

# 用于药物杂质分析的高分辨率采样 二维液相色谱

隐藏在 API 峰下的相对浓度杂质的检测

## 应用简报

小分子药物与仿制药

### 作者

Susanne Stephan 和 Sonja Krieger  
安捷伦科技有限公司  
Waldbronn, Germany

### 摘要

分析与活性药物成分 (API) 有关的低浓度杂质对原料药的质量控制来说至关重要。当杂质与 API 的化学结构相似且浓度差异较大时，色谱分离与检测将变得困难。

Agilent 1290 Infinity II 二维液相色谱解决方案可实现全二维液相色谱 (LC × LC)、多中心切割二维液相色谱 (MHC) 以及高分辨率采样二维液相色谱 (HiRes 2D-LC) 之间的轻松切换。在本应用简报中，使用高分辨率采样二维液相色谱实现两种紧邻洗脱的化合物的分离，其中一种化合物浓度极低且隐藏在其他高浓度化合物峰下。以氯二氟苯甲酸和脱酰胺胰岛素分别作为标准物质和实际样品进行分析。



Agilent Technologies

## 前言

原料药的纯度分析对于药物质量和患者安全来说都非常重要<sup>1</sup>。根据 ICH 指南 Q3A(R2)，应对新原料药中含量大于 0.05%<sup>2</sup> 阈值（相对于 API）的杂质进行报告。对这些浓度下的杂质进行分离和检测具有极大的挑战性，尤其当杂质结构与活性药物成分（API）具有相似性时。

本应用简报以相对浓度为 100% 及 0.05% 的氯二氟苯甲酸的不同异构体为例，展示了高分辨率（HiRes）采样二维液相色谱在杂质分离与检测中的应用。使用 Agilent 1290 Infinity II 高动态范围二极管阵列检测器（HDR-DAD）杂质分析仪解决方案作为二维检测器可以进一步提高本应用的精度和准确度。以脱酰胺胰岛素作为实际样品分析，以展示高分辨率采样 2D-LC/MS 对具有相似结构的杂质的检测。此处，二维液相色谱还具备其他优势，即第二维分离可作为脱盐步骤，避免第一维缓冲液中的高盐含量进入 MS 离子源造成离子抑制<sup>3</sup>。使用 Agilent MassHunter 的第二维色谱图生成器查看并分析 MassHunter 中的 2D-LC/MS 数据。

在高分辨率采样二维液相色谱中，在选定时间范围内收集几个涵盖第一维色谱图中整个峰面积范围的小体积馏分，以此测定目标化合物，如图 1 所示。每次切割都驻留在采样环中，并在第二维中对所有切割进行连续分析。这一模式可确保所有选定化合物均转移至第二维，并在其中得到分析。这样，选定的共洗脱化合物都经过高分辨率采样处理，以在第二维中进行分析。如技术概述<sup>4</sup> 所示，这一操作可实现可靠的定量分析。

## 实验部分

### 设备

Agilent 1290 Infinity II 二维液相色谱解决方案包括以下模块：

- 两台 Agilent 1290 Infinity II 高速泵 (G7120A)
- Agilent 1290 Infinity II Multisampler (G7167B)，配备 Infinity II 样品冷却装置（选项 #100）
- 两台 Agilent 1290 Infinity II 大容量柱温箱 (G7116B)
- 三台 Agilent 1290 Infinity II 二极管阵列检测器 (G7117B)，配备 3.7 mm、10 mm、60 mm 最大光强卡套式流通池 (G4212-60008)
- Agilent 1290 Infinity 阀驱动 (G1170A) 和 2 位/4 通双向阀（二维液相色谱阀头，G4236A）
- 两个 Agilent 1290 Infinity 阀驱动 (G1170A)，配备带 40  $\mu$ L 定量环的多中心切割阀 (G4242-64000)

为分析脱酰胺胰岛素，将 Agilent 1290 Infinity II 二维液相色谱解决方案与配备安捷伦双喷射流 ESI 离子源的 Agilent 6545 Q-TOF 联用。为避免第一维缓冲液中的高含量盐进入离子源，按之前应用简报<sup>5</sup> 中的建议，使用时间表进行 MS 分流阀切换，在每次第二维分析的第一分钟将液流引入废液。

### 软件

- 带安捷伦二维液相色谱软件（产品版本 A.01.03 [025]）和 Agilent HDR-DAD ChemStation 插件（产品版本 A.01.01 [015]）的 Agilent OpenLAB CDS ChemStation 修订版 C.01.07 SR2 [255]
- Agilent MassHunter 工作站 LC/MS 数据采集软件，版本 B.08.00，Build 8.00.8026.0
- Agilent MassHunter 工作站定性分析软件，版本 B.07.00，Build 7.0.7024.0
- 用于 MassHunter 的安捷伦第二维色谱图生成器，修订版 1.0.15

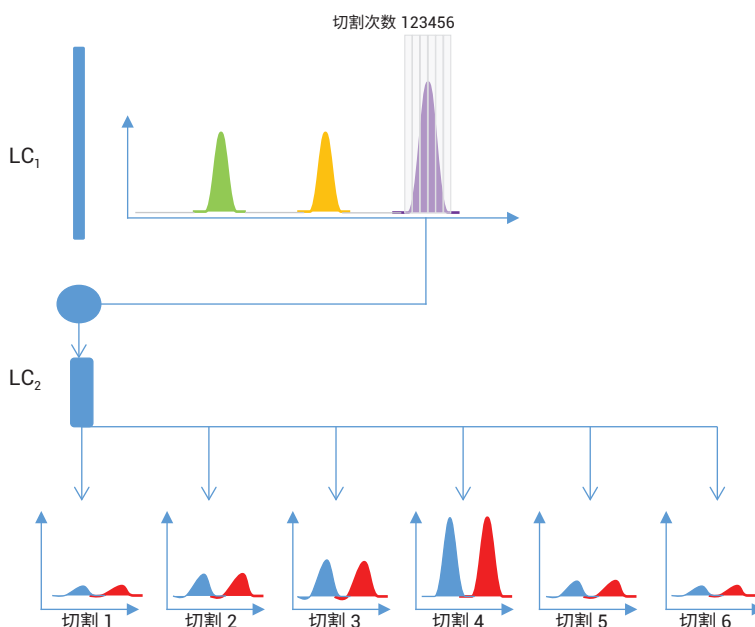


图 1. 高分辨率采样二维液相色谱示意图

## 化学品

所有试剂纯度均为液相色谱级。乙腈和硫酸钠购自 Merck (Darmstadt, Germany)。甲酸、磷酸、磷酸氢二钠以及磷酸二氢铵购自 Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany)。新制超纯水来自配置 0.22  $\mu\text{m}$  膜式终端过滤器 (Millipak) 的 Milli-Q Integral 水纯化系统 (Millipak, EMD Millipore, Billerica, MA, USA)。5-氯-2,4-二氟苯甲酸、3-氯-2,4-二氟苯甲酸、2-氯-4,5-二氟苯甲酸以及牛胰腺胰岛素标准品均购自 Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany)。

