恩诺沙星分子印迹聚合物膜的制备及吸附性能研究

吕春晖[1,2]，方国臻[2]，王硕[2]
（1.天津现代职业技术学院生物工程学院，天津 300350）
（2.天津科技大学食品工程与生物技术学院，天津 300222）

摘要：采用表面印迹法，以恩诺沙星为模板，甲基丙烯酸（MAA）为功能单体，乙二醇二甲基丙烯酸酯（EDMA）为交联剂，在聚苯乙烯酶标板表面直接合成恩诺沙星分子印迹聚合物膜。通过傅立叶红外光谱分析、电镜扫描、吸附平衡结合实验、Scatchard方程分析及吸附动力学实验对恩诺沙星印迹聚合物膜进行性能表征。合成的分子印迹聚合物膜具有很好的印迹效果，对恩诺沙星有较高的特异性吸附，且传质速率快，由Scatchard方程分析可知，聚合物膜中含有两类吸附位点，其中高亲和力位点的平衡解离常数（K_d）为19.49 μg/mL，饱和吸附容量（Q_{max}）为12.98 μg/mL，低亲和力位点的K_d为277.78 μg/mL，Q_{max}为98.14 μg/mL，吸附位点的异质性并不会影响聚合物膜应用于竞争性免疫吸附分析。通过该方法合成的恩诺沙星特异性识别聚合物膜可以作为仿生抗体，应用于竞争性免疫吸附分析检测恩诺沙星在食品中的残留。

关键词：恩诺沙星；分子印迹聚合物膜；表面印迹法；吸附性能
文章篇号：1673-9078（2017）11-134-139 DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2017.11.020

Preparation and Adsorption Properties of Enrofloxacin MolecularImprinted Polymer Film

LV Chun-hui[1,2], FANG Guo-zhen[2], WANG Shuo[2]
(1.Tianjin Modern Vocational Technology College Department of Biochemical Engineering, Tianjin 300350, China)
(2.Tianjin University of Science & Technology College of Food Engineering and Biotechnology, Tianjin 300222, China)

Abstract: The enrofloxacin molecular imprinted polymer film was directly synthesized on the surface of polystyrene microtiter plate by surface imprinting technique using the enrofloxacin (ENRO) as template, methacrylic acid (MAA) as functional monomer and ethyleneglycol dimethacrylate (EDMA) as cross-linker. The enrofloxacin molecular imprinted polymer film was characterizedby FT-IR, scanning electron microscope, adsorption-equilibrium experiments, scatchard analysis and adsorption kinetic experiments. The results showed that the imprinted film exhibited good imprinting effect, high specific adsorption ability and fast mass transfer rate. Scatchard analysis indicated that the imprinted film contained two types of binding sites with specific binding properties. The dissociation constant (K_d) and maximum binding capacity (Q_{max}) of the two linear curves were 19.49μg/mL, 12.98 μg/mL for the higher affinity sites and 277.78 μg/mL, 98.14 μg/mL for the lower affinity sites, respectively, and the heterogeneous of MIP could be ignored in MIAs. The enrofloxacin- specific polymer film synthesized by the proposed method could be used as a biomimetic antibody to determine the enrofloxacin residues in food by competitive immunosorbent assay.

Key words: enrofloxacin; molecular imprinted polymer film; surface imprinting; absorption ability

恩诺沙星（enrofloxacin，ENRO）化学名为1-环丙基-7-（4-乙基-1-哌嗪基）-6-氟-1,4-二氢-4-氧代-3-喹啉羧酸，分子式为$C_{19}H_{22}FN_3O_3$，是氟喹诺酮类药物中第一个畜禽专用兽药，广泛应用于畜禽产品及水产品的细菌性疾病治疗，但是由于我国可食性动物养殖的相关法律法规相对于发达国家尚不完善，且养殖过程与方式有待严格规范，存在用量过大和违反休药期等不合理用药现象，不合理用药不仅会给动物机体造成伤害，更严重的是在动物体内残留的药物及其代谢物经过食物链进入人体从而对人体造成很大危害[1]。美国食品药品监督管理局（FDA）已经禁止恩诺沙星用于可食性动物养殖[2]，欧盟、日本及我国尚未禁止使用，但也对其在动物食品的最高残留限量（MRLs）作了规定[3]。

