ノート

ガラスビーズ粉碎法を用いた LC/MS/MS による
畜水産食品中のサルファ剤の分析

(平成 20 年 7 月 18 日受理)

藤田 瑞香* 田口 修三 尾花 裕孝

Determination of Sulfonamides in Livestock Products and Seafoods
by Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry Using
Glass Bead Homogenization

Mizuka FUJITA*, Shuzo TAGUCHI and Hirotaka OBANA

Osaka Prefectural Institute of Public Health: 1-3-69 Nakamichi, Higashinari-ku,
Osaka 537-0025, Japan; * Corresponding author

A simple and rapid method using liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (LC/MS/MS) was developed for the determination of 25 kinds of sulfonamides in livestock products and seafoods. The sulfonamides were extracted with acetonitrile by glass bead homogenization and cleaned up with a tandem-connected ODS and basic alumina column. The quantification limits of 25 kinds of sulfonamides were 0.0025–0.005 $\mu\text{g/g}$. When two sulfonamides of specific samples were excluded, the recoveries and relative standard deviations were 70 to 120% and less than 15%. These results show that the developed method, which minimizes the matrix effect, offers high precision and should be useful for the determination of sulfonamides in livestock products and seafoods.

(Received July 18, 2008)

Key words: 高速液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析 LC/MS/MS; サルファ剤 sulfonamide; 畜水産食品 livestock product and seafood; ガラスビーズ粉碎法 glass bead homogenization

緒言

サルファ剤は広い抗菌スペクトルを有する合成抗菌剤の一種で動物用医薬品として広く使用されており、食品衛生法により 22 種類に残留基準が設定されている。しかし、一部のサルファ剤は分析法が示されておらず、通知法ですべてのサルファ剤を分析することはできない。また、スルファグアニジン (SGD) のような塩基性サルファ剤について高速液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析法 (LC/MS/MS) を用いた分析法の報告はあるが^{1), 2)}、妨害成分の影響を排除できておらず、回収率が低いなどの問題で実用的な分析法が少ない。したがって多くのサルファ剤を対象とした一斉分析法の確立が求められている。

そこで今回著者らは、残留基準の設けられた 22 種類にヒトに用いられる 3 種類を加えた 25 種類のサルファ剤を、ガラスビーズ粉碎法による簡易な抽出およびタンデム固相抽出による精製と LC/MS/MS を用いた一斉分析法を検討した。そして迅速かつ高精度の分析法を開発したの

で報告する。

実験方法

試料

市販の牛乳、鶏卵、サケ、ブリ、エビ、鶏肉、豚肉、牛肉、牛肝臓、牛腎臓を用いた。陽性試料はスルファジミジン (SDD) を検出した豚肉を用いた。魚類と食肉類は筋肉部を採取し、臓器はそのまま、鶏卵は殻を除去した全卵をフードプロセッサーで均質化し、牛乳はそのまま使用するまで -30°C で保存した。

試薬および器具

標準品: スルファエトキシピリダジン (SEPD), スルファトロキサゾール (STRX), スルファプロモメタジン (SBMZ) は林純薬工業(株)製, スルファメトキシピリダジン (SMPD), スルフィソミジン (SID), スルファジアジン (SDZ), スルファチアゾール (STZ), スルファメラジン (SMR), SDD, スルファモノメトキシシン (SMMX), スルファクロルピリダジン (SCPD), スルファドキシシン (SDOX), スルファメトキサゾール (SMXZ), スルファベンザミド (SBA), スルファジメトキシシン (SDMX), スルファキノキサ

* 連絡先

大阪府立公衆衛生研究所: 〒537-0025 大阪市東成区中道 1-3-69

リン (SQ) は関東化学(株)製, SGD1 水和物, スルファセタミド (SAA), スルファピリジン (SPD), スルファメチゾール (SMTZ), スルフィソキサゾール (SIX), スルファニトラン (SNT) は Riedel-de Haën 社製, スルフィソゾールナトリウム (SIZ), スルファモイルダプソン (SDDS) は畜水産品残留安全協議会製, スルファニルアミド (SA) は ICN 社製を用いた.

同位体標準品: STZ- d_4 , SDD- d_4 , SDZ- d_4 , SMXZ- d_4 , SDM- d_4 は和光純薬工業(株)製を用いた.