## 样品

用 50/50 的水/乙腈配制浓度为 1 mg/mL 的氯二氟苯甲酸储备液。用这些储备液配制不同浓度比的三种化合物的混合物。

pH 为 2.55 时，将浓度为 1 mg/mL 的胰岛素溶于 25 mmol/L 的磷酸钠缓冲液中。为使胰岛素脱酰胺基化，将胰岛素溶液的 pH 值调为 9，并在室温下放置 12 个小时。

## 高分辨率采样二维液相色谱分析氯二氟苯甲酸的方法

	第二维检测器： 配备 10 mm 最大光强卡套式流通池的 DAD	第二维检测器： HDR-DAD 解决方案
<b>色谱柱</b>		
第一维	Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 RRHD, 2.1 $\times$ 100 mm, 1.8 $\mu\text{m}$ (部件号 959758-902)	
第二维	Agilent ZORBAX Eclipse Plus PAH, 2.1 $\times$ 100 mm, 1.8 $\mu\text{m}$ (部件号 959764-918)	
<b>第一维泵</b>		
溶剂 A	水 + 0.1% 磷酸	
溶剂 B	乙腈	
流速	0.2 mL/min	
梯度	0 min 时 B 为 30% 10 min 时 B 为 30% 12 min 时 B 为 80% 14 min 时 B 为 80% 15 min 时 B 为 30%	
<b>第二维泵</b>		
溶剂 A	水 + 0.1% 磷酸	
溶剂 B	乙腈	
流速	0.5 mL/min	
梯度	0 min 时 B 为 20% 4 min 时 B 为 25% 5 min 时 B 为 25%	
第二维梯度停止时间	5.00 min	
第二维分析周期	6.00 min	
停止时间	15 min	
<b>高分辨率采样</b>		
基于时间	6.54 min	7.83 min
采样时间	7 s	9 s
切割次数	9	10
<b>大容量柱温箱</b>		
第一维	30 $^{\circ}\text{C}$	
第二维	30 $^{\circ}\text{C}$	
<b>Multisampler</b>		
进样量	1 $\mu\text{L}$	5 $\mu\text{L}$
进样针清洗	用 50/50 甲醇/水清洗 10 秒	
<b>第一维二极管阵列 检测器</b>		
波长	210 nm/4 nm, 参比 395 nm/10 nm	
数据采集速率	40 Hz	
<b>第二维检测器</b>		
	DAD (10 mm 流通池)	HDR-DAD
波长	210 nm/4 nm, 参比 395 nm/10 nm	
数据采集速率	40 Hz	

## 高分辨率采样 2D-LC/MS 分析脱酰胺胰岛素的方法 (修改自)<sup>3</sup>

参数	值	参数	值
<b>色谱柱</b>		<b>大容量柱温箱</b>	
第一维	Agilent Poroshell 120 EC-C18 2.1 × 150 mm, 2.7 μm (部件号 693775-902)	第一维	40 °C
第二维	Agilent ZORBAX Bonus RP 2.1 × 50 mm, 1.8 μm (部件号 857768-901)	第二维	40 °C
<b>第一维泵</b>		<b>Multisampler</b>	
溶剂 A	60 mmol/L Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> + 40 mmol/L NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 2.21	进样量	1 μL
溶剂 B	乙腈/水 80/20	进样针清洗	用 50/50 甲醇/水清洗 10 秒
流速	0.3 mL/min	<b>第一维二极管阵列检测器</b>	
梯度	0 min 时 B 为 29% 28 min 时 B 为 43% 29 min 时 B 为 90% 30 min 时 B 为 90% 31 min 时 B 为 29%	波长	195 nm/4 nm, 参比 395 nm/100 nm
<b>第二维泵</b>		数据采集速率	40 Hz
溶剂 A	水 + 0.1% 甲酸	<b>第二维二极管阵列检测器</b>	
溶剂 B	乙腈/水 80/20 + 0.1% 甲酸	波长	195 nm/4 nm, 参比 395 nm/100 nm
流速	0.4 mL/min	数据采集速率	40 Hz
梯度	0 min 时 B 为 6.25% 0.1 min 时 B 为 23% 2.6 min 时 B 为 35% 2.7 min 时 B 为 90% 2.8 min 时 B 为 90% 2.9 min 时 B 为 6.25%	<b>MS 参数</b>	
第二维梯度停止时间	3.00 min	模式	正离子
第二维分析周期	5.00 min	气体温度	200 °C
停止时间	38 min	气体流速	13 L/min
<b>高分辨率采样</b>		雾化器	35 psig
基于时间	15.64 min	鞘气温度	375 °C
采样时间	4 s	鞘气流速	12 L/min
切割次数	10	毛细管电压	2500 V
		喷嘴电压	300 V
		碎裂电压	175 V
		锥孔电压	65 V
		Oct 1 RF Vpp	750 V
		质量数范围	100–3200 m/z
		采集速率	2 幅谱图/秒

## MS 分流阀时间表

时间间隔编号	开始时间 (min)	分流阀位置	时间间隔编号	开始时间 (min)	分流阀位置
1	0	MS	13	42.02	MS
2	16.02	废液	14	46.02	废液
3	17.02	MS	15	47.02	MS
4	21.02	废液	16	51.02	废液
5	22.02	MS	17	52.02	MS
6	26.02	废液	18	56.02	废液
7	27.02	MS	19	57.02	MS
8	31.02	废液	20	61.02	废液
9	32.02	MS	21	62.02	MS
10	36.02	废液	22	66.02	废液
11	37.02	MS	23	67.02	MS
12	41.02	废液			

## 高分辨率采样二维液相色谱的方法设置

通过 Agilent 1290 Infinity II 二维液相色谱解决方案执行高分辨率采样二维液相色谱。阀配置（图 2）包括与带有 12 个定量环的多中心切割阀相连的 2 位/4 通双向阀。采用这一设置后，最多可对 10 次连续切割进行采样与储存以待分析。对于高分辨率采样二维液相色谱，为避免发生样品损失，建议最大定量环填充量为 80%。