目前用于食品中恩诺沙星残留检测的方法有微生物法[4,5]、高效液相色谱法[6,7]、液相色谱-质谱联用法[8,9]、毛细管电泳法[10]和免疫分析法[11,12]等。传统检测

收稿日期：2017-05-26
作者简介：吕春晖（1987-），女，讲师，硕士研究生，研究方向：药物分析
通讯作者：王硕（1969-），男，博士，教授，研究方向：食品安全

方法存在着难以克服的一些问题，比如样品前处理复杂、技术操作复杂、耗时长及成本高等，且在准确度、重现性等方面有待提高。分子印迹技术通过形成的分子印迹聚合物对模板分子具有特异性的吸附与识别，能够弥补传统检测方法的不足，在模拟酶及抗体、手性物质分离、仿生传感器[13,14]、色谱分离和固相萃取[15,16]等领域得到广泛应用。本研究利用表面印迹法，在聚苯乙烯酶标板表面合成高特异选择性的恩诺沙星印迹聚合物膜（以下简称 MIP 膜），表面分子印迹技术把分子识别位点建立在印迹材料的表面，质子转移速度加快，吸附动力学提高，吸附位点更容易接近，利于蛋白质、大分子探针对特异性吸附位点的结合，未来可作为仿生抗体应用于酶联免疫吸附测定法检测肉制品中恩诺沙星的微量残留。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

仪器：Cary 50-Bio 紫外可见分光光度计（澳大利亚 Victoria 公司）、QL-901 型振荡器（海门市其林贝尔仪器制造有限公司）、Vector 22 傅立叶变换红外光谱仪（布鲁克仪器公司）、SS-550 扫描电镜（日本岛津公司）、SHB-IV 双 A 循环水式多用真空泵（郑州长城科工贸有限公司）、96 孔酶标板（丹麦 Nunc 公司）、单道微量可调移液器和 8 道微量可调移液器（法国 Gilson 公司）。

试剂：恩诺沙星（99.9%，中国药品生物制品检定所）、甲基丙烯酸（MAA，分析纯，天津市北方天医化学试剂厂）、甲基丙烯酸羟乙酯（HEMA，分析纯，天津市北方天医化学试剂厂）、乙二醇二甲基丙烯酸酯（EDMA，分析纯，美国 Sigma 公司）、偶氮二异丁腈（AIBN，化学纯，上海试四赫维化工有限公司）、甲醇、乙腈（色谱纯，天津市康科德科技有限公司）、甲醇、甲苯、冰醋酸（分析纯，天津市北方天医化学试剂厂）。

1.2 恩诺沙星分子印迹聚合物膜的制备

准确称取 0.360 g（1 mmol）模板分子恩诺沙星固体粉末，加入 4 mL 溶剂（甲醇/甲苯，3:1，*V/V*），磁力搅拌至恩诺沙星固体粉末均匀溶解，缓慢滴加 340 μL （4 mmol）功能单体 MAA，室温下磁力搅拌 2 h 以使模板分子与功能单体充分自组装形成模板分子-功能单体复合物，随后缓慢滴加 540 μL （3 mmol）交联剂 EDMA，磁力搅拌 30 min 后，加入 50 mg 引发剂 AIBN，待其完全溶解，将圆底烧瓶放入超声清洗器中脱气 5 min。然后用微量移液器将预聚合溶液加入到聚苯乙烯酶标板表面，每孔 50 μL，放置于真空干燥箱中 45 ℃热引发聚合 12 h，取出放置于 500 mL 烧杯中，以甲醇-冰乙酸（9:1，*V/V*）连续超声振荡洗脱 12 h（换三次洗脱液）至洗脱液中无恩诺沙星检测出来即为洗脱干净，经 37 ℃干燥，即得到恩诺沙星 MIP 膜。

作为对照，非印迹聚合物膜（简称 NIP 膜）在同样的制备条件与步骤下合成，除了不添加模板分子恩诺沙星。

1.3 恩诺沙星分子印迹聚合物膜的表征

1.3.1 红外光谱分析

为了初步确定 MIP 膜的合成情况，推断模板分子与功能单体键合情况以及模板分子的洗脱效果，对模板分子恩诺沙星、恩诺沙星 MIP 膜、NIP 膜以及洗脱后的 MIP 膜进行扫描获得红外光谱图。