標準原液: 各サルファ剤の標準品を秤量し, アセトニトリルに溶解して 400 $\mu\text{g/mL}$ の標準原液を調製した. これを混合し, 水で希釈して 10 $\mu\text{g/mL}$ 溶液とした.

内部標準溶液: 同位体標準品を秤量混合し, アセトニトリルに溶解して 10 $\mu\text{g/mL}$ 溶液とした.

その他の試薬: アセトニトリル, メタノールは関東化学(株)製高速液体クロマトグラフ用試薬を用い, その他の試薬は和光純薬工業(株)製残留農薬分析用試薬を用いた. 水はミリポア社製 MILLI Q SP. TOC. により精製して用いた.

ガラスビーズ: アズワン社製ソーダガラス (直径 1 mm)

固相抽出カラム: Varian 社製 HF Mega Bond Elut-C18 (1 g/6 mL) (以下 ODS), Waters 社製 Sep-Pak Plus Alumina B (以下アルミナ B)

メンブランフィルター: アドバンテック東洋(株)製 DISMIC (親水性 PTFE, 13 mm ϕ , 0.2 μm)

装 置

高速振とう機は CM-1000 (東京理化工機(株)製), 高速ホモジナイザーはポリトロン PT10 (KINEMATICA 社製), 遠心分離器は himac CR5B2 (日立工機(株)製) を用いた. LC/MS/MS は AQUITY UPLC-Quattro Premier XE (Waters 社製) を用いた.

LC/MS/MS 測定条件

HPLC 条件

分析カラム: Waters ACQUITY UPLC BEH C_{18} (150 $\times$ 2.1 mm i.d. 1.7 μm), カラム温度: 40 $^{\circ}\text{C}$, 流速: 0.2 mL/min, 注入量: 10 μL , 移動相: A 液; 0.1% ぎ酸水溶液 B 液; アセトニトリル, グラジエント条件: Table 1 に示した.

MS/MS 条件

イオン化モード: ESI (+), 測定モード: マルチプルリアクションモニタリング (MRM)

イオン源温度: 120 $^{\circ}\text{C}$, コーンガス流量: 窒素, 50 L/hr, 脱溶媒ガス温度および流量: 窒素, 350 $^{\circ}\text{C}$, 900 L/hr, 化合物ごとの条件は Table 2 に示した.

検量線の作成

牛腎臓の分析を除き, 内部標準物質を 0.05 $\mu\text{g/mL}$ 含む 0.001, 0.005, 0.01, 0.05, 0.1 $\mu\text{g/mL}$ の混合標準溶液を調整し, 10 μL を LC/MS/MS に注入した. Table 2 のプロダクトイオンから得られたピーク面積を内部標準法で補

Table 1. HPLC gradient condition

Time (min)	A (%)	B (%)
0.00	98	2
9.00	65	35
10.00	65	35
13.50	20	80
16.50	20	80
16.51	98	2
21.00	98	2

正し, 検量線を作成した. 牛腎臓の分析においては, 牛腎臓抽出液で希釈してマトリックス添加検量線を作成した.

試験溶液の調製

均一化した試料 1 g を 50 または 15 mL のポリプロピレン製遠沈管に採取し, 内部標準溶液 1 $\mu\text{g/mL}$ を 50 μL 添加した. ガラスビーズ 1 g とアセトニトリル 10 mL を加え, 高速振とう機で 20 分間振とうした. 3,000 rpm で 5 分間遠心分離し, 上清を採取して水 1.8 mL を加え抽出液とした. ODS の下にアルミナ B を連結した固相抽出カラムを 85% アセトニトリル 10 mL でコンディショニング後, 抽出液を負荷し, 流出液を採取した. さらに 85% アセトニトリル 8 mL で溶出させ, 流出液と合わせた. 流出液に 1-プロパノールを 3 mL 加えて濃縮乾固後, 残渣に水を 1 mL 加え溶解した. これをメンブランフィルターでろ過し試験溶液とした.

結果および考察

LC/MS/MS 条件の検討

SGD や SA は極性が高く, 逆相カラムでは保持されにくい. そこで, これらを保持できるカラムを検討したところ, 粒形 1.7 μm , 長さ 15 cm のカラムで保持することができた. また, いくつかの化合物は, プレカースイオン, プロダクトイオンともに同じ質量電荷比となるので, これらを分離できるグラジエント条件を選択した (Fig. 1).

