

顶空固相微萃取-气相色谱质谱法测定人体足部气味中短链脂肪酸

董攀龙¹,徐生瑞¹,胡宗杰²,李宁²,李世杰²,陈长坡¹

(1.河南师范大学 化学化工学院,河南 新乡 453007;2.河南邦尼生物工程有限公司,河南 新乡 453000)

摘要:短链脂肪酸是人体足部气味物质的主要组成部分,建立合理的方法分析其含量分布有助于揭示人体代谢物与足部微生物之间的作用机制,可为足部除味提供有效的技术支持.建立了顶空固相微萃取(HS-SPME)-气相色谱质谱法(GC-MS)测定人体足部丙酸、异丁酸、丁酸、异戊酸、己酸和庚酸 6 种短链脂肪酸的分析方法.通过优化 SPME 萃取条件,获得了最佳萃取参数,萃取时间 20 min,萃取温度 50 °C,解析时间 2 min.在最佳条件下对 6 种短链脂肪酸萃取分析,方法线性范围为 0.25~50.00 ng($0.941 2 \leq R^2 \leq 0.997 2$);加标回收率为 92.50%~120.90%;检出限为 0.017~0.096 ng;方法定量限在 0.06~0.32 ng 之间;RSD($n=9$)均小于 20%.对 10 名志愿者足部进行了分析,获得了满意的结果.

关键词:足部气味;短链脂肪酸;固相微萃取;气相色谱质谱

中图分类号:O652.6;O658.2

文献标志码:A

人体在新陈代谢过程中会产生大量的分泌物通过皮肤释放出来,这些分泌物在皮肤表面微生物的作用下进一步生成相应的代谢产物,进而可产生特定的气味^[1].人体各部位中,足部由于汗腺较多,释放的分泌物多,极易滋生大量的细菌,导致足部比身体其他部位有较强烈的气味,有些人的足部甚至会发出恶臭^[2-3].为了更加有效地开发“除味”产品以抑制或消除足部臭味,必须清楚地认识气味的种类并阐明它们产生的机制.研究表明足部臭味主要来源于真菌和细菌与汗液中分泌物作用产生的短链脂肪酸^[4-5].因此,分析足部气味物质中的短链脂肪酸含量可为足部臭味的产生及抑制提供有效的基础数据.

目前对于人体气味物质中短链脂肪酸的测定多采用液-液萃取、热脱附、搅拌棒萃取吸附、固相微萃取等样品前处理手段,并结合气相色谱质谱仪(GC-MS)检测分析^[6-10].其中固相微萃取技术(SPME)是由加拿大滑铁卢大学的 PAWLISZYN J 教授课题组提出^[11],该技术集萃取、浓缩、解吸、进样于一体,具有灵敏度高、操作简便、环境友好等优点,已经在多个领域得到了广泛的应用研究^[12-16].ZHANG 等^[17]提出了基于固相微萃取技术萃取分析人体手臂皮肤的方法,证实通过固相微萃取技术结合 GC-MS 鉴定皮肤表面挥发性有机物的可能性.

因此,本文针对足部气味物质中的丙酸、异丁酸、丁酸、异戊酸、己酸、庚酸这 6 种短链脂肪酸,基于固相微萃取技术,结合气相色谱质谱检测仪器,建立了顶空固相微萃取(HS-SPME)-气相色谱质谱分析方法,并应用于实际样品分析.

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

气相色谱与质谱联用仪(GC-MS):安捷伦科技公司,型号 6890-5973N,配备 DB-FFAP 毛细管色谱柱(30 m × 0.25 mm × 0.25 μm);SPME 手柄、DVB/CAR/PDMS SPME 探头购置于美国色谱科公司;40 mL

收稿日期:2021-01-24;修回日期:2021-03-31.

基金项目:国家自然科学基金(21977025;21976052;21705017)

作者简介:董攀龙(1996—),男,河南开封人,河南师范大学硕士研究生,研究方向为样品前处理技术,E-mail:1347923910@qq.com.