1.3.2 电镜扫描结构分析

为了更为直观的分析 MIP 膜与 NIP 膜的形态结构，分别在电镜扫描下进行图像观察。

1.4 分子印迹聚合物膜对恩诺沙星的结合性能

1.4.1 紫外分光光度计测试条件的确定

为了确定恩诺沙星在紫外光下的最大吸收波长，配制 2、6、10 mg/L 的恩诺沙星标准溶液，依次用紫外分光光度计进行全波长扫描，选择合适的最大吸收紫外波长。

1.4.2 吸附平衡结合实验

考虑到 MIP 膜可以作为仿生抗体应用于 ELISA，选择磷酸盐缓冲溶液（1×PBS）作为吸附溶剂，将恩诺沙星储备溶液稀释为从 5~100 mg/L 的 ENRO-PBS 溶液，分别加入到聚苯乙烯酶标板各孔中（200 μL/well），使溶液中的恩诺沙星充分吸附到聚合物膜上。吸取各孔上清液在最大吸收波长处（λ=270 nm）测定吸光度值，并根据公式（1）计算吸附容量 Q（μg/mL），绘制吸附容量曲线。同时进行非印迹聚合物膜对恩诺沙星的吸附平衡结合实验。

$$Q=(C_0-C_t)V_S/V_M \quad (1)$$

式中，C_0（mg/L）为 ENRO-PBS 溶液的初始浓度，C_t（mg/L）为上清液中恩诺沙星浓度，V_S（mL）为溶液初始体积，V_M（mL）为聚合物膜的体积。

1.4.3 吸附动力学实验

为了评价所合成的 MIP 膜的传质速度，在各孔加

入 200 μL 40 mg/L 的 ENRO-PBS 溶液，室温下分别振摇 5~80 min，分别测定上清液的吸光度值，根据公式（1）计算吸附容量，绘制吸附动力学曲线。

1.5 数据统计分析

所有的测量数据都重复测量三次，结果用平均值和标准偏差来表示，采用 Scatchard 分析来评价分子印迹聚合物对模板分子的结合特性，并确定平衡键合常数以及键合位点数目。

2 结果

2.1 制备恩诺沙星分子印迹聚合物膜的条件优化

表 1 反应溶剂的选择

Table 1 Various solvent for the preparation of polymers

聚合物	ENRO 用量/mg	MAA 用量/mL	EDMA 用量/mL	甲醇用量/mL	甲苯用量/mL	吸附容量/(mg/L)
MIP_1	0.360	0.340	0.540	3.00	0.00	9.28±0.32
NIP_1	0.000	0.340	0.540	3.00	0.00	5.37±0.22
MIP_2	0.360	0.340	0.540	3.00	1.00	25.39±0.47
NIP_2	0.000	0.340	0.540	3.00	1.00	10.54±0.36
MIP_3	0.360	0.340	0.540	3.00	2.00	12.68±0.37
NIP_3	0.000	0.340	0.540	3.00	2.00	7.60±0.30
MIP_4	0.360	0.340	0.540	6.00	1.00	5.56±0.20
NIP_4	0.000	0.340	0.540	6.00	1.00	3.79±0.17
MIP_5	0.360	0.340	0.540	8.00	1.00	无
NIP_5	0.000	0.340	0.540	8.00	1.00	无

表 2 功能单体的选择

Table 2 Selection of functional monomer

聚合物	ENRO 用量/g	MAA 用量/mL	HEMA 用量/mL	EDMA 用量/mL	吸附容量/(mg/L)
MIP_1	0.360	0.340	0.000	0.540	25.39±0.56
NIP_1	0.000	0.340	0.000	0.540	10.54±0.38
MIP_2	0.360	0.000	0.520	0.540	7.94±0.29
NIP_2	0.000	0.000	0.520	0.540	5.89±0.22
MIP_3	0.360	0.260	0.130	0.540	6.91±0.33
NIP_3	0.000	0.260	0.130	0.540	4.00±0.17
MIP_4	0.360	0.170	0.260	0.540	3.47±0.13
NIP_4	0.000	0.170	0.260	0.540	1.74±0.16