イオン化にはエレクトロスプレーイオン化 (ESI) 法を用い, MRM 法で測定を行った. イオン化モードは感度が良好であったポジティブモードを採用した.

検 量 線

すべての化合物において, 0.001~0.1 $\mu\text{g/mL}$ の範囲内で決定係数 $r^2=0.99$ 以上と良好な直線性が得られた.

前処理方法の検討

1) ガラスビーズ粉砕法の検討

一般に動物試料からの抽出には高速ホモジナイザーが使われるが, 検体毎にシャフトを洗浄する必要があり, 多検体を処理する場合は極めて煩雑である. また, 洗浄が不十分であるとコンタミネーションの危険性もある. そこで今回, 菌体の DNA 抽出等に利用されているガラスビーズ粉砕法を応用し³⁾, 試料とガラスビーズを遠沈管に入れて溶媒を加え, 小型の高速振とう機で渦巻振とうすることにより試料を抽出する方法を検討した. ガラスビーズを加える

Table 2. LC/MS/MS conditions for analysis of sulfonamides

Compound	Retention time (min)	Transition (m/z) (Pre>Pro)	Cone (V)	Collision energy (eV)	LOQ (ng/g)	Internal standard
Sulfaguanidine (SGD)	3.1	215>92	22	22	2.5	SDZ- d_4
Sulfanilamide (SA)	3.4	173>92	40	23	5	
Sulfacetamide (SAA)	5.2	215>156	22	9	5	
Sulfisomidine (SID)	5.2	279>124	34	19	2.5	
Sulfadiazine (SDZ)	5.7	251>92	24	27	5	STZ- d_4
Sulfathiazole (STZ)	6.1	256>156	34	16	2.5	
Sulfapyridine (SPD)	6.4	250>156	28	16	5	SDD- d_4
Sulfamerazine (SMR)	6.7	265>92	28	25	2.5	
Sulfadimidine (SDD)	7.5	279>186	34	17	2.5	
Sulfamethizole (SMTZ)	7.6	271>156	24	13	2.5	
Sulfamethoxypyridazine (SMPD)	7.7	281>156	28	16	2.5	SMXZ- d_4
Sulfisozole (SIZ)	7.8	240>92	22	25	2.5	
Sulfamoyldapsone (SDDS)	7.9	328>108	26	19	2.5	
Sulfamonomethoxine (SMMX)	8.4	281>156	22	26	2.5	
Sulfachlorpyridazine (SCPD)	8.8	285>156	34	16	2.5	SDMX- d_4
Sulfadoxine (SDOX)	9.3	311>156	25	16	2.5	
Sulfamethoxazole (SMXZ)	9.4	254>92	25	30	2.5	
Sulfaethoxypyridazine (SEPD)	9.5	295>156	30	19	2.5	
Sulfatroxazole (STRX)	9.5	268>92	32	29	2.5	SDMX- d_4
Sulfisoxazole (SIX)	9.8	268>156	28	15	2.5	
Sulfabenzamide (SBA)	10.5	277>156	10	16	5	
Sulfadimethoxine (SDMX)	10.8	311>156	28	22	2.5	
Sulfaquinoxaline (SQ)	10.9	301>92	30	34	2.5	SDMX- d_4
Sulfanitran (SNT)	12.9	336>156	30	15	5	
Sulfabromomethazine (SBMZ)	13.0	359>92	32	33	2.5	
SDZ- d_4	5.7	255>96	26	27		
STZ- d_4	6.1	260>160	28	15		
SDD- d_4	7.5	283>186	30	17		
SMXZ- d_4	9.4	258>96	30	25		
SDMX- d_4	10.8	315>96	32	31