图 3 显示了用于氯二氟苯甲酸分析的第二维泵方法设置。首先，运行一维液相色谱分离样品，并将色谱图加载为预览窗口中的参比信号。将高分辨率采样设置为基于时间，以目标峰为依据，氯二氟苯甲酸的九次切割涵盖了整个峰宽。在给定的二维条件下，7 秒的采样时间相当于 58% 的定量环填充。Agilent 1290 Infinity II HDR-DAD 杂质分析仪解决方案采用的进样量更大，第二维检测器需要 10 次切割以及 9 s 的采样时间才能覆盖整个第一维峰宽。因此，最终定量环填充量为 75%。对于脱酰胺胰岛素的高分辨率采样，按照相同程序进行方法设置。采用十次切割且采样时间为 4 秒时，相当于 50% 的定量环填充。

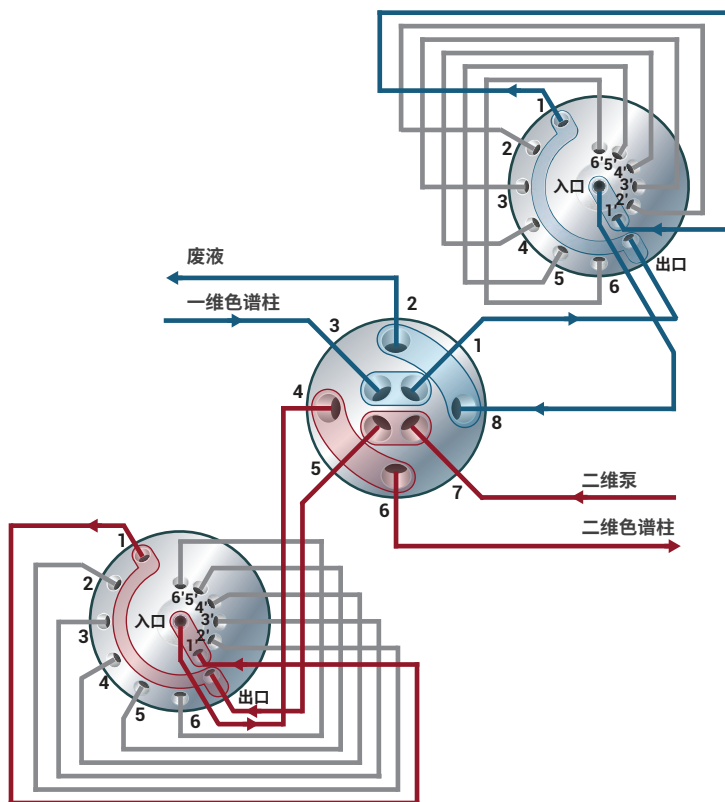


图 2. 带 12 个采样环的 Agilent 1290 Infinity II 二维液相色谱解决方案的阀配置

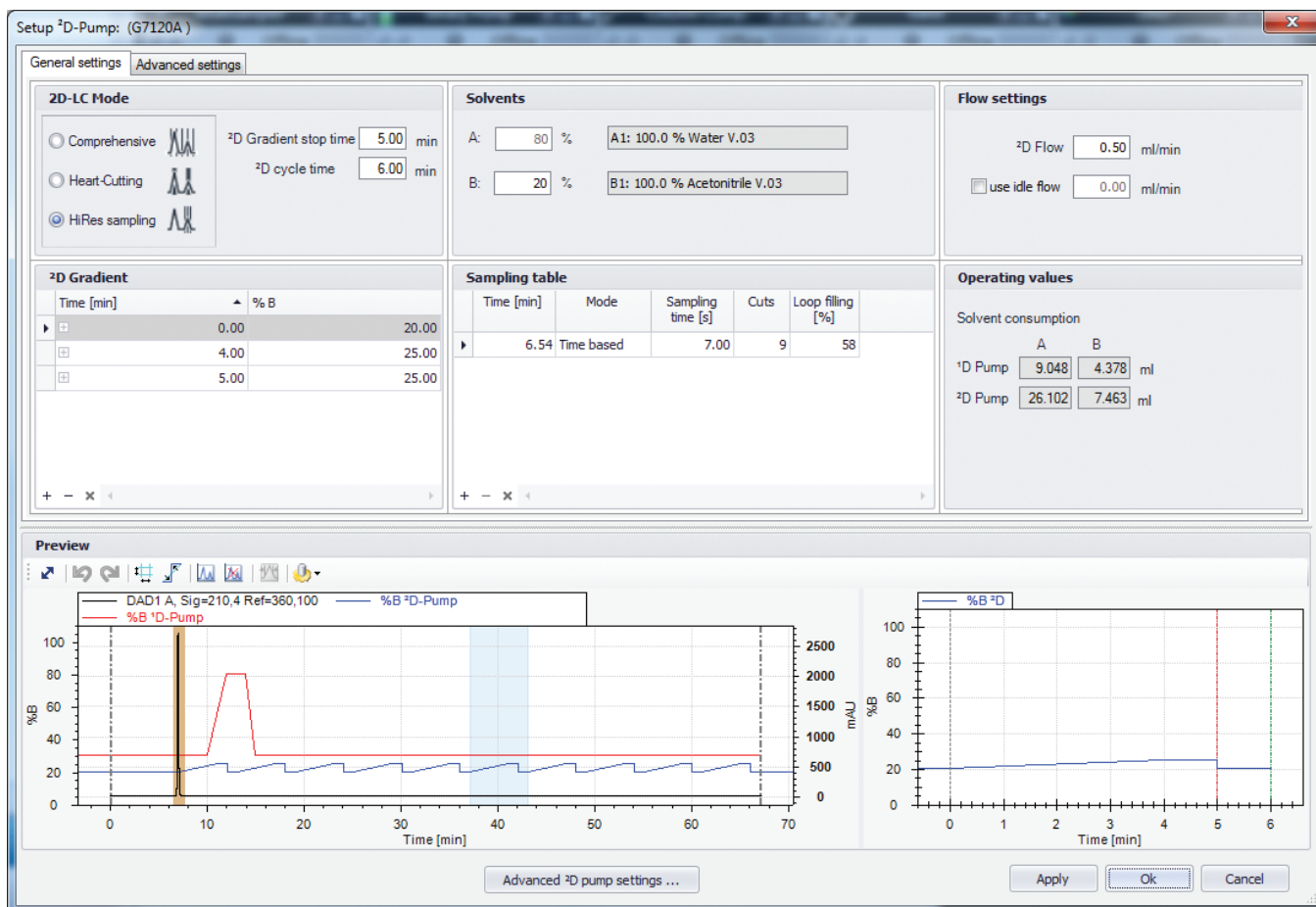


图 3. 第二维泵的方法设置

## 结果与讨论

### 氯二氟苯甲酸分析

首先使用高分辨率采样二维液相色谱对三种异构体 2-氯-4,5-二氟苯甲酸 (化合物 1)、5-氯-2,4-二氟苯甲酸 (化合物 2) 以及 3-氯-2,4-二氟苯甲酸 (化合物 3, 结构见图 4) 不同浓度比的混合物进行分析, 以配备 10 mm 最大光强卡套式流通池的 Agilent 1290 Infinity II DAD 作为第二维检测器。

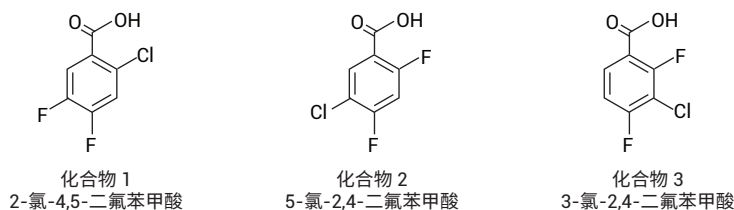


图 4. 三种分析的氯二氟苯甲酸的化学结构

图 5 显示了两种混合物的第一维色谱图，分别为三种化合物以相同的低浓度混合时得到的混合物色谱图（蓝色），以及化合物 3、化合物 2 和化合物 1 分别以 100%、0.05%、0.05% 的相对浓度混合时得到的混合物色谱图（红色）。在蓝色色谱图中，可以观察到三个相互分离的峰，然而在红色色谱图中，化合物 2（相对浓度为 0.05 %）隐藏在化合物 3（相对浓度为 100 %）之下，无法作为分离的峰进行检测。在这些化合物的二维液相色谱分析中，使用高分辨率采样对峰 3 的整个峰宽进行采样，随后在第二维色谱柱上对九次切割进行连续分析。图 6 显示了对第一维峰的采样方案以及生成的切割 2-5 的第二维色谱

图。切割 2 中未检测到峰。切割 3 中显示了化合物 2 和化合物 3 的相互分离的峰，这两个峰在第一维中重叠。

切割 4 主要包含化合物 3 以及极少量的化合物 2。切割 5 中只检测到化合物 3。

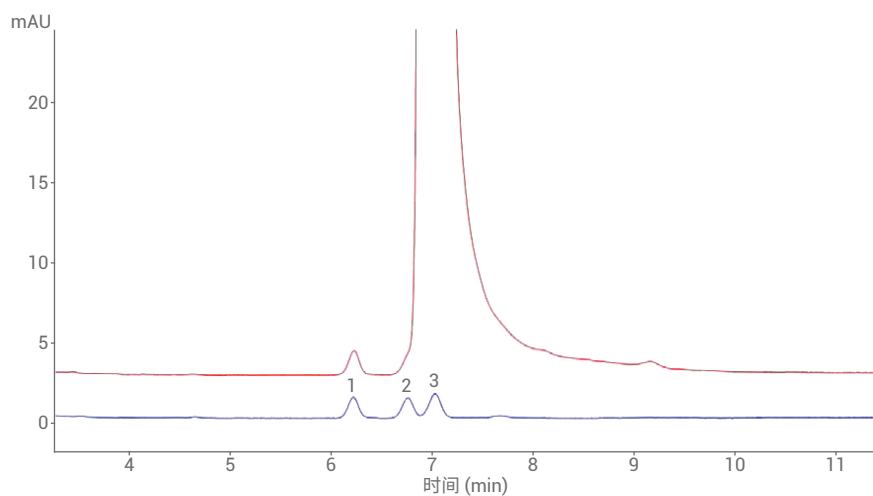


图 5. 两种混合物的第一维色谱图，其中化合物 3、化合物 2 和化合物 1 的相对浓度分别为 100%、0.05% 和 0.05%（红色曲线）以及三种化合物的相对浓度均为 0.05%（蓝色曲线）