表 3 模板分子、功能单体和交联剂配比的优化

Table 3 Optimization of the ratios of template molecule, functional monomer, cross-linker for the preparation of polymers

聚合物	ENRO 用量/g	MAA 用量/mL	EDMA 用量/mL	AIBN 用量/mg	吸附容量/(mg/L)
MIP_1	0.360	0.340	0.540	50	25.39±0.48
NIP_1	0.000	0.340	0.540	50	10.54±0.35
MIP_2	0.360	0.340	0.180	50	13.61±0.39
NIP_2	0.000	0.340	0.180	50	8.45±0.32
MIP_3	0.360	0.260	0.540	50	11.82±0.30
NIP_3	0.000	0.260	0.540	50	7.51±0.33
MIP_4	0.360	0.260	0.180	50	9.12±0.28
NIP_4	0.000	0.260	0.180	50	4.66±0.24

功能单体、交联剂以及反应溶剂的种类选择以及用量比例都会对最终形成的 MIP 膜的吸附性能有较大影响，吸能性能大小取决于 MIP 膜与 NIP 膜对恩诺沙星的吸附容量及差值大小，通过实验考察不同种类反应溶剂、功能单体以及模板分子与功能单体和交联剂的不同比例，结果表明，以 MAA 作为单一功能单体，3 mL 甲醇和 1 mL 甲苯作为混合溶剂，模板分子:功能单体:交联剂的摩尔比为 1:4:3 时，MIP 膜有最高吸附容量，而且与对应的 NIP 膜相比差值最大，说明印迹效果更好，吸附性能与识别性更强，见表 1~3。

2.2 恩诺沙星分子印迹聚合物膜的表征

2.2.1 傅立叶红外光谱分析

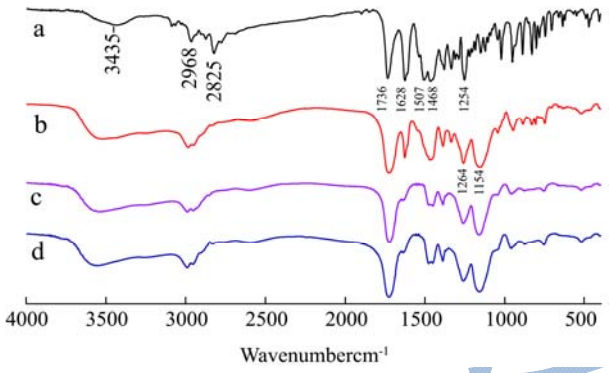


图 1 红外光谱图

Fig.1 FT-IR spectra

注：a，恩诺沙星；b，恩诺沙星印迹聚合物膜洗脱前；c，恩诺沙星印迹聚合物膜洗脱后；d，非印迹聚合物膜。

如图 1，c（洗脱后 MIP 膜）和 d（NIP 膜）的峰型和大小基本一致；b~d 中的 1264 cm^{-1} 和 1154 cm^{-1} 处吸收峰为 MAA-EDMA 交联形成的酯的 C-O 的对称与不对称振动；a 中 2825 cm^{-1}、1254 cm^{-1} 和 1468 cm^{-1} 特征峰分别为恩诺沙星结构中的-CH_2-的伸缩振动、剪切振动和 C-F 的伸缩振动，在 b 中没有明显的峰形，是由于恩诺沙星与 MAA 的结合使得出现峰的交叠现象。综上所述，可以初步确定恩诺沙星已洗脱干净，而且恩诺沙星、MAA 和 EDMA 相互之间成功交联聚合。

2.2.2 电镜扫描

图 2 为恩诺沙星 MIP 膜与 NIP 膜的电镜扫描图，对聚合物膜的形态结构进行直观分析。如图所示，MIP 膜表面形成了三维立体孔穴结构，而 NIP 膜表面是不规则的块状，说明模板分子参与了合成印迹过程。