Fig. 1. MRM chromatograms of 0.01 $\mu\text{g/g}$ sulfonamides added to egg

ことにより試料が粉砕され、抽出を行うことができた。過去に SDD が検出された豚肉試料を用いてガラスビーズ粉砕法と高速ホモジナイザーによる抽出とを比較したところ、SDD の濃度はガラスビーズ粉砕法で $2.1 \mu\text{g/g}$ ($n=3$)、高速ホモジナイザーで $2.0 \mu\text{g/g}$ ($n=3$) とほぼ同じ値であった。したがって、ガラスビーズ粉砕法は食品中の残留薬物分析に適用可能であると考えられた。著者らが使用した高速振とう器は同時に 6 ないしは 10 本の遠沈管をセットできるので、同時に多検体の抽出を行え、コンタミネーションの危険性もなく抽出操作を極めて簡便にすることができた。

2) 固相抽出の検討

サルファ剤の精製には固相抽出カラムとしてイオン交換カラム、アルミナカラム、逆相カラムなどが用いられている^{1), 2), 4), 5)}。イオン交換カラムの場合、性質の類似しているサルファ剤のみを対象にしたり⁶⁾、固相からの溶出の際に分画に分ける必要があった⁷⁾。サルファ剤は極性や酸解離定数が化合物ごとに異なるため、カラムへの保持と脱離による精製の場合、逆相系では SGD, SA が保持されず、強陽イオン交換系では SDDS, SNT, 弱陰イオン交換系では SGD, SA, SDDS, SNT が保持されなかった。このため、すべてのサルファ剤を同時に精製することは困難で

Table 3. Recoveries of 25 sulfonamides from livestock products and seafoods

Average recoveries (%) /RSD(%), n=5									
Sample	Milk	Egg	Salmon	Yellow tail	Shrimp	Chicken muscle	Bovine muscle	Swine muscle	Bovine liver
Added	0.1 $\mu\text{g/g}$								
SGD	93/6	92/3	85/3	71/6	75/3	75/4	75/2	59/4	67/3
SA	96/6	100/2	87/4	94/6	92/4	94/3	88/2	92/2	79/3
SAA	106/4	95/1	103/3	110/6	83/4	103/2	105/3	104/3	97/3
SID	107/4	98/1	99/2	89/7	95/3	89/7	88/7	86/4	84/4
SDZ	105/4	100/3	92/5	100/5	105/6	97/5	94/5	103/4	104/3
STZ	96/5	99/2	101/7	109/4	99/4	106/2	103/4	107/2	105/3
SPD	95/5	100/10	97/5	110/4	106/7	105/2	104/3	110/3	108/3
SMR	120/5	104/2	107/3	115/4	102/4	105/4	106/5	113/4	110/2
SDD	97/2	98/2	102/4	96/1	98/4	96/3	98/4	97/3	96/2
SMTZ	101/7	92/2	94/2	88/2	90/2	94/2	94/4	98/3	98/2
SMPD	105/8	92/5	97/3	86/3	96/3	100/3	97/3	97/4	115/2
SIZ	101/8	96/4	96/3	96/4	89/2	94/3	97/4	101/2	96/3
SDDS	98/7	89/3	92/6	90/3	93/5	97/3	98/3	98/3	101/3
SMMX	100/5	91/3	98/6	89/2	89/3	92/3	81/2	90/3	92/1
SCPD	95/5	93/4	99/6	93/2	91/3	98/3	98/4	99/3	103/3
SDOX	105/6	99/4	102/5	98/2	98/3	96/2	95/3	95/3	98/2
SMXZ	93/7	100/7	97/5	95/2	97/2	96/4	97/2	99/3	94/3
SEPD	95/7	95/5	92/5	85/3	97/3	99/1	99/3	100/3	100/1
STRX	103/5	102/4	104/6	100/1	97/7	100/4	102/3	99/3	103/3
SIX	100/6	94/5	94/4	90/2	97/3	91/3	90/2	87/4	97/3
SBA	100/2	106/2	92/5	98/5	103/5	92/3	90/3	95/5	95/2
SDMX	93/3	93/5	95/3	103/2	93/4	101/4	98/4	101/1	98/2
SQ	88/6	93/2	100/4	91/7	89/3	100/5	93/4	98/5	81/4
SNT	86/2	107/3	78/2	87/7	106/5	107/6	100/7	108/4	95/4
SBMZ	99/4	99/3	87/5	89/5	101/3	113/4	109/3	106/3	108/2
Added	0.01 $\mu\text{g/g}$								
SGD	82/6	110/10	92/4	79/5	83/6	74/8	77/6	58/4	65/5
SA	91/3	101/6	90/4	99/2	94/6	99/4	93/2	88/3	65/2
SAA	90/8	100/9	106/5	113/3	94/11	95/6	104/3	95/2	100/4
SID	84/5	111/8	101/6	83/4	88/9	74/4	80/4	76/4	87/7
SDZ	108/3	107/10	95/5	100/2	105/7	101/8	100/5	96/4	105/4
STZ	106/5	97/10	95/9	100/10	110/8	102/7	103/4	110/5	100/5
SPD	107/5	102/9	106/6	115/1	107/12	104/4	107/2	110/3	109/3
SMR	108/5	115/9	102/5	112/6	109/6	105/3	105/4	110/7	112/4
SDD	98/7	91/5	101/6	100/7	103/7	102/4	97/6	98/2	92/5
SMTZ	92/2	96/4	95/7	78/5	93/8	97/6	93/5	96/3	96/4
SMPD	112/4	92/7	94/6	91/4	103/4	102/8	97/4	103/2	111/7
SIZ	101/5	102/9	94/7	93/2	102/3	100/5	96/5	97/3	92/3
SDDS	96/9	98/9	92/5	90/8	107/4	100/14	92/7	97/4	93/3
SMMX	95/5	100/4	90/7	96/4	98/11	94/5	90/6	90/4	90/7
SCPD	88/9	90/10	90/8	105/10	102/12	98/7	102/9	95/6	98/7
SDOX	95/5	104/6	100/7	110/3	107/4	99/3	101/3	100/2	95/5
SMXZ	99/3	112/7	105/11	103/3	101/4	97/6	100/6	96/6	96/6
SEPD	94/4	105/6	87/8	91/7	102/10	99/5	103/3	95/4	105/2
STRX	114/5	105/7	101/5	109/5	119/5	104/4	108/4	104/5	100/5
SIX	91/5	103/5	99/8	100/6	100/5	92/5	99/1	92/3	98/4
SBA	106/6	97/5	107/5	99/8	101/11	100/9	95/8	100/4	93/9
SDMX	97/6	92/7	94/3	102/4	104/5	102/2	96/4	98/5	101/3
SQ	96/3	103/12	105/15	79/8	96/10	96/6	100/7	94/4	75/9
SNT	112/5	97/3	82/5	100/6	96/14	103/6	103/6	103/2	98/6
SBMZ	105/1	98/4	89/6	93/3	130/6	107/4	108/8	109/8	120/4