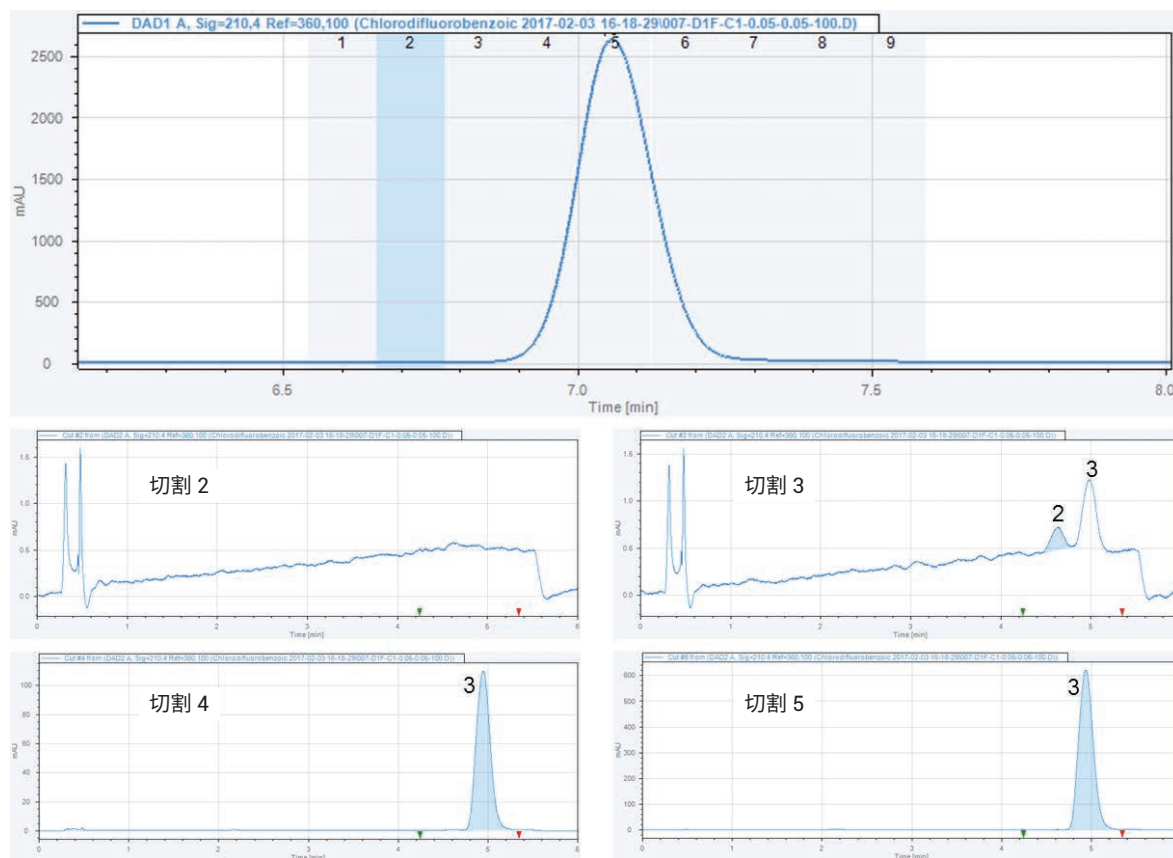


图 6. 化合物 3 的第一维色谱图（顶部），对整个峰宽进行切割 1-9 采样。对切割 2、3、4、5 进行分析得到的第二维色谱图

为了根据 ICH 指南给出的报告阈值确定本方法的可用性，配制了三种氯二氟苯甲酸的不同混合物，包含相对浓度为 100% 的化合物 3 与相对浓度为 0.05%、0.10% 或 0.15% 的化合物 1 和 2。如图 7 所示，使用 Chemstation 的二维液相色谱查看器计算所有切割中化合物 3 (3-氯-2,4-二氟苯甲酸) 与化合物 2 (5-氯-2,4-二氟苯甲酸) 各自的第二维峰面积

总和。每种混合物重复分析六次。表 2 显示了三种不同混合物的平均峰面积以及相对标准偏差 (RSD)。混合物 1、2、3 中浓度较低的化合物 2 的峰平均信噪比 (S/N) 分别为 3.2、5.9 与 12.2，这些值位于或低于定量限 (LOQ) 范围。这也解释了化合物 2 峰积分的 RSD 高达 7.95% 的原因。检测到化合物 2 与化合物 3 的峰面积之比分别为 0.03%、0.07% 以

及 0.14%。鉴于两种化合物第一维运行时测定的响应因子为 1.17，计算得到的准确度值为 71.6–108.5%，考虑到主要化合物与杂质间的浓度差异较大，这已经是一个良好的结果。这一结果表明，根据 ICH 指南 Q3A(R2) 给出的相对浓度报告阈值 (0.05%)，使用高分辨率采样二维液相色谱可以实现 API 中杂质 (杂质在第一维中与主峰共洗脱) 的分离与检测。

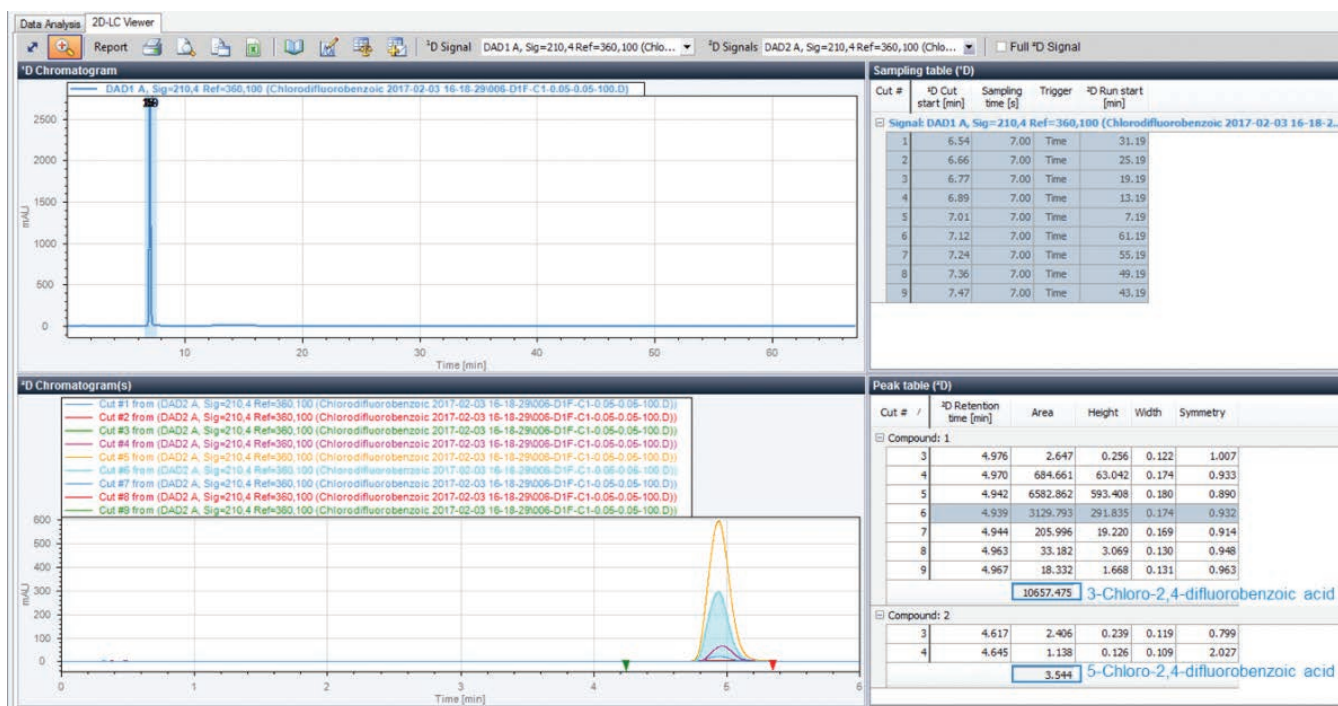


图 7. Chemstation 二维液相色谱查看器中显示的氯二氟苯甲酸高分辨率采样二维液相色谱分析结果，其中包括化合物 2 (5-氯-2,4-二氟苯甲酸) 与化合物 3 (3-氯-2,4-二氟苯甲酸) 的峰面积