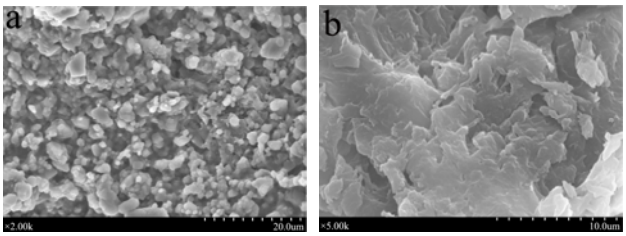


图 2 恩诺沙星印迹 a 与非印迹膜 b 的扫描电镜图

Fig.2 SEM images of ENRO imprinted film a and non-imprinted film b

2.3 恩诺沙星分子印迹聚合物膜的吸附性能

2.3.1 分子印迹聚合物膜对恩诺沙星的吸附平衡结合实验

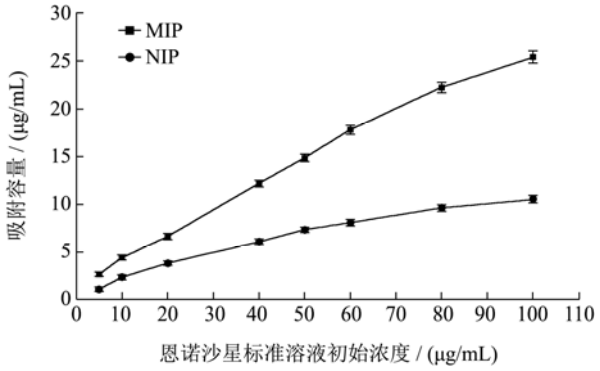


图 3 恩诺沙星 MIP 膜和 NIP 膜的吸附容量曲线

Fig.3 Adsorption capacity curves of ENRO imprinted film and non-imprinted film

为了评价 MIP 膜对恩诺沙星的吸附结合能力，分别建立了 MIP 膜与 NIP 膜对恩诺沙星标准溶液的吸附容量曲线，比较两者吸附容量大小。从图 3 中可以看出，MIP 膜与 NIP 膜的吸附容量均随着吸附溶剂中恩诺沙星浓度的增加而增大，在同样的浓度下，MIP 膜的吸附容量大于 NIP 膜，而且随浓度增加而增长的幅度大于 NIP 膜。在浓度为 5 μg/mL 时，MIP 膜的吸附容量（2.663±0.20 μg/mL）即能达到 NIP 膜（1.093±0.17 μg/mL）的 2 倍。

2.3.2 Scatchard 方程分析

分子印迹技术研究过程中，常采用 Scatchard 模型来评价分子印迹聚合物对模板分子的结合特性，见公式（2）。

$$Q/C=（Q_{max}-Q）/K_d \quad （2）$$

式中，Q（μg/mL）为各浓度吸附溶剂中聚合物对模板分子的平衡吸附容量；C（μg/mL）为吸附溶剂中恩诺沙星浓度；K_d（μg/mL）为结合位点的平衡解离常数；Q_{max}（μg/mL）为结

合位点的饱和吸附容量。

以 Q/C 对 Q 作图，即可得出 K_d 和 Q_{max} 的值。结果如图 4：MIP 膜得到的 Scatchard 图是非线性的，说明合成的 MIP 膜中的吸附位点为异质性，这是由于非共价聚合方式容易产生吸附性、选择性不同的吸附位点。聚合物膜存在两类不同的吸附位点，一类为结合力强的高亲和力位点，K_d 为 19.49 μg/mL，Q_{max} 为 12.98 μg/mL，另一类为结合力弱的低亲和力点，K_d 为 277.78 μg/mL，Q_{max} 为 98.14 μg/mL。吸附位点的异质性曾经被认为会阻碍分子印迹技术的应用发展，但是实际证明，这点在免疫吸附分析中可以被忽略，这是因为竞争性免疫吸附优先发生在结合能力强的高吸附位点，待高吸附位点饱和后再竞争结合低吸附位点。