あった。そこで、カラムに妨害成分を保持させ精製する方法を検討した。

中性アルミナがスルファジミジン試験法で使用されおり⁸⁾スルファ剤の精製に使用されることが多いことから、

アルミナカラムを検討した。85%アセトニトリルの試料抽出液を負荷すると、中性アルミナカラムではSMTZ以外のサルファ剤が回収された。さらに、塩基性アルミナカラムでも同様に検討したところ、すべてのサルファ剤が回

Table 4. Recoveries of 25 sulfonamides from bovine kidney

Average recoveries (%) / RSD (%), $n=3$		
Added	0.1 $\mu\text{g/g}$	0.01 $\mu\text{g/g}$
SGD	101/2	93/7
SA	106/5	100/7
SAA	94/3	92/3
SID	97/5	99/6
SDZ	98/1	106/2
STZ	102/5	99/10
SPD	100/3	102/4
SMR	103/3	100/3
SDD	100/3	97/5
SMTZ	96/1	95/4
SMPD	100/1	101/2
SIZ	100/3	96/2
SDDS	100/4	97/6
SMMX	97/5	96/3
SCPD	101/1	110/3
SDOX	101/5	98/3
SMXZ	96/2	90/4
SEPD	100/3	94/3
STRX	102/4	103/4
SIX	99/4	99/4
SBA	98/5	107/2
SDMX	103/3	104/5
SQ	97/6	97/2
SNT	79/3	104/5
SBMZ	98/2	99/8