表 2. 使用配备 10 mm 最大光强卡套式流通池的 Agilent 1290 Infinity II DAD 作为第二维检测器，根据连续六次运行的结果所计算的三个不同混合物的平均峰面积与相对标准偏差。化合物 2 与化合物 3 的峰面积比以 % 表示。为了计算准确度，将根据第一维峰计算得到的响应因子 1.17 考虑在内

	3-氯-2,4-二氟苯甲酸 (化合物 3)		5-氯-2,4-二氟苯甲酸 (化合物 2)		S/N	峰面积比 (%)	准确度 (%)
	峰面积	RSD (%)	峰面积	RSD (%)			
混合物 1 (0.05:0.05:100%)	10685.64	0.26	3.39	7.95	3.2	0.03	71.6
混合物 2 (0.10:0.10:100%)	10616.72	0.39	7.47	3.22	5.9	0.07	82.3
混合物 3 (0.15:0.15:100%)	10548.79	0.13	14.67	2.71	12.2	0.14	108.5



为了进一步提升精度和准确度，使用 Agilent 1290 Infinity II HDR-DAD 杂质分析仪解决方案作为第二维检测器。该解决方案将两台配备不同光程最大光强卡套式流通池的二极管阵列检测器的信号相结合以增加紫外动态线性范围。这样，化合物 3 可以有更大的进样量且不会超出紫外线性范围。混合物 1-3 的平均信噪比均高于 LOQ，分别为 20.7、24.1 与 34.0。化合物 2 的峰面积精度得到了极大的改善，同时 RSD 值低于 1.58% (表 3)。准确度范围为 96.4-108.5%，证明定量分析结果非常出色。

### 脱酰胺胰岛素分析

在碱性条件下牛胰腺胰岛素脱酰胺基化，生成含杂质的药物相关物质的实际样品。使用高分辨率采样 2D-LC/MS 对该样品进行分析。使用 MassHunter 的第二维色谱图生成器将 Agilent

OpenLAB CDS ChemStation 版的测量数据与 MassHunter 进行结合。该软件通过获得的所有第二维 MS 数据生成第二维色谱图，且第一维中每次切割生成一个色谱图。这些色谱图将显示在 MassHunter 中，与 OpenLAB CDS

表 3. 以 Agilent 1290 Infinity II HDR-DAD 杂质分析仪解决方案作为第二维检测器，根据连续六次运行的结果所计算的三个不同混合物的平均峰面积与相对标准偏差。化合物 2 与化合物 3 的峰面积比以 % 表示。为了计算准确度，将根据第一维峰计算得到的响应因子 1.17 考虑在内

	3-氯-2,4-二氟苯甲酸 (化合物 3)		5-氯-2,4-二氟苯甲酸 (化合物 2)		S/N	峰面积比 (%)	准确度 (%)
	峰面积	RSD (%)	峰面积	RSD (%)			
混合物 1 (0.05:0.05:100%)	50072.70	1.19	23.30	1.58	20.7	0.05	108.5
混合物 2 (0.10:0.10:100%)	49020.63	0.85	42.02	1.44	24.1	0.09	99.9
混合物 3 (0.15:0.15:100%)	48698.74	1.34	60.37	1.47	34.0	0.12	96.4

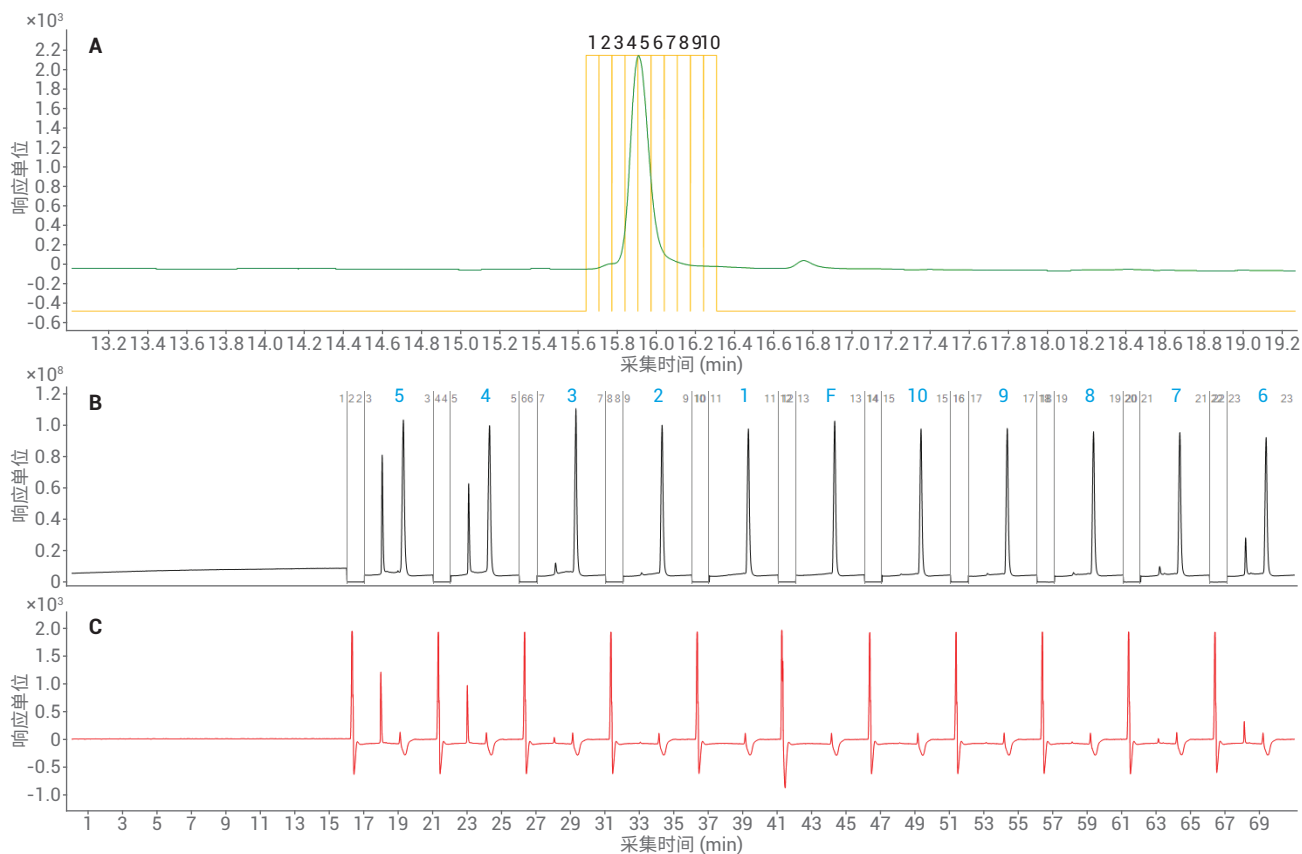


图 8. Agilent MassHunter 中显示的脱酰胺胰岛素分析的信号。A) 第一维 UV 信号，使用高分辨率采样进行切割采样 B) 整个第二维 MS 信号 C) 整个第二维 UV 信号