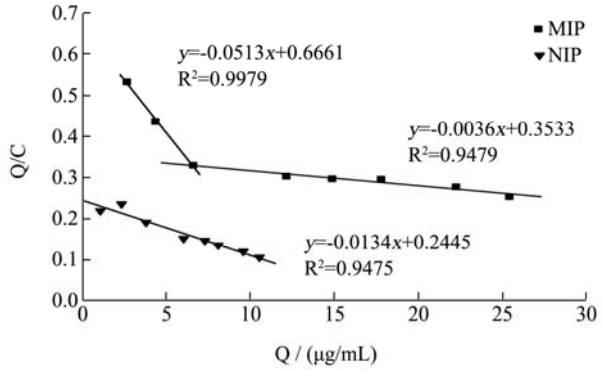


图4 恩诺沙星印迹聚合物膜与非印迹聚合物膜的Scatchard分析曲线

Fig.4 Scatchard plot of ENRO imprinted film and non-imprinted film

2.3.3 分子印迹聚合物膜对恩诺沙星的吸附动力学实验

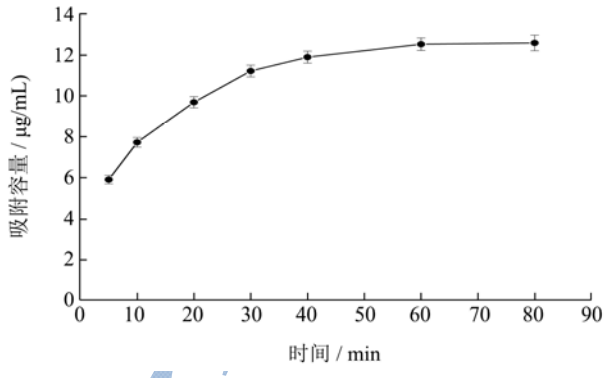


图 5 印迹聚合物膜对模板分子恩诺沙星的吸附动力学曲线

Fig.5 Absorption kinetic curve of the imprinted film on the template molecule of ENRO

为了考察 MIP 膜的传质速率，建立了 MIP 膜对恩诺沙星（40 μg/mL）的吸附动力学曲线。由图 5 可知，制备的 MIP 膜对恩诺沙星有较快的吸附速率，吸附时间在 10 min 时，即达到平衡吸附容量的 60%，40 min 时达到平衡吸附容量的 95%，60 min 时则基本达到平衡吸附容量。快速的吸附动力学是得益于表面分子印迹合成法，吸附位点位于 MIP 膜的表面，避免了模板分子吸附过程中向聚合物内部传质的过程，缩短了分析时间，这使得合成的 MIP 膜在免疫吸附分析中的应用有很大优势。

3 结论

3.1 本实验合成的恩诺沙星 MIP 膜具有较高的吸附容量和较快的传质速率，吸附位点具有异质性。分子印迹聚合物应用于免疫吸附分析不同于 SPE、色谱分析，后者方法的定性定量决定于特异性吸附与非特异性吸附的总和，依赖于所有的结合位点，而且后者使用 MIP 的用量比较大。因此，本实验合成的聚合物膜可以作为仿生抗体应用于直接竞争 ELISA 分析。

3.2 分子印迹聚合物的未来发展方向仍然是针对聚合物的制备方法，由于分子印迹聚合物的合成过程需要对多个条件因素进行优化，尚无统一、直观的合成方法来制备出无论从形态、多孔性、吸附位点的同质性和可接近性都更加完善、合理的聚合物，通过研究新型分子印迹聚合物的合成方法，是未来推动分子印迹技术应用于更多领域的重点。此外，分子印迹聚合物的合成过程基本上在有机溶剂中进行才能得到较好的印迹效果，如何更好的使分子印迹聚合物在水相中合成与吸附，是有助于分子印迹聚合物与天然生物分子相媲美的关键。

参考文献

[1] Hwang Y H, Kim M S, Song B, et al. Altered pharmacokinetics of enrofloxacin in experimental models of hepatic and renal impairment [J]. Veterinary Research Communications, 2009, 33(5): 481-487

[2] Withdrawal of approval of the new animal drug application for enrofloxacin in poultry docket No. 2000N-1571 [S]. Department of Health and Human Services, U.S. Food and Drug Administration, USA, 28 July 2005, p. 22

[3] EU Commission Regulation No. 37/2010, off. J. Eur. Communities [S]. European Communities, 2010