収でき、精製効果も良好であった。よって、塩基性アルミナを使用することとした。しかし、サケ、エビ、鶏卵の色素成分の除去が不十分であったので、色素等の低極性物質を除去するために逆相カラムの追加を検討した。ODS に 85% アセトニトリルの試料抽出液を負荷すると、約 20 mL まで色素を保持することができ、すべてのサルファ剤が保持されることなく回収された。この 2 種類のカラムを連結することによりアルミナ B に保持される高極性成分と ODS に保持される低極性成分を同時に除去することができた。しかし、試料の 85% アセトニトリル抽出液を用いた場合、高極性成分によるイオン化抑制が認められた。そのため試料の抽出をアセトニトリルで行い、85% となるよう水で希釈してカラムを通過させることとしたところ、高極性成分の影響を抑制することができた。

以上の検討の結果、牛腎臓以外はマトリックス添加検量線を用いなくても良好な定量が行えた。

添加回収試験

試料に各サルファ剤の濃度が 0.1, 0.01 $\mu\text{g/g}$ となるように添加し、分析を行った。各試料 5 検体の平均回収率は、豚肉、牛肝臓の SGD、牛肝臓の SA、エビの SBMZ を除くと 70~120%、相対標準偏差は 15% 以下と良好な結果が得られた (Table 3)。豚肉、牛肝臓の SGD や SA は回収率が 60% 前後と低くマトリックスによるイオン化抑制の影響を受けていると考えられた。

また、牛の腎臓の分析においては、マトリックスの影響が大きく通常の標準品のみの検量線では定量が行えなかつ

たため、試料添加検量線を作成し定量した。これにより、十分な定量精度が得られた (Table 4)。

定量下限

本法による各サルファ剤の定量下限値 ($S/N \geq 10$) は 0.0025~0.005 $\mu\text{g/g}$ であった (Table 2)。

まとめ

サルファ剤の一斉分析法を検討した。ガラスビーズ粉砕法による抽出を行い、ODS とアルミナ B の連結カラムで精製し試験溶液を調製した。この試験溶液を LC/MS/MS を用いて測定した。本法では検量線を牛腎臓以外は試料添加標準溶液を使用することなく作成でき、一部を除き定量性も良好であった。よって、本法は簡便で十分な感度と精度が得られることから、食品中のサルファ剤の一斉分析法として有用であると考えられる。

文 献

- Potter, R. A., Burns, B. G., van de Riet, J. M., North, D. H., Darvesh, R. Simultaneous determination of 17 sulfonamides and the potentiators ormetoprim and trimethoprim in salmon muscle by liquid chromatography with tandem mass spectrometry detection. *J. AOAC Int.*, **90**, 343-348 (2007).
- Chiara, C., Roberta, C., Antonio, D. C., Manuela, N., Roberto, S. A simple and sensitive liquid chromatography-mass spectrometry confirmatory method for analyzing sulfonamide antibacterials in milk and egg. *J. Agric. Food Chem.*, **51**, 558-566 (2003).
- Mamoun, C. B., Beckerich, J. M., Gaillardin, C., Kepes, F. Disruption of YHC8, a member of the TSR1 gene family, reveals its direct involvement in yeast protein translocation. *Biol. Chem.*, **274**, 11296-11302, (1999).
- Chonan, T., Fujimoto, T., Ueno, K., Tazawa, T., Ogawa, H. Multi-residue method for determination of veterinary drugs and feed additives in meats by HPLC. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan.)*, **48**, 153-158 (2007).
- Font, G., Juan-Garcia, A., Pico, Y., Pressurized liquid extraction combined with capillary electrophoresis-mass spectrometry as an improved methodology for the determination of sulfonamide residues in meat. *J. Chromatogr. A*, **1159**, 233-241 (2007).
- Ito, Y., Oka, H., Ikai, Y., Matumoto, H., Miyazaki, Y., Nagase, H. Application of ion-exchange cartridge clean-up in food analysis V. Simultaneous determination of sulfonamide antibacterials in animal liver and kidney using high-performance liquid chromatography with ultraviolet and mass spectrometric detection. *J. Chromatogr. A*, **898**, 95-102 (2000).
- Tarbin, J. A., Clarke, P., Shearer, G. Screening of sulfonamides in egg using gas chromatography-mass-selective detection and liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. B*, **729**, 127-138 (1999).
- 厚生労働省監修 “食品衛生検査指針 動物用医薬品・試料添加物編”，東京，社団法人 日本食品衛生協会，2003, p 124-130. (ISBN: 4-889-25006-9)