ChemStation 版中二维液相色谱查看器所提供的相似。如图 8A 所示，通过指示切割的信号富集，第一维紫外色谱图可在 MassHunter 中显示。图 8B 展示了整个 2D-MS 信号，图 8C 展示了 MassHunter 中整个 2D-UV 信号。使用 MassHunter 的第二维色谱图生成器可为 10 次切割分别创建单独的色谱图。图 9 中以层叠方式显示了 10 次切割的总离子流色谱图 (TIC)。在每次第二维分离的第一分钟内，通过

切换 MS 分流阀使液体流入废液。洗脱馏分中所含缓冲盐即以这种方式排除在 MS 离子源之外。对于图 9 中的每个 TIC，在运行时间为 1 分钟时，可以看到一个台阶，此时将分流阀切换回来，液体将流入 MS。切割 2-10 中保留时间为 2.06 分钟时，可以观察到不同强度的胰岛素主峰。第二维梯度包括一个较短的过程，即用 90% B 冲洗色谱柱，这导致在接近 3.2 分钟时基线快速升高然后降低。图 10 显示了

切割 7 的 TIC 和相应的第二维紫外信号的放大视图，该切割在第一维胰岛素主峰拖尾处进行采集。在第二维色谱图的 MS 和 UV 信号中均观察到了两个峰。图 11 为提取出的两个峰的质谱图。峰 1 的同位素模式可看作胰岛素的  $[M+5H]^{5+}$  离子。峰 2 的质谱图显示了对应于一种胰岛素的单一脱酰胺产物的同位素模式（中性质量数转移为 0.98 Da）。切割 6 中可以检测到相同化合物（相关数据未显示）。