[4] 胡鲲,李怡,朱泽闻,等.微生物显色法快速检测水产品中恩诺沙星残留[J].上海海洋大学学报, 2009,18(4):472-47
HU Kun, LI Yi, ZHU Ze-wen, et al. A rapid method to determine the residues of enrofloxacin in fishery products by microbiological chromotes [J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2009, 18(4): 472-47

[5] Dang P K, Degand G, Danyi S, et al. Validation of a two-plate microbiological method for screening antibiotic residues in

shrimp tissue [J]. Analytical Chimica Acta, 2010, 672: 30-39

[6] 徐刚,王周芹,宋禾,等.猪排泄物中恩诺沙星和环丙沙星含量的 HPLC 检测方法[J].中国畜牧兽医,2016,43(4):1058-1065
XU Gang, WANG Zhou-qin, SONG He, et al. Method for determination of enrofloxacin and ciprofloxacin in pig excreta by HPLC [J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2016, 43(4): 1058-1065

[7] Evaggelopoulou E N, Samanidou V F. HPLC confirmatory method development for the determination of seven quinolones in salmon tissue (*Salmo salar* L.) validated according to the European Union Decision 2002/657/EC [J]. Food Chem., 2013, 136(2): 479-484

[8] 赵建,吕燕,许秀琴,等.超高效液相色谱-串联质谱法测定饲料中 6 大类 50 种药物[J].分析试验室,2014,33(6):713-718
ZHAO Jian, LV Yan, XU Xiu-qin, et al. Simultaneous determination of 50 drugs in feeds by ultra performance liquid chromatography electrospray ionization tandem quadrupole mass spectrometric [J]. Chinese Journal of Analysis Laboratory, 2014, 33(6): 713-718

[9] 李洪波,许小友,黄志伟,等.超高效液相色谱-串联质谱法测定饲料中的恩诺沙星和喹乙醇药物的含量[J].饲料工业,2016,37(22):53-37
LI Hong-bo, XU Xiao-you, HUANG Zhi-wei, et al. Determination of enrofloxacin and olaquindox in feeds by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Siliao Gongye, 2016, 37(22): 53-37

[10] Xu X Y, Liu L H, Jia Z M, et al. Determination of enrofloxacin and ciprofloxacin in foods of animal origin by capillary electrophoresis with field amplified sample stacking -sweeping technique [J]. Food Chemistry, 2015, 176: 219-225

[11] Wang Z H, Zhang H Y, Ni H J, et al. Development of a highly sensitive and specific immunoassay for enrofloxacin based on heterologous coating aptens [J]. Analytica Chimica Acta, 2014, 820: 152-158

[12] Yu F, Yu S C, Yu L L, et al. Determination of residual enrofloxacin in food samples by a sensitive method of chemiluminescence enzyme immunoassay [J]. Food Chemistry, 2014, 149: 71-75

[13] Thayyath S, Anirudhan, Alexander S. Design and fabrication of molecularly imprinted polymer-based potentiometric sensor from thesurface modified multiwalled carbon nanotube for the determination of lindane (γ-hexachlorocyclohexane), an organochlorine pesticide [J]. Biosensors Bioelectr, 2015: 586-593

[14] Shrivastav A M, Usha S P, Gupta B D. Fiber optic profenofos sensor based on surface plasmon resonance technique and molecular imprinting [J]. Biosensors Bioelectr, 2016: 150-157

[15] Xin J, Qiao X, Xu Z, et al. Molecularly imprinted polymer as sorbent for solid-phase extraction coupling to gas chromatography for the simultaneous determination of trichlorfon and monocrotophos residues in vegetables [J]. Food Anal Methods, 2013, 1: 274-281

[16] 周梦春,何海,舒耀皋,等.分子印迹-基质固相分散萃取-高效液相色谱法测定土壤中 4 种硫代磷酸酯类农药残留量[J].农药学学报,2015,17(1): 83-88
ZHOU Meng-chun, HE Hai, SHU Yao-gao, et al. Determination of four phosphorothioate pesticide residues in soil samples by molecularly imprinted matrix solid-phase dispersion combined with high performance liquid chromatography [J]. Chinese Journal of Pesticide Science, 2015, 17(1): 83-88