，34(3)：213-217.
GUO T T，WEI J，ZHANG F，et al. Dynamic distribution of propofol and its metabolites in rats[J]. Chin J Forensic Med，2019，34(3)：213-217.

[12] VAIANO F，SERPELLONI G，FOCARDI M，et al. LC-MS/MS and GC-MS methods in propofol detection：evaluation of the two analytical procedures[J]. Forensic Sci Int，2015，256：1-6.

[13] 谭璐，杨翊，董瑞，等. 超高效液相色谱法监测重症脑损伤患者血浆中丙泊酚的血药浓度[J]. 中国医院药学杂志，2018，38(23)：2397-2401.
TAN L，YANG H，DONG R，et al. Monitoring the plasma concentration of propofol in intensive care unit patients with severe brain injury by UPLC[J]. Chin J Hosp Pharm，2018，38(23)：2397-2401.

[14] SEGER C，SALZMANN L. After another decade：LC-MS/MS became routine in clinical diagnostics[J]. Clin Biochem，2020，82：2-11.

（收稿日期：2023-08-24　修回日期：2024-01-27）
（编辑：陈　宏）