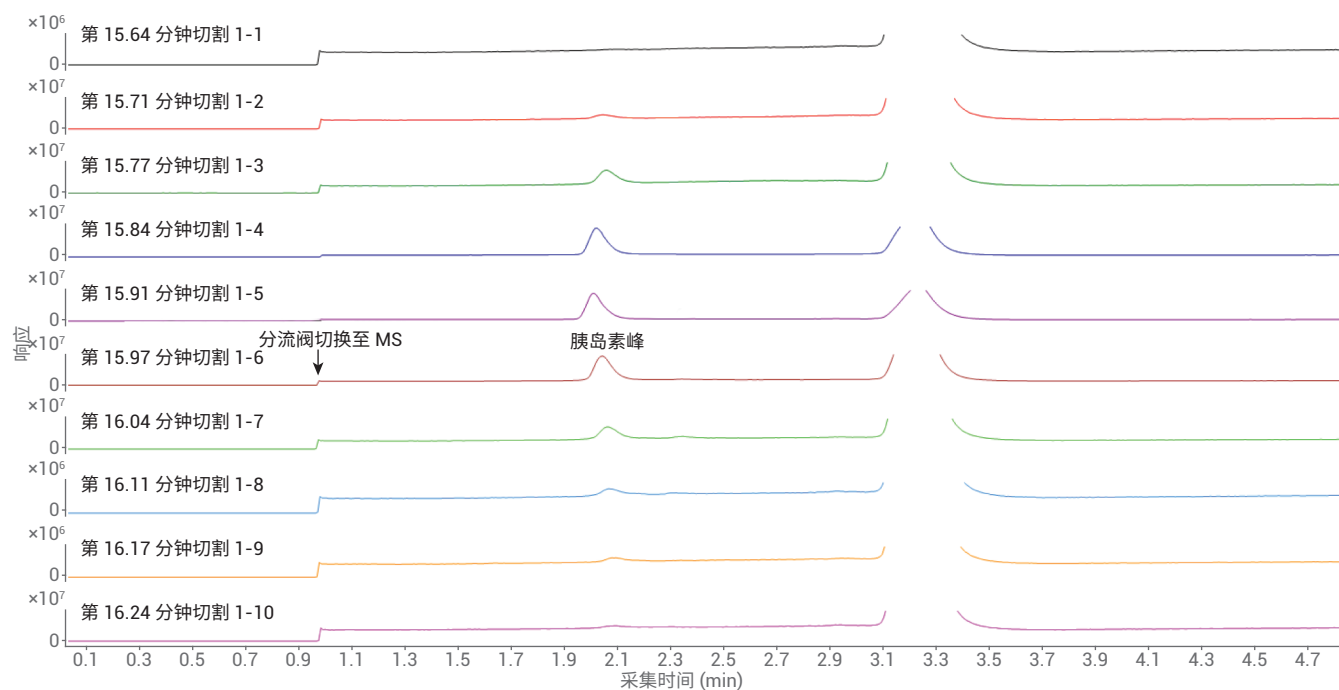


图 9. Agilent MassHunter 二维色谱图生成器生成的所有切割的单独第二维色谱图

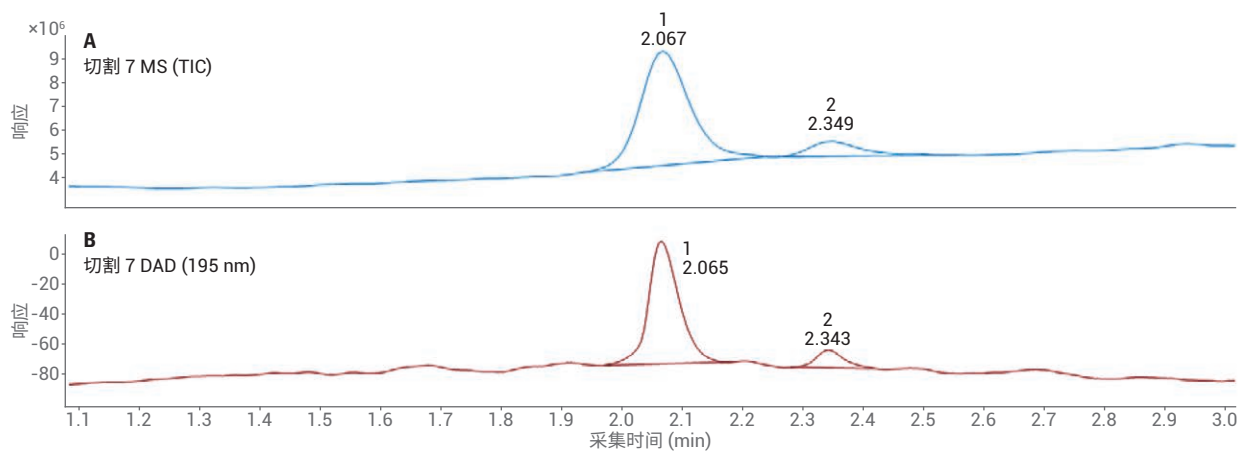


图 10. 切割 7 的第二维色谱图，由 MS (TIC) 和紫外信号 (DAD2) 生成

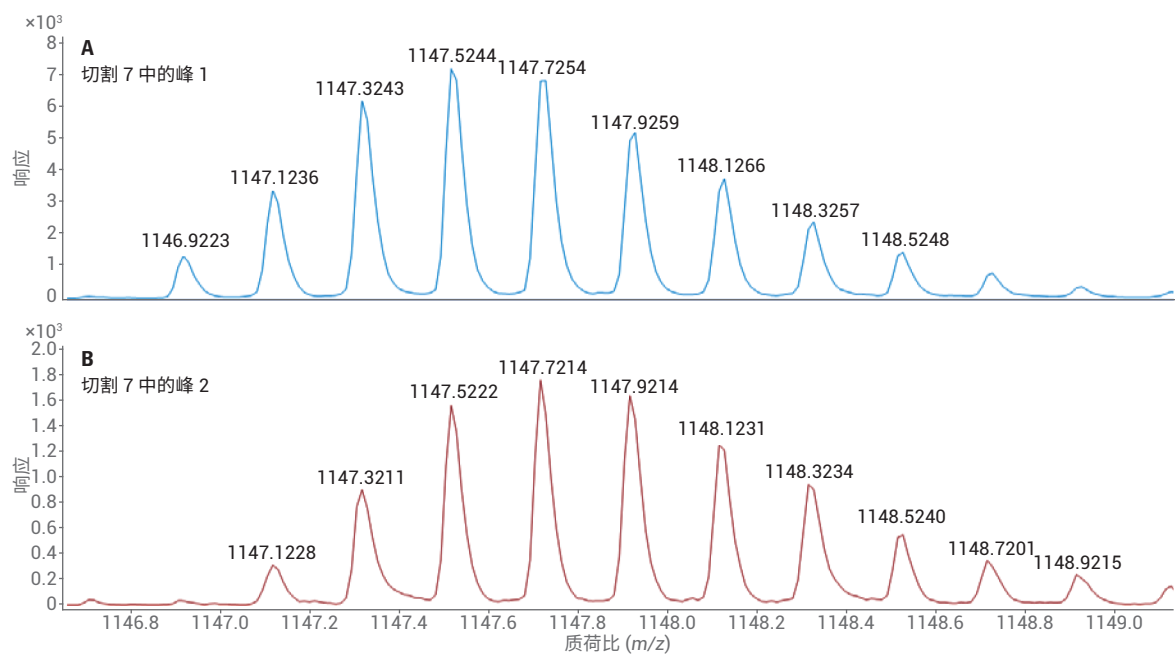


图 11. 切割 7 的第二维色谱图中观察到的峰 1 与峰 2 的质谱图

## 结论

本应用简报展示了使用高分辨率采样二维液相色谱对样品中与主要化合物具有相似结构的低浓度杂质的检测。根据 ICH 指南对新原料药中杂质的相关规定，使用氯二氟苯甲酸的混合物进行测试，结果显示相对浓度为 0.05%、0.10%、0.15% 和 100% 且在第一维分析中无法单独检测到的化合物，可通过高分辨率采样二维液相色谱转移至第二维色谱柱并进行分离。检测到的化合物 5-氯-2,4 二氟苯甲酸的准确度值为 71.6–108.5%。峰面积精度为 2.71–7.95%。以 Agilent 1290 Infinity II HDR-DAD 杂质分析仪解决方案作为第二维检测器可以增加进样量，同时可以改善准确度 (96.4–108.5%) 和峰面积精度 (1.44–1.58%)。以脱酰胺胰岛素作为实际样品，使用高分辨率采样 2D-LC/MS 进行分析。使用 Agilent MassHunter 的第二维色谱图生成器评估数据。在两次切割中通过对应的同位素模式检测并鉴定了胰岛素的单一脱酰胺产物，两次切割均在第一维胰岛素主峰拖尾处进行采集。

## 参考文献

1. Venkatramani, C. J.; *et al.* Assessing Stability-Indicating Methods for Coelution by Two-Dimensional Liquid Chromatography with Mass Spectrometric Detection. *J. Sep. Sci.* **2014**, *37*, 3214–3225
2. International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use – Impurities in New Drug Substances Q3A(R2), **2006**
3. Petersson, P.; Haselmann, K.; Buckenmaier, S. Multiple Heart-Cutting Two Dimensional Liquid Chromatography Mass Spectrometry: Towards Real Time Determination of Related Impurities of Bio-Pharmaceuticals in Salt Based Separation Methods. *J. Chromatogr. A* **2016**, *1468*, 95–101
4. Stephan, S. High-Resolution Sampling 2D-LC with the Agilent 1290 Infinity II 2D-LC Solution (高分辨率采样二维液相色谱与 Agilent 1290 Infinity II 二维液相色谱解决方案)，安捷伦科技公司技术概述，出版号 5991-7637EN, **2016**
5. Schneider, S. 2D-LC/MS Characterization of Charge Variants Using Ion Exchange and Reversed-Phase Chromatography Multiple Heart-Cutting 2D-LC Analysis of Innovator versus Biosimilar Monoclonal Antibodies (使用离子交换和反相色谱对电荷异构体进行 2D-LC/MS 表征 — 单克隆抗体创新药和仿制药的多中心切割二维液相色谱分析)，安捷伦科技公司应用简报，出版号 5991-6673EN, **2016**

[www.agilent.com](http://www.agilent.com)

仅限研究使用。  
不可用于诊断目的。

本文中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技 (中国) 有限公司, 2017  
2017 年 6 月 1 日, 中国出版  
5991-8082ZHCN



**Agilent Technologies**