通信作者:徐生瑞,E-mail:xushengrui@126.com;陈长坡,E-mail:andychen2005@163.com.

顶空瓶购置于上海安谱实验科技股份有限公司;DF-101S 型集热式恒温加热磁力搅拌器购置于河南省予华仪器有限公司;医用脱脂棉购置于焦作联盟医用材料股份有限公司;丙酸、异丁酸、丁酸、异戊酸、己酸、庚酸标准试剂购置于阿拉丁试剂(上海)有限公司;色谱纯甲醇购置于美国天地有限公司。

1.2 样品采集

选取足部味道较大(自我描述)的志愿者 10 名(5 名男性、5 名女性),称取 1.0 g 条状脱脂棉,裹于脚趾缝隙间,然后穿上材质相同干净无味的袜子,运动/自由活动 6 h 后,取出脱脂棉置于 40 mL 样品瓶中,并用封口膜密封,编号,冷冻保存。

1.3 实验过程

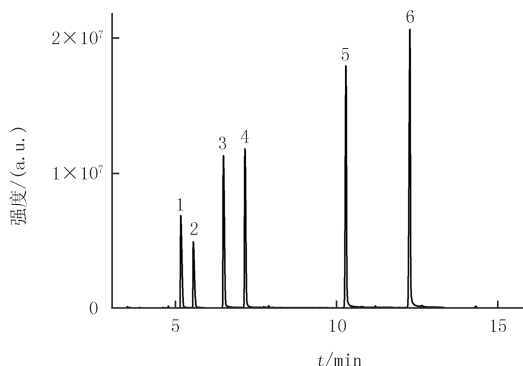
称取 1.0 g 医用脱脂棉置于 40 mL 顶空瓶中,加入一定量的短链脂肪酸标准溶液,制备成加标样品,用于优化 SPME 萃取条件及方法的建立。将制备好的加标样品/实际样品固定于恒温加热器中,插入 DVB/CAR/PDMS SPME 商用探头(使用前置于 GC-MS 进样口中 250 °C 条件下老化 10 min),在一定温度条件下,顶空萃取一定的时间,取出探头插入 GC-MS 进样口解吸分析。

GC-MS 参数为:不分流进样;进样口温度 250 °C;柱温箱升温程序:初始温度为 100 °C,以 5 °C/min 的速度升温至 180 °C。载气:高纯 He;流速:恒流,1 mL/min;四级杆温度:150 °C;离子源:EI 源;离子源温度:230 °C;接口温度:280 °C。分为 SCAN 扫描模式(50~500)和 SIM 扫描模式。

2 结果与讨论

2.1 气相色谱质谱定性定量分析条件

本文选择硝基对苯甲酸改性聚乙二醇作为固定相的 DB-FFAP 毛细管色谱柱,无需对脂肪酸进行衍生化,可以直接分离分析。从获得的 6 种短链脂肪酸标准品 GC-MS 总离子流图(图 1)中可以看到,丙酸、异丁酸、丁酸、异戊酸、己酸、庚酸 6 种短链脂肪酸得到了很好的分离,且峰型较好。由于选择离子扫描模式(SIM)具有更高的灵敏度,本文后续研究均采用 SIM 扫描模式。6 种短链脂肪酸 SIM 扫描参考离子见表 1。



1-丙酸,2-异丁酸,3-丁酸,4-异戊酸,5-己酸,6-庚酸。

图1 6种短链脂肪酸标准的GC-MS总离子流图

Fig.1 GC-MS chromatogram of 6 short-chain fatty acids standard solution

2.2 HS-SPME 条件的优化

2.2.1 温度对萃取人体足部气味中短链脂肪酸的影响

一定的温度可以促使待测物质从基质中释放到顶空部分,但是升高温度同时会降低待测物质在 SPME 探头涂层上的分配系数,只有保持特定的温度才能获得最佳的萃取效率。因此,本文首先优化了 30~70 °C 范围内萃取温度的影响。如图 2 所示,随着温度的升高,SPME 探头萃取效率呈现出先增大后降低的趋势,在 50 °C 时,萃取效率达到最大。因此,本文选择萃取温度 50 °C 进行后续研究。

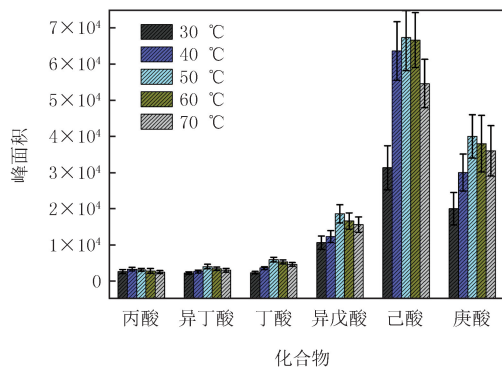
表 1 6 种短链脂肪酸的保留时间和特征离子

Tab. 1 Retention time and characteristic ions of 6 short-chain fatty acids

化合物	参考离子	定量离子	保留时间 /min
丙酸	29,45,57,74	74	5.22
异丁酸	41,43,73,88	43	5.60
丁酸	41,55,60,73	60	6.53
异戊酸	41,43,60,87	60	7.18
己酸	41,60,73,87	60	10.28
庚酸	55,60,73,87	60	12.25

2.2.2 时间对萃取人体足部气味中短链脂肪酸的影响

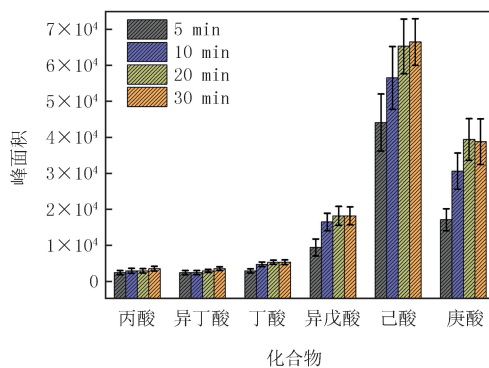
SPME 是一个动态萃取-解吸平衡过程,需要一定的时间才可达到平衡,因此本实验考察了萃取时间对制备探头涂层萃取性能的影响.图 3 为不同萃取时间(5、10、20、30 min)对萃取效率的影响,从图中可以看到,对于较易挥发物质丙酸,萃取时间为 5 min 时便可达到萃取平衡;而对于异丁酸、丁酸、异戊酸、己酸和庚酸,随着时间的增加,SPME 萃取效率逐渐增大,当萃取时间为 20 min 时,达到萃取平衡.因此本研究选择 20 min 为最佳萃取时间.



萃取时间:20 min;解析时间:2 min;SIM扫描模式.

图2 温度对萃取人体足部气味中短链脂肪酸的影响

Fig.2 Effect of temperature on extraction efficiency towards short-chain fatty acids in foot odor



萃取温度:50 °C;解析时间:2 min;SIM扫描模式.

图3 时间对人体足部气味中短链脂肪酸的影响

Fig.3 Effect of extraction time on extraction efficiency towards short-chain fatty acids in foot odor

2.2.3 解析时间对萃取人体足部气味中短链脂肪酸的影响

本文同时考察了 SPME 探头在 GC-MS 进样口解析时间的影响,结果发现在研究的解析时间范围内(1~5 min),分析结果没有明显的变化,表明在 GC-MS 进样口温度为 250 °C 条件下,短链脂肪酸极易解吸.本文选择解析时间为 2 min 进行后续研究.

2.3 方法学论证

2.3.1 方法精密度和加标回收率

以医用脱脂棉为基质,通过添加一定浓度的短链脂肪酸混标溶液,制成 25 ng 的加标样品,采用建立的顶空固相微萃取-气相色谱质谱方法,平行测定 9 次,计算其相对标准偏差(RSD),评价方法精密度.结果表明丙酸、异丁酸、丁酸、异戊酸、己酸和庚酸的 RSD($n = 9$)分别为:9.81%、16.77%、11.03%、13.52%、19.77%、16.92%;该方法分析 6 种短链脂肪酸的精密度(RSD)均小于 20%.该方法对 6 种短链脂肪酸的加标回收率分别为 92.5%(丙酸)、94.0%(异丁酸)、115.4%(丁酸)、109.1%(异戊酸)、120.9%(己酸)和 118.7%(庚酸).

2.3.2 方法线性范围、检出限和定量限

在最佳萃取分析条件下,本文研究了所建立方法的线性范围、方法检出限(LODs)和定量限(LQDs),结果列于表 2 中.结果表明在线性范围为 0.25~50.00 ng 范围内,6 种短链脂肪酸均呈现出较好的线性,其线性系数(R^2)在 0.941 2~0.997 2 之间;通过计算其方法检出限(3 倍信噪比)和定量限(10 倍信噪比),6 种短链脂肪酸方法检出限为 0.017~0.096 ng,方法定量限在 0.06~0.32 ng 之间.

2.4 不同测定挥发性有机物分析方法的对比

为了突出本方法在分析挥发性有机物方面的优势,本文对比分析了其他样品前处理、检测方法的性能(表 3).结果表明本文所建立的顶空固相微萃取-气相色谱质谱法与其他几种分析方法相比,样品预处理的步骤简单,无须进行溶剂萃取,避免了二次污染,且该方法的灵敏度高,检出限低,可更好地应用于实际样品分析.

2.5 实际样品分析

本文采用建立的方法分别对 10 名志愿者(5 名男性、5 名女性)的左右脚短链脂肪酸进行了分析,结果见

表4.分析结果发现,本方法可以获得人体足部的短链脂肪酸含量信息.短链脂肪酸(尤其是异戊酸)作为足部气味的主要贡献者,产生的主要原因是人体新陈代谢过程中通过汗腺分泌的亮氨酸、缬氨酸等物质在葡萄球菌作用下生成的^[2,18-19].通过对比分析男性、女性足部短链脂肪酸测定结果发现,男性足部生成的短链脂肪酸总量(左右脚含量之和)普遍大于女性足部中的短链脂肪酸总量(图4所示),说明相对于女性,男性由于运动量大,足部分泌物较多,更易滋生细菌.

表2 方法线性范围、检出限和定量限

Tab. 2 Method linear range, limits of detection and limits of quantitation

化合物	线性范围 /ng	线性系数(R^2)	方法检出限 /ng	方法定量限 /ng
丙酸	0.25~50.00	0.941 3	0.096	0.32
异丁酸	0.25~50.00	0.997 0	0.058	0.19
丁酸	0.25~50.00	0.980 5	0.036	0.12
异戊酸	0.25~50.00	0.997 2	0.018	0.06
己酸	0.25~50.00	0.990 2	0.017	0.06
庚酸	0.25~50.00	0.994 4	0.032	0.11

表3 不同测定挥发性有机物分析方法的对比

Tab. 3 Comparisons of various methods in the determination of volatile organic compounds

分析对象	样品前处理方法	检测仪器	线性范围	方法检出限	参考文献
人体气味中4种脂肪酸	搅拌棒吸附	GC-MS	20~180 ng	3.2~7.5 ng	[6]
人体足部气味中短链脂肪酸	盐酸酸化、乙醚萃取	GC-MS	—	120~1 300 ng	[19]
人体唾液中短链脂肪酸	乙醇-盐酸溶液涡旋振荡、离心	GC-FID	0.2~2 039.0 mg/L	0.060~0.198 mg/L	[7]
粪便、发酵液中短链脂肪酸	盐酸酸化、乙醚萃取	UPLC	0.115~14.600 g/L	0.011 5~0.059 2 g/L	[20]
血液中的挥发性有机物	吹扫捕集	GC-MS	0.023~5.920 μ g/L	0.012~0.046 μ g/L	[21]
人体足部气味中短链脂肪酸	顶空固相微萃取	GC-MS	0.25~50.00 ng	0.017~0.096 ng	本方法

表4 实际样品分析结果

Tab. 4 Analysis results of real samples

	1		2		3		4		5	
	左	右	左	右	左	右	左	右	左	右
丙酸	7.96±0.53	9.93±0.48	5.22±0.15	5.03±0.29	7.86±0.53	4.78±0.28	ND	ND	ND	10.07±0.22
异丁酸	3.98±0.51	5.39±0.37	4.52±0.33	3.91±0.43	3.12±0.49	2.90±0.32	3.89±0.39	2.47±0.23	3.01±0.18	3.64±0.44
丁酸	4.21±0.46	7.02±0.25	3.77±0.47	3.83±0.35	2.99±0.36	2.83±0.55	3.37±0.46	2.33±0.45	3.29±0.44	3.04±0.36
异戊酸	2.93±0.38	5.01±0.34	2.37±0.56	2.70±0.21	2.81±0.29	2.86±0.31	5.74±0.36	5.59±0.53	4.67±0.37	4.03±0.52
己酸	4.58±0.35	10.19±0.42	4.33±0.36	4.38±0.18	5.07±0.33	4.25±0.21	4.47±0.37	4.02±0.31	4.20±0.48	4.17±0.37
庚酸	5.00±0.26	14.62±0.55	4.84±0.24	4.96±0.23	5.97±0.27	4.81±0.34	4.98±0.28	4.98±0.36	4.62±0.52	4.60±0.28
	6		7		8		9		10	
	左	右	左	右	左	右	左	右	左	右
丙酸	0.38±0.05	1.01±0.24	1.15±0.28	1.60±0.22	0.53±0.13	ND	3.31±0.33	3.57±0.27	1.14±0.22	0.93±0.18
异丁酸	2.11±0.11	2.56±0.33	1.80±0.24	1.27±0.31	2.58±0.25	2.83±0.45	2.01±0.18	1.92±0.43	2.26±0.13	2.38±0.32
丁酸	2.83±0.23	4.89±0.41	2.52±0.31	1.80±0.33	3.52±0.22	3.40±0.21	2.74±0.24	2.62±0.23	2.96±0.33	3.68±0.43
异戊酸	2.62±0.32	3.91±0.45	3.28±0.11	3.03±0.20	2.63±0.36	2.97±0.35	2.33±0.35	2.43±0.35	4.20±0.29	3.29±0.36
己酸	4.12±0.16	4.10±0.34	4.09±0.24	4.08±0.22	4.22±0.36	4.13±0.33	4.10±0.24	4.09±0.28	4.10±0.26	4.10±0.21
庚酸	5.13±0.42	4.56±0.35	ND	4.57±0.32	4.55±0.11	4.58±0.39	4.54±0.43	4.54±0.12	4.56±0.39	4.51±0.31

注:1~5为男性,6~10为女性;ND代表未检出.

3 结 论

本文通过优化萃取条件,建立了基于固相微萃取技术顶空分析人体足部气味物质短链脂肪酸的方法.该方法集萃取、浓缩、解吸、进样于一体,灵敏度高、操作简便,萃取分析过程中无须使用有机溶剂,避免了二次污染,成功应用于人体足部气味分析,且可拓展到人体其他部位皮肤气味分析.采用建立的方法对实际样品分析,获取了10名志愿者足部6种短链脂肪酸(丙酸、异丁酸、丁酸、异戊酸、己酸、庚酸)的含量,为人体足部气味与细菌、新陈代谢分泌物之间的作用机制研究提供了有效的基础数据,同时也可有效去除足部气味研究提供了支撑.

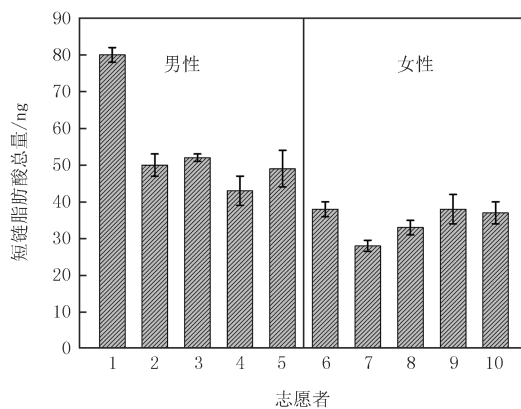


图4 10位志愿者短链脂肪酸总量对比图

Fig.4 Comparison of total amounts of short-chain fatty acids for 10 volunteers

参 考 文 献

- [1] TROCCAZ M, BENATTIA F, BORCHARD G, et al. Properties of recombinant *Staphylococcus haemolyticus* cystathionine beta-lyase (metC) and its potential role in the generation of volatile thiols in axillary malodor[J]. *Chemistry & Biodiversity*, 2008, 5(11): 2372-2385.
- [2] STEVENS D, CORNMELL R, TAYLOR D, et al. Spatial variations in the microbial community structure and diversity of the human foot is associated with the production of odorous volatiles[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2015, 91(1): 1-11.
- [3] 陈长坡, 李宁, 徐生瑞, 等. 健康人体足部挥发性物质形成及分析研究进展[J]. *河南师范大学学报(自然科学版)*, 2019, 47(6): 57-64.
CHEN C P, LI N, XU S R, et al. Research progress of healthy human foot volatiles origins and analysis[J]. *Journal of Henan Normal University(Natural Science Edition)*, 2019, 47(6): 57-64.
- [4] JAMES A G, COX D, WORRALL K. Microbiological and biochemical origins of human foot malodour[J]. *Flavour and Fragrance Journal*, 2013, 28(4): 231-237.
- [5] KANDA F, YAGI E, FUKUDA M, et al. Elucidation of chemical compounds responsible for foot malodour[J]. *British Journal of Dermatology*, 1990, 122(6): 771-776.
- [6] 龙成生, 吴德华, 王辛, 等. 气相色谱-质谱法测定人体气味中4种脂肪酸[J]. *化学分析计量*, 2017, 26(3): 37-41.
LONG C S, WU D H, WANG X, et al. Determination of 4 fatty acids in human body odor with GC-MS[J]. *Chemical Analysis and Meterage*, 2017, 26(3): 37-41.
- [7] 赵晓亚, 王跃飞, 杨帆, 等. 气相色谱法快速分析人唾液中7种短链脂肪酸[J]. *分析化学*, 2016, 44(7): 1009-1014.
ZHAO X Y, WANG Y F, YANG F, et al. Rapid analysis of seven short-chain fatty acids in human saliva by gas chromatography[J]. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2016, 44(7): 1009-1014.
- [8] DORMONT L, BESSIERE J M, MCKEY D, et al. New methods for field collection of human skin volatiles and perspectives for their application in the chemical ecology of human-pathogen-vector interactions[J]. *The Journal of Experimental Biology*, 2013, 216: 2783-2788.
- [9] PANDEY S K, KIM K H. Human body-odor components and their determination[J]. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2011, 30(5): 784-796.
- [10] AGAPIOU A, AMANN A, MOCHALSKI P, et al. Trace detection of endogenous human volatile organic compounds for search, rescue and emergency applications[J]. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2015, 66: 158-175.
- [11] ARTHUR C L, PAWLISZYN J. Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers[J]. *Analytical Chemistry*, 1990, 62(19): 2145-2148.
- [12] PIRI-MOGHADAM H, AHMADI F, PAWLISZYN J. A critical review of solid phase microextraction for analysis of water samples[J]. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2016, 85: 133-143.
- [13] XU J Q, CHEN G S, HUANG S Y, et al. Application of in vivo solid-phase microextraction in environmental analysis[J]. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2016, 85: 26-35.

- [14] SOUZA-SILVA é A, GIONFRIDDO E, PAWLISZYN J. A critical review of the state of the art of solid-phase microextraction of complex matrices II. Food analysis[J]. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2015, 71: 236-248.
- [15] WANG C H, SU H, CHOU J H, et al. Solid phase microextraction combined with thermal-desorption electrospray ionization mass spectrometry for high-throughput pharmacokinetics assays[J]. Analytica Chimica Acta, 2018, 1021: 60-68.
- [16] 毕鹏禹, 齐婧, 吴昱, 等. 固相微萃取技术在环境污染物检测中的应用[J]. 理化检验-化学分册, 2015, 51(10): 1487-1492.
BI P Y, QI J, WU Y, et al. Application of solid phase micro-extraction in inspection of environmental pollutants[J]. Physical Testing and Chemical Analysis (Part B: Chemical Analysis), 2015, 51(10): 1487-1492.
- [17] ZHANG Z M, CAI J J, RUAN G H, et al. The study of fingerprint characteristics of the emanations from human arm skin using the original sampling system by SPME-GC/MS[J]. Journal of Chromatography B, 2005, 822(1/2): 244-252.
- [18] ARA K, HAMA M, AKIBA S, et al. Foot odor due to microbial metabolism and its control[J]. Canadian Journal of Microbiology, 2006, 52(4): 357-364.
- [19] CAROPRESE A, GABBANINI S, BELTRAMINI C, et al. HS-SPME-GC-MS analysis of body odor to test the efficacy of foot deodorant formulations[J]. Skin Research and Technology, 2009, 15(4): 503-510.
- [20] 陈和地, 任怡琳, 耿燕, 等. 基于超高效液相色谱法快速测定短链脂肪酸方法的建立[J]. 生物加工过程, 2019, 17(4): 365-371.
CHEN H D, REN Y L, GENG Y, et al. Analysis of short chain fatty acids by ultra-performance liquid chromatography[J]. Chinese Journal of Bioprocess Engineering, 2019, 17(4): 365-371.
- [21] 马俊华, 董长征, 张海燕, 等. 吹扫捕集-气相色谱质谱法测定血液中 13 种挥发性有机物[J]. 中国卫生检验杂志, 2017, 27(18): 2603-2605.
MA J H, DONG C Z, ZHANG H Y, et al. Purge and trap-gas chromatography/mass spectrometry for the determination of 13 volatile organic compounds in blood[J]. Chinese Journal of Health Laboratory Technology, 2017, 27(18): 2603-2605.

Determination of short-chain fatty acids in foot odor by head space solid phase microextraction coupling gas chromatography mass spectrometry

Dong Panlong¹, Xu Shengrui¹, Hu Zongjie², Li Ning², Li Shijie², Chen Changpo¹

(1. School of Chemistry and Chemical Engineering, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China;

2. Henan Boni Biological Engineering Co., Ltd., Xinxiang 453000, China)

Abstract: Short-chain fatty acids are main components of human foot odor. Development of methodology for analyzing the content of short-chain fatty acids could help to reveal the mechanism between human metabolites and foot microbes. Furthermore, it can contribute to deodorization research of the feet. In this paper, a headspace solid-phase microextraction (HS-SPME) coupling gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) method was developed for determination of propionic acid, isobutyric acid, butyric acid, isovaleric acid, hexanoic acid and heptanoic acid in human foot odor. The extraction conditions were investigated, with resulting that the optimum conditions for SPME were 20 min for extraction time, 50 °C for extraction temperature and 2 min for desorption time. The linear range of six short-chain fatty acids for developed method was 0.25~50.00 ng ($0.9412 \leq R^2 \leq 0.9972$), recovery was from 92.5% to 120.9%. The limit of detection was 0.017~0.096 ng, and limit of quantitation ranged from 0.06 to 0.32 ng. RSD ($n=9$) was less than 20% for all studied short-chain fatty acids. This method was applied in foot odor analysis of 10 volunteers and satisfactory results were obtained.

Keywords: foot odor; short-chain fatty acids; SPME; GC-MS

[责任编辑 赵晓华 陈